



УДК 577.112.853.088

УГЛЕВОДНЫЙ КОМПОНЕНТ α_1 -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА
НОРМАЛЬНОЙ И АБОРТИВНОЙ КРОВИ

Павленко А. Ф., Белогорцева Н. И., Булгаков А. А.
Безнаев А. Н., Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО
Академии наук СССР, Владивосток

Показано, что образцы α_1 -кислого гликопротеина (АКГ), выделенного из плазмы донорской крови (нормальный АКГ, нАКГ) и из абортивной крови (эмбриональный АКГ, эАКГ), несмотря на сходный аминокислотный состав и одинаковые иммунохимические свойства, существенно различаются строением углеводных цепей. эАКГ в отличие от нАКГ наряду с N-связанными углеводными цепями содержит O-связанные. В продуктах HF-сольволиза эАКГ в заметных количествах идентифицирован дисахарид GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal, встречающийся в нАКГ лишь в следовых количествах.

α_1 -Кислый гликопротеин (АКГ), один из основных компонентов плазмы крови человека [1], участвует в регуляции иммунного ответа. Его уровень в крови резко возрастает при воспалениях, злокачественных новообразованиях и ряде других заболеваний [2]. АКГ отличается от многих гликопротеинов высоким содержанием углеводных остатков (~50% углеводов). Строение углеводного компонента АКГ в основном установлено [3]. При этом показано, что он характеризуется микрогетерогенностью, обусловленной главным образом различиями в строении углеводных цепей [4]. Установлено также, что углеводные цепи АКГ, выделенного от здоровых доноров либо от больных [5, 6], различаются.

В настоящее время известно, что имеются структурные и функциональные различия между эмбриональными и нормальными формами некоторых белков [7]. Они обнаружены и в образцах АКГ, выделенных из крови свиней [8].

Целью настоящей работы является сравнительное изучение нормального АКГ (нАКГ), выделенного из плазмы нормальной донорской крови, и эмбрионального АКГ (эАКГ), выделенного из абортивной крови человека.

Гомогенность полученных препаратов нАКГ и эАКГ подтверждена электрофорезом в градиенте пористости полиакриламидного геля. При этом была выявлена только одна полоса с $M_r \sim 45$ кДа. Дополнительно гомогенность была подтверждена иммунохимическими методами: электрофорезом с проявлением полиспецифической антисывороткой против белков плазмы человека (рис. 1) и получением моноспецифических антисывороток при иммунизации животных этими препаратами. нАКГ и эАКГ показали полную иммунохимическую идентичность в двойной иммунодиффузии в агаре со стандартной антисывороткой против α_1 -кислого гликопротеина (рис. 2).

Показано, что в обоих препаратах АКГ не определяются N-концевые аминокислоты. нАКГ и эАКГ сходны по аминокислотному составу с данными, приведенными в литературе [9]. Однако они существенно различаются содержанием ряда моносахаридов (табл. 1). Так, эАКГ в отличие от нАКГ содержит N-ацетилгалактозамин, соотношение галактоза — манноза в случае нАКГ равно 1,4, а в случае эАКГ — 3,6.

Таким образом, полученные результаты могут указывать на существенные различия в построении углеводных цепей нАКГ и эАКГ. Присутствие N-ацетилгалактозамина в эАКГ позволяет предположить, что в нем наряду с N-гликозидными углеводными цепями присутствуют и O-глико-



Рис. 1. Иммуноэлектрофорез нАКГ (1) и эАКГ (2); 3 — антисыворотка к сывороточным белкам человека

Рис. 2. Иммунодиффузионное сравнение нАКГ, эАКГ и их дегликозилированных производных: 1 — антисыворотка против АКГ (Behringwerke, ФРГ); 2 — стандартный образец АКГ (Behringwerke, ФРГ); 3 — нАКГ; 4 — эАКГ; 5 — дегликозилированный нАКГ; 6 — дегликозилированный эАКГ

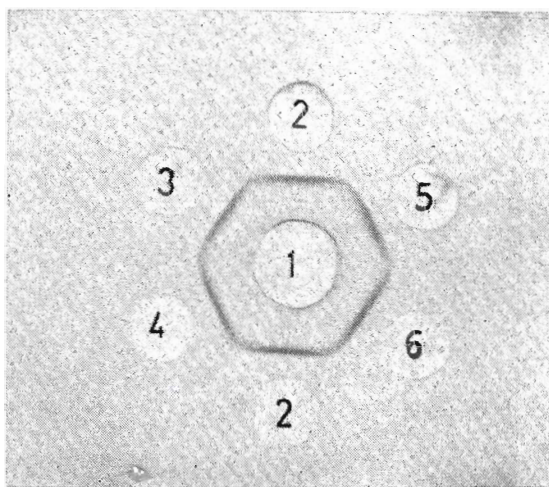


Рис. 3

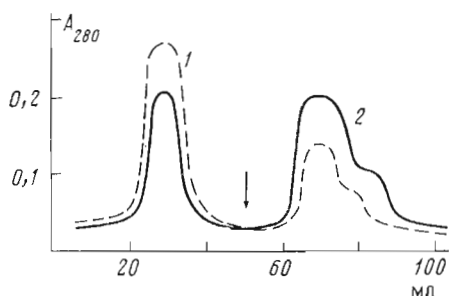


Рис. 3

Рис. 3. Аффинная хроматография нАКГ (1) и эАКГ (2) на конкапавалин-А-сефарозе. Стрелкой отмечено начало элюции буферным раствором, содержащим 0,1 М метил- α -D-глюкопиранозид

Рис. 2

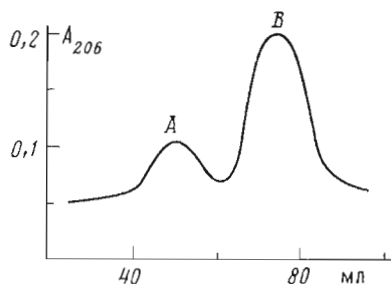


Рис. 4

Рис. 4. Гель-фильтрация на биоэле P-2 низкомолекулярной фракции после HF-сольволиза эАКГ

зидные. Для подтверждения этого нами была проведена щелочная обработка эАКГ в присутствии NaBH_4 по методу Карлсона [10]. Углеводный анализ полученных олигосахаридных фракций показал, что галактозамин присутствует в основном в восстановленной форме. Это свидетельствует о наличии O-связанных углеводных цепей в эАКГ и о присутствии в углевод-белковом узле в основном остатков галактозамина. Учитывая, что N-связанные углеводные цепи имеют определенный тип построения [11], можно определить их количество. Исходя из количества остатков маннозы, входящих в маннотриозильный кор (3), количество N-связанных цепей для нАКГ составляет около пяти, что согласуется с литературными дан-

Моносахаридный состав нАКГ и эАКГ

Моносахарид	нАКГ		эАКГ	
	% по весу	число остатков/моль АКГ	% по весу	число остатков/моль АКГ
Fuc	0,6	2	4,3	4
Man	6,6	15	3,5	9
Gal	9,1	23	12,9	32
GalNAc	14,8	30	14,4	30
GalNAc	0	0	2,1	4
NeuNAc	6,9	10	6,8	10

Таблица 2

Соотношение метилированных производных моносахаридов гидролизатов нАКГ и эАКГ *

Моносахарид	нАКГ		эАКГ		
	нАКГ	эАКГ	Моносахарид	нАКГ	эАКГ
2,3,4-Me ₃ Fuc	0,2	0,7	3,4,6-Me ₃ -Man	2,1	1,2
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,9	4,2	3,6-Me ₂ -Man	0,3	0,8
2,4,6-Me ₃ -Gal	1,2	4	2,4-Me ₂ -Man	1	1
2,3,4-Me ₃ -Gal	0,6	0,9	3,4-Me ₂ -Man	0,5	0,7
2,4-Me ₂ -Gal	0	1,8	3,6-Me ₂ -GlcN(Me)Ac	2,5	3,5

* Рассчитано относительно 2,4-Me₂-Man, 3-Me-GlcN(Me)Ac обнаружен во фракциях в следовых количествах.

ными [12], а в эАКГ их около трех. Количество О-связанных цепей в эАКГ можно посчитать, исходя из содержания GalNAc, учитывая, что он находится в узле углевод-белковой связи. В этом случае количество О-связанных цепей для эАКГ составляет около четырех.

Хроматография нАКГ на конканавалин-А-сефарозе также выявила различия этих препаратов (рис. 3). Содержание фракции, связывающейся с конканавалином А, для нАКГ составляет 50, а для эАКГ — 30%. Следует отметить, что, по результатам углеводного анализа, галактозамид присутствует как в связывающейся с конканавалином А фракции, так и в не связывающейся с ней.

Приведенные результаты указывают на то, что нАКГ и эАКГ различаются строением углеводных цепей, в то же время они полностью иммунохимически идентичны. Это можно объяснить тем фактом, что за иммунохимическую активность в основном отвечает белковый компонент АКГ. Хотя это соответствует известным фактам [1, 3, 6], тем не менее мы провели HF-сольволиз препаратов АКГ. Дегликозилированные образцы нАКГ и эАКГ были полностью иммунохимически идентичны как друг другу, так и нативным нАКГ и эАКГ (рис. 2).

Данные углеводного анализа свидетельствуют о том, что обработка нАКГ и эАКГ HF приводит к удалению остатков нейраминной кислоты, фукозы, большей части остатков маннозы, галактозы и глюкозамина. Наряду с белковыми компонентами были получены олигосахаридные фракции. Смесь олигосахаридов, полученная при HF-сольволизе эАКГ, была разделена на фракции (рис. 4). Фракция А содержит сложную смесь олигосахаридов. Фракция В представляет собой олигосахарид, построенный из остатков галактозы и N-ацетилглюкозамина в мольном соотношении 1 : 1. После исчерпывающего метилирования, гидролиза, последующего восстановления NaBH₄ и ацетилирования, методом хроматомасс-спектрометрии были идентифицированы 2,4,6-три-О-метил-1,3,5-три-О-ацетилгалактитол и 3,4,6-три-О-метил-1,5-ди-О-ацетил-N - (метил)ацетилглюкозаминитол в мольном соотношении 1 : 0,8. В соответствии с полученными данными выделенный олигосахарид имеет строение GlcNAcβ1→3Gal.

В нАКГ обнаружить такой дисахарид нам не удалось, хотя в работе [4] дисахарид такого строения был обнаружен в нАКГ в следовых количествах. В эАКГ этот дисахарид присутствует в более значительном количестве. Необходимо отметить, что наличие вышесказанного фрагмента в углеводных цепях гликопротеинов неоднократно отмечалось при эмбриональном развитии и злокачественных новообразованиях [13, 14].

Нами было также проведено метилирование нАКГ и эАКГ. При сравнении результатов метилирования (табл. 2) в эАКГ отмечается более высокое содержание ацетильных производных 2,3,4,6-тетра-О-метилгалактола и 2,4,6-три-О-метилгалактола. Кроме того, в нем обнаруживается ацетильное производное 2,4-диметилгалактола, которое отсутствует в нАКГ.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на существенные различия в строении углеводных цепей нАКГ и эАКГ: для последнего характерно более высокое содержание углеводного фрагмента: $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}$. Наличие в эАКГ N-ацетилгалактозамина обусловлено присутствием O-связанных углеводных цепей.

Как отмечалось выше, при обычных способах иммунизации углеводный компонент АКГ не входит в состав антигенных детерминант, в то же время он претерпевает существенные изменения в процессе развития организма. Поэтому получение антител против углеводного компонента АКГ, возможно, приведет к пересмотру диагностической ценности этого важного гликопротеина.

Экспериментальная часть

Электрофорез проводили в градиенте полиакриламидного геля (7,5–30%) в присутствии додецилсульфата натрия, как описано ранее [15]. Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе LC 2000 (Biotronic, ФРГ). Содержание углеводов определяли методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов с использованием D-арабинозы в качестве внутреннего стандарта на хроматографе «Цвет 110» со стеклянными колонками (0,3×200 см), заполненными 3% ECNSS-M на носителе Gas-Chrom Q (100–120 меш) при 190°С. Анализ ацетатов частично метилированных полиолов выполняли на хроматографе Pye Unicam 104 со стеклянными колонками (0,4×120 см), заполненными 3% QF-1 на носителе Gas-Chrom (100–120 меш) при 130–210°С, $\Delta t = 5^\circ/\text{мин}$. Хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе LKB 9000S при тех же условиях. N-Концевые аминокислоты определяли по методу [16]. Dns-производные аминокислот идентифицировали двумерной тонкослойной хроматографией на пластинках (5×5 см) с закрепленным слоем силикагеля.

Иммунодиффузию и иммуноэлектрофорез проводили на предметных стеклах в 1,5 или 1% агарозе, приготовленной на 0,1 М веропаловом буфере (рН 8,6). В качестве электродного буфера для иммуноэлектрофореза использовали этот же буферный раствор в разведении 1 : 1. Электрофорез проводили на градиенте напряжения 10 В/см в течение 1,5–2 ч. После добавления антисыворотки (анти-АКГ, Behringwerke, ФРГ) пластины инкубировали 1–2 сут во влажной камере.

Препараты АКГ получали из плазмы крови человека, как описано ранее [17]. При этом нАКГ выделяли из плазмы крови доноров, а эАКГ — из абортинвой крови женщин на 12–13-й неделе беременности.

Метилирование АКГ. Высушенные образцы АКГ (2 мг) исчерпывающе метилировали по методу Хакомори [18]. Метилированные сахара анализировали в виде соответствующих ацетатов полиолов, как описано выше.

Обработка АКГ фтористым водородом. Тщательно высушенный в течение 3 сут в вакууме над P_2O_5 АКГ (200 мг) обрабатывали 1 ч безводным HF при 0°С, как описано ранее [19]. Реакционную смесь осторожно выливали в равный объем воды со льдом, полученный раствор нейтрализовали карбонатом натрия, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно сушили. Получали 102 мг дегликозилированного АКГ. Диализные воды упаривали до 100 мл, осадок NaF отфильтровывали и про-

мывали 50% этанолом. Раствор упаривали до 10 мл, NaF отфильтровывали и окончательное обессоливание проводили на колонке с сефадексом G-15.

Полученную в результате смесь олигосахаридов разделяли гель-фильтрацией на биогеле Р-2 (1,5×88 см) при элюции водой.

Аффинная хроматография АКГ на конканавалин-А-сефарозе. 20 мг АКГ растворяли в 20 мл 0,05 М трис-НСl-буферного раствора (рН 7,6), содержащего 1 М NaCl, 2 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂ и 2 мМ MnCl₂, и наносили на колонку (1,5×20 см) с конканавалин-А-сефарозой, уравновешенную этим же буферным раствором. Колонку промывали двумя объемами исходного буферного раствора и собирали несвязавшуюся фракцию АКГ. После этого через колонку пропускали исходный буферный раствор, содержащий 0,1 М метил- α -D-глюкопиранозид. Собранные фракции диализовали и лиофилизовали. нАКГ: связавшаяся с конканавалин А фракция — 10 мг, не связавшаяся — 10 мг. эАКГ: связавшаяся с конканавалин А фракция — 6 мг, не связавшаяся — 14 мг.

Щелочная обработка. 80 мг эАКГ обрабатывали щелочным боргидридом (0,05 М NaOH и 1 М NaBH₄) в течение 18 ч при 45°С. Реакционную смесь охлаждали во льду, нейтрализовали уксусной кислотой, упаривали досуха и затем несколько раз с добавлением метапола. Обессоливание проводили с помощью гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25. После отделения гликопептидов на даэксе 50W×2 (H⁺) олигосахаридную фракцию после гидролиза 4 н. HCl (16 ч, 100°С) анализировали на анализаторе аминокислот Т-339 (ЧССР), колонка (3,8×160 мм) с катионитом Ostion LGANB в боратном буфере, рН 7,24, при 89°С, реагент — нингидрин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmid K. The Plasma Proteins. N. Y.: Acad. Press, 1975. V. 1. № 4. 183 p.
2. Bleasby A. J., Knowles J. C., Cooke N. J. // Clin. chem. acta. 1985. V. 150. № 2. P. 231–235.
3. Schmid K., Nimberg R. B., Kimura A., Yamoguchi H., Binette J. P. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 492. № 2. P. 291–302.
4. Yashima H., Matsumoto A., Mizuochi T., Kawasaki T., Kobata A. // J. Biol. Chem. 1981. V. 156. № 16. P. 8476–8484.
5. Bion D., Konan D., Feger J., Agneray J., Leray Y., Cardon P., Fournet B., Durand G. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 931. № 3. P. 308–312.
6. Chandrasekaran E. V., Davida M., Dixon D., Mendicino J. // Cancer Res. 1984. V. 44. № 4. P. 1557–1567.
7. Jori C., Reddi E., Rubaltelli F. F. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1988. V. 31. № 1. P. 17–22.
8. Lampreave F., Pineiro A. // Int. J. Biochem. 1984. V. 16. № 1. P. 47–55.
9. Ziegler J., Maier K., Fink M. // Cancer Res. 1982. V. 42. P. 1567–1573.
10. Carlson D. M. // J. Biol. Chem. 1961. V. 241. P. 2984–2986.
11. Kornfeld R., Kornfeld S. // Annu. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 631–664.
12. Хьюз Р. Гликопротеины. М.: Мир, 1985. С. 27–30.
13. Cummings R. D., Kornfeld S. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 10. P. 6253–6260.
14. Feizi T. // Nature. 1985. V. 314. № 6006. P. 53–57.
15. Остерман А. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981.
16. Gray W. R. // Meth. Enzymol. 1967. V. 11. P. 139–161.
17. Gahmberg C. G., Anderson L. C. // J. Exp. Med. 1978. V. 148. № 2. P. 507–521.
18. Hakamori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 2. P. 205–208.
19. Mort A. J., Lampport D. T. A. // Anal. Biochem. 1977. V. 82. № 2. P. 289–309.

Поступила в редакцию
2.XI.1988

SUGAR MOIETY OF α_1 -ACID GLYCOPROTEIN FROM NORMAL AND ABORTIVE BLOOD

PAVLENKO A. F., BELOGORTSEVA N. I., BULGAKOV A. A., BEZNAYEV A. N.,
OVODOV Yu. S.

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Department,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

α_1 -Acid glycoprotein (AGP) samples, viz., normal AGP (nAGP) and embryonic AGP (eAGP), were isolated from plasma of normal donor blood and abortive human blood, respectively. The materials possess similar amino acid composition and immunochemical properties. However, structural patterns of their sugar moieties differ substantially. nAGP contains only N-glycosidically bound sugar chains, whereas on eAGP some sugar chains are linked through O-glycosidic bonds. Disaccharide GlcNAc β_1 →3Gal was identified in considerable amounts in HF-solvolytate of eAGP but only as traces in nAGP.