



УДК 547.963.1.02:578.832.1:578.112.853.088.5

СТРУКТУРА УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ КОМПЛЕКСНОГО ТИПА
В ГЕМАГГЛЮТИНИНЕ ВИРУСОВ ГРИППА
А/КИЕВ/59/79 (H1N1), А/ЧИЛИ/1/83/25 (H1N1)
И X/79 (H3N2)

*Арбатский Н. П., Желтова А. О., Сенченкова С. П.,
Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К.*

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

С помощью разработанного ранее метода структурного анализа олигосахаридных фрагментов N-гликопротеинов, основанного на идентификации их с помощью ВЭЖХ, установлено строение главных углеводных цепей комплексного типа в гемагглютинине трех штаммов вируса гриппа. Показано, что набор и соотношение различных цепей в каждом образце гемагглютинина несколько различаются, однако во всех случаях основными являются фукозилированные и нефукозилированные диантенные, а также бисектные цепи.

Углеводные цепи являются важными структурными компонентами гемагглютинина (HA) — главного поверхностного антигена вируса гриппа. В составе HA и других гликопротеинов, ответственных за взаимодействие вируса с клеткой, углеводные цепи выполняют существенную роль, участвуя в стабилизации субъединичной структуры HA, защите его от действия протеолитических ферментов, модуляции антигенных свойств вируса [1–3].

При изучении функциональной значимости углеводных цепей HA необходимый этап — установление их первичной структуры, а также выяснение зависимости характера гликозилирования от подтипа HA. Решение этих задач значительно осложняется гетерогенностью углеводных цепей HA [4, 5], характерной для многих гликопротеинов, трудностью выделения их в индивидуальном состоянии и потребностью в связи с этим в большом количестве (сотни миллиграммов) исходного высокоочищенного вирусного материала. Поэтому данные о первичной структуре углеводных цепей HA весьма немногочисленны, причем касаются только HA подтипа H3 [4, 6] и HA подтипа H7 вируса гриппа птиц [7].

Ранее на примере вируса гриппа А/Ленинград/385/80 (H3N2) нами была разработана схема фракционирования углеводных фрагментов HA с помощью ВЭЖХ [5] и показано, что она может быть использована для сравнительного анализа углеводных цепей N-гликопротеинов, требующего относительно небольшого количества (~10 мг) исходного вируса [8]. Затем на примере хорошо изученных с точки зрения структуры их углеводных цепей гликопротеинов (фетuin, α_1 -кислый гликопротеин, тироглобулин, IgG) установлено [9], что предложенная хроматографическая система позволяет разделить большое число обычных для N-гликопротеинов олигосахаридных фрагментов и, следовательно, возможна прямая идентификация полученных тем или иным образом углеводных цепей, для которых определены хроматографические характеристики. В настоящей работе на основании этих данных проведен структурный анализ углеводных цепей HA трех штаммов вируса гриппа: А/Киев/59/79 (H1N1), А/Чили/1/83/25 (H1N1) и X/79 (H3N2) (далее обозначаются HA-K, HA-Чили, HA-X).

Выделение HA осуществляли с помощью очищенного от гликозидаз препарата бромелаина в условиях, описанных ранее [5]. Чистоту образцов HA контролировали электрофорезом в геле и хроматографией [5]. Во

всех случаях с выходом 50–70% (считая на 30% содержание НА в вирионе) получены хроматографически и электрофоретически гомогенные образцы НА. Однако при восстановлении НА помимо тяжелой и легкой цепей (НА₁ и НА₂) при электрофорезе обнаруживались и другие фрагменты. Этот факт уже отмечался нами ранее [8] и объяснялся возможностью не вполне избирательного расщепления полипептидной цепи НА бромелаином (см. также [10]). Не исключено также, что частичный протеолиз проходил в какой-то степени уже на стадии выделения вируса.

Углеводные цепи НА отщепляли обработкой LiBH₄ в водном *трет*-бутиловом спирте [5, 11] и полученную с выходом 60–75% смесь восстанов-

ленных олигосахаридов фракционировали на биогеле Р-6 с УФ-детекцией при 206 нм. Более низкомолекулярная «олигоманнозидная фракция» была на этой стадии в основном отделена и далее подробно не изучалась. Стоит отметить лишь, что углеводные цепи такого типа составляют не более 20% от общего количества олигосахаридов.

Олигосахаридную фракцию, содержащую углеводные цепи лактозаминного типа, далее фракционировали как описано ранее [5, 8] с помощью последовательной ВЭЖХ на колонках Ultrasphere-C8 и Ultrasil-NH₂. Наборы олигосахаридов, образующихся из различных образцов НА и обнаруживаемых при хроматографии на Ultrasphere-C8, довольно схожи, хотя соотношение компонентов значительно варьирует (рис. 1). Наиболее гетерогенна смесь олигосахаридов, полученная из НА-Чили, более однородной выглядит смесь олигосахаридов из НА-Х. Во всех случаях главными оказались компоненты, элюируемые на 28, 39, 55 и 69-й мин (рис. 1). Каждый из выделенных компонентов смеси (за исключением некоторых минорных)

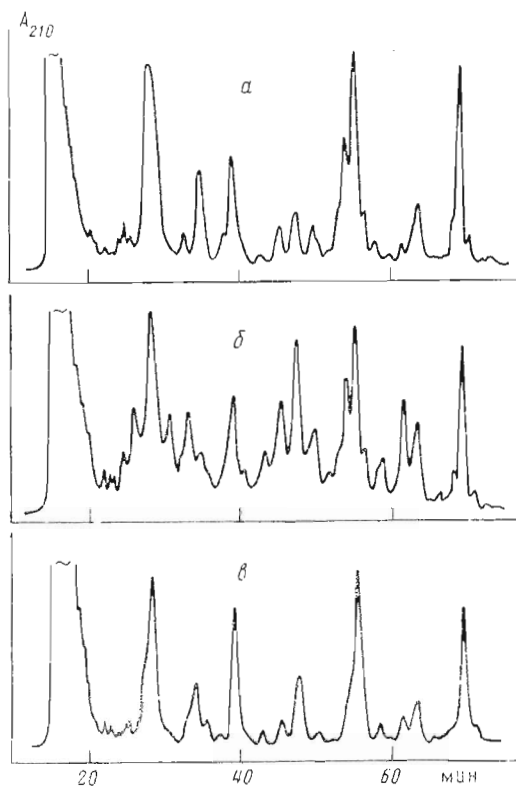


Рис. 1. ВЭЖХ на колонке Ultrasphere-C8 олигосахаридных фракций образцов НА, полученных из А/Рисв/59/79 (а), А/Чили/1/83/25 (б), X/79 (в) (условия элюции – см. «Экспер. часть»)

разделяли далее на колонке Ultrasil-NH₂ и, используя проточную УФ-детекцию, выделяли хроматографически однородные олигосахариды.

Необходимо подчеркнуть, что обе колонки предварительно калибровали с использованием смесей олигосахаридов с известным строением, выделенных ранее из различных гликопротеинов [9]. Это позволяло скорректировать небольшие изменения во времени элюции олигосахаридов, вызываемые некоторыми различиями в условиях хроматографии, и достаточно точно определить хроматографические характеристики исследуемых олигосахаридов относительно стандартных.

Весь набор олигосахаридов, полученных из трех образцов НА, представлен на картах (рис. 2), где каждый олигосахарид изображен в виде пятна. Положение его соответствует хроматографической подвижности на колонках Ultrasphere-C8 и Ultrasil-NH₂, а величина пятна отражает относительное количество данного олигосахаридов. Из большого числа олигосахаридов (ОС), выделенных из трех образцов НА, хроматографически идентифицированы ОС-1 – ОС-9 (рис. 2); последующий анализ моносахара-

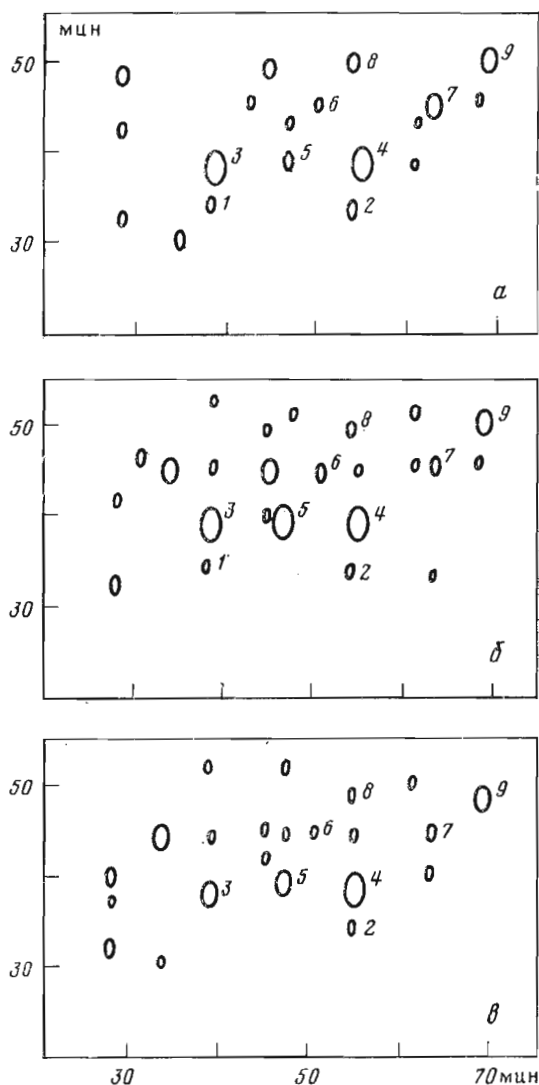


Рис. 2. Олигосахаридные карты НА-К (а), НА-Чили (б), НА-Х (в). По оси абсцисс и ординат – время элюции олигосахаридов (в минутах) на колонках Ultrasphere-C8 и Ultrasil-NH₂ соответственно (условия элюции – см. «Экспер. часть»). Цифры отвечают номерам идентифицированных олигосахаридов ОС1–ОС9 (см. таблицу)

ридного состава подтвердил их соответствие структурам, представленным в таблице. Во всех случаях главными углеводными фрагментами НА являются диантенные нефукозилированные (ОС-3) и фукозилированные (ОС-4) цепи, причем небольшая их часть имеет только один из двух концевых остатков галактозы (ОС-1 и ОС-2). В меньшем количестве содержатся нефукозилированные (ОС-8) и фукозилированные (ОС-9) бисектные, а также триантенные цепи (ОС-6 и ОС-7). Особо следует отметить наличие во всех образцах НА олигосахаридов ОС-5. Олигосахарид с таким хроматографическим поведением и составом (изомер диантенной фукозилированной цепи) был выделен из IgG нормальной сыворотки человека, и строение его предложено на основании результатов частичного гидролиза и деградации по Смитту [12]. В наибольшем количестве он содержится в НА-Чили.

Многие, в основном минорные, олигосахариды остались неидентифицированными, поскольку характерные для них комбинации хроматографических свойств и моносахаридного состава не отвечают ни одному из имею-

Структура выделенных из НА и идентифицированных олигосахаридов

Олигосахариды	R	Структура
OC-1 OC-2	R ¹ R ²	
OC-3 OC-4	R ¹ R ²	
OC-5	R ²	
OC-6 OC-7	R ¹ R ²	
OC-8 OC-9	R ¹ R ²	

R¹ = GlcNAc31-4GlcNAc-ol; R² = GlcNAcβ1-4GlcNAc-ol

щихся в нашем распоряжении олигосахаридов с известным строением. Для их идентификации требуется увеличение банка хроматографических данных.

Главный вопрос, возникающий в связи с применением предлагаемого нами [8, 9], а также другими авторами [13—15] хроматографического подхода к установлению строения N-связанных цепей гликопротеинов: насколько однозначны выводы о структуре олигосахаридов, основанные только на его хроматографическом поведении и моносахаридном составе? Действительно, нельзя пока полностью исключить вероятность того, что некоторые структуры, в частности изомерные, могут иметь практически одинаковые хроматографические характеристики в применяемой нами системе. Однако уже имеются примеры разделения даже очень близких по структуре изомеров с помощью ВЭЖХ [9, 15]. Кроме того, хроматографический подход к структурному анализу олигосахаридов имеет большие резервы для совершенствования, и это позволяет надеяться на возможность разделения в тех или иных условиях в принципе любых олигосахаридов. Несомненно, степень надежности идентификации, уже и сейчас довольно высокая, будет увеличиваться по мере установления хроматографических характеристик все большего числа различных углеводных цепей.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлены структура и соотношение главных углеводных цепей лактозаминного типа в НА трех штаммов вируса гриппа. Хотя каких-либо принципиальных различий в структуре цепей, в том числе выделенных из различных подтипов

НА (Н1 и Н3), не обнаружено, в каждом случае получена характерная картина распределения олигосахаридных структур. Следует также отметить, что олигоманнозидные цепи во всех образцах НА представлены несколькими структурами, различающимися числом остатков маннозы. Всем образцам НА присуща отмечающаяся и ранее [4, 5, 8] высокая гетерогенность углеводных цепей, что вполне понятно, учитывая наличие в НА 6–7 сайтов гликозилирования и неоднозначность структуры углеводной цепи в каждом из них.

Полученные здесь и в предыдущих работах [5, 7, 8] данные вызывают ряд вопросов относительно того, насколько воспроизводимо разнообразие и соотношение различных углеводных цепей в НА, выделенном из одного штамма вируса, какие типы цепей преобладают в том или ином сайте гликозилирования, какие факторы регулируют процессинг углеводных цепей. Эти проблемы являются общими для всех гликопротеинов и требуют дальнейших исследований. Разрабатываемые нами и другими авторами варианты высокочувствительного метода структурного анализа углеводных цепей, основанные на ВЭЖХ [9, 13–15] и хроматографии на лектинах [16], будут чрезвычайно полезны при решении этих вопросов.

Экспериментальная часть

Гемагглютиници получали обработкой суспензии вирионов бромеланном (Sigma), дополнительно очищенным от гликозидаз [17]. Отщепление углеводных цепей НА с помощью 0,05 М LiOH – 2 М LiBH₄ [11], выделение смеси восстановленных олигосахаридов, их очистку на биогеле Р-6 и последующее фракционирование проводили согласно [5]. Индивидуальные олигосахариды выделяли ВЭЖХ на хроматографе Bio-Rad (США) с использованием колонок (10×250 мм, 10 мкм) Ultrasphere-C8 и Ultrasil-NH₂ (Beckman, США); УФ-детекция – при 210 нм. Условия элюции на Ultrasphere-C8: 0–15 мин, вода (0,5 мл/мин); 16–35 мин, вода (1 мл/мин); 36–55 мин, вода → 2,5% метанол (2 мл/мин); 56–85 мин, водный метанол 2,5 → 25% (2 мл/мин); на Ultrasil-NH₂: 75% водный метанол (1 мл/мин). Моносахаридный состав олигосахаридов определяли с помощью углеводного анализатора Biotronik LC-2000 (ФРГ) [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson I. A., Skehel J. J., Wiley D. C. // Nature. 1981. V. 289. № 5796. P. 366–373.
2. Skehel J. J., Stevens D. J., Daniels R. S., Douglas A. R., Knossow M., Wilson I. A., Wiley D. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 6. P. 1779–1783.
3. Зайдес В. В., Березин В. Э., Жданов В. М. // Вопр. вирусол. 1986. Т. 31. № 2. С. 133–148.
4. Matsumoto A., Yoshima H., Kobata A. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 1. P. 188–196.
5. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Лихошерстов Л. М., Сенченкова С. Н., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 837–844.
6. Arbatsky N. P., Derevitskaya V. A., Zheltova A. O., Kochetkov N. K., Likhoshertov L. M., Senchenkova S. N., Yurtov D. V. // Carbohydr. Res. 1988. V. 178. P. 165–181.
7. Nieman H., Dabrowski J., Dabrowski U., Ceyer R., Kiel W., Klenk H.-D., Stirm S. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 146. № 2. P. 523–532.
8. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Сенченкова С. Н., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1542–1549.
9. Арбатский Н. П., Мартынова М. Д., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. № 4. С. 995–999.
10. Кострикина Л. Н., Минаев В. П., Карпович Л. Г., Иткин З. Б., Попов В. Ф., Лопская Н. И. // Вопр. вирусол. 1986. Т. 31. № 5. С. 553–557.
11. Лихошерстов Л. М., Носикова О. С., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 274. № 1. С. 222–225.
12. Арбатский Н. П., Мартынова М. Д., Алешкин В. А., Деревицкая В. А. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 175–180.
13. Tomiya N., Kurono M., Ishihara H., Tejima S., Endo S., Arata Y., Takahashi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 163. № 2. P. 489–499.
14. Hase S., Sugimoto T., Takemoto H., Ikenaka T., Schmid K. // J. Biochem. 1986. V. 99. № 6. P. 1725–1733.

15. Хорлин А. Я., Шиян С. Д., Насонов В. В., Маркин В. А. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1266–1274.
16. Harada H., Kamei M., Tokumoto Y., Yui S., Koyama F., Kochibe N., Endo T., Kobata A. // Anal. Biochem. 1987. V. 164. № 2. P. 374–381.
17. Арбатский П. П., Лихошерстов Л. М., Медведев С. А., Новикова О. С., Сенченко-ва С. Н., Юртов Д. В., Деревницкая В. А., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 271. № 5. С. 1257–1260.

Поступила в редакцию
21.VII.1988

THE STRUCTURE OF COMPLEX CARBOHYDRATE CHAINS
OF HEMAGGLUTININ FROM INFLUENZA VIRUSES
A/KIEV/59/79 (H1N1), A/CHILI/1/83/25 (H1N1) AND X/79 (H3N2)

ARBATSKY N. P., ZHELTOVA A. O., SENCHENKOVA S. N., YURTOV D. V.,
DEREVITSKAYA V. A., KOCHEKOV N. K.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

An earlier developed method of identification of oligosaccharides by HPLC was used for studying the carbohydrate chains of three hemagglutinins from various influenza virus strains. The structures of main oligosaccharides of the complex type were elucidated on the basis of their chromatographic characteristics and monosaccharide composition. Oligosaccharide patterns varied in the above hemagglutinin samples but in all cases the major complex chains were fucosylated and nonfucosylated biantennary chains; bisected and triantennary chains were also found.