



УДК 547.963.1.057

© 1990 г.

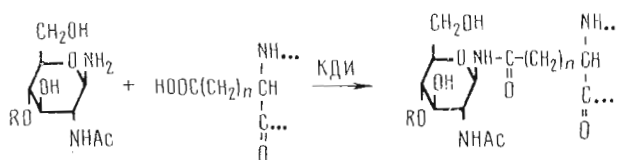
СИНТЕЗ N-ГЛИКОПРОТЕИНОВ С ПРИРОДНЫМ ТИПОМ УГЛЕВОД-ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

*Лихошерстов Л. М., Иискарев В. Е., Дерезицкая В. А.,
Кочетков Н. Б.*

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

Известен ряд методов, позволяющих привязывать углеводы к полипептидной цепи и использующих реакции азосочетания [1], амидирования [2], аминирования [3] и др. Получаемые при этом так называемые неогликопротеины, широко используемые в биохимических, иммунохимических и цитохимических исследованиях [4], содержат непривычные типы углевод-пептидной связи, что коренным образом отличает их от природных гликопротеинов. Вместе с тем осознанное в настоящее время важное значение углеводных цепей для функционирования гликопротеинов требует развития методов, позволяющих вводить в белковую цепь углеводные фрагменты, соединенные природной связью, например N-гликозиламидной, характерной для N-гликопротеинов. Это может иметь важное значение как с научной, так и с практической точки зрения, в частности для решения проблемы гликозилирования белков, получаемых с помощью генной инженерии [5].

В связи с этим мы сообщаем о первом методе получения неогликопротеинов, которые в значительной мере моделируют природные N-гликопротеины. Синтез основан на конденсации остатков Asp и Glu белка с β -олигогликозиламидами в присутствии водорорастворимого карбодимида (КДИ):



где R — олигосахаридная цепь, $n = 1$ (Asp) или 2 (Glu).

Такой подход стал возможен после того, как нами был разработан общий удобный и мягкий метод получения β -гликозиламинов аминосахаров, в том числе таких, как GlcNAc и GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc, и продемонстрировано их использование для синтеза узла углевод-пептидной связи гликопротеинов [6], а также было показано, что олигосахаридные цепи, полученные отщеплением от природных N-гликопротеинов, легко превращаются в соответствующие β -олигогликозиламины и ацилируются [7]. Разработанный метод позволил осуществить введение сложных разветвленных олигосахаридов, выделенных из овальбумина, овомукоида, рибофлавинсвязывающего гликопротеина белка куриного яйца и аспалофетуина в такие белки, как лизоцим, бычий сывороточный альбумин, а также poly(L-Asp) (Sigma, США).

Сокращения: ГП — гликопротеин, ОГА — β -олигогликозиламин, ОС — олигосахарид, БСА — бычий сывороточный альбумин.

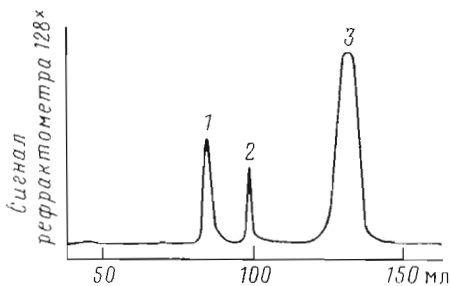


Рис. 1

Рис. 1. Разделение реакционной смеси БСА с ОГА из асилалофетуина (аф) на колонке с сефадексом G-50(f). Пики соответствуют конъюгату БСА-ОС_{аф} (1), ОС_{аф} (2), солям и низкомолекулярным продуктам реакции (3)

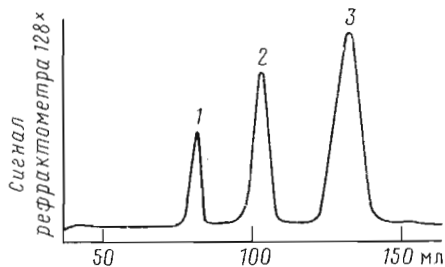


Рис. 2

Рис. 2. Разделение реакционной смеси poly(L-Asp)/ди-N,N'-ацетилхитобиозиламин на колонке с сефадексом G-15. Пики соответствуют конъюгату poly(L-Asp)-(GlcNAc)₂ (1), (GlcNAc)₂ (2), солям и низкомолекулярным продуктам реакции (3)

Отщепление олигосахаридных цепей от N-гликопротеинов осуществлялось разработанным в нашей лаборатории методом [8]. Превращение олигосахаридов в β-олигогликозиламины проводилось по методике [7] с тем отличием, что продукты не выделяли в индивидуальном виде, а концентрировали их водный раствор до объема 0,5—1 мл и сразу вводили в реакцию с белком. Последняя проводилась в 1 М NaCl, pH 4,5—5,0, при 20° С в течение 15 ч. Концентрация белков или poly(L-Asp) составляла 1—20 мг/мл, β-олигогликозиламинов — 1—10 мг/мл, *n*-толуолсульфоната N-циклогексил-N'-(2-морфолиноэтил)карбодимида 0,02—0,1 М. Реакцию проводили с 5—50 мг белка или poly(L-Asp) и 1—10 мг β-олигогликозиламинов. Реакционная смесь хроматографировалась на колонке (1,5 × 90 см) с сефадексом G-50 (f) в 0,1 М пиридин-ацетатном буфере, pH 5,0. Состав элюируемых фракций контролировался с помощью аминокислотного и углеводного анализаторов (Biotronik LC-2000) после гидролиза 4 н. HCl (16 ч) и 3 н. CF₃COOH (6 ч).

При разделении реакционной смеси, полученной путем взаимодействия БСА с β-олигогликозиламинами из асилалофетуина, синтетический N-гликопротеин полностью отделяется от непрореагировавшей фракции олигосахаридов (рис. 1).

Полученные указанным методом синтетические N-гликопротеины введены в таблице.

Особенно существенным является вопрос о природе углевод-пептидной связи в синтезированных гликопротеинах. Образование при конденсации poly(L-Asp) с ди-N,N'-ацетилхитобиозиламином высокомолекулярного продукта, полностью отделяющегося от непрореагировавшего дисахарида (рис. 2) и содержащего высокий процент GlcNAc (по данным аминокислотного анализа), убедительно свидетельствует об образовании N-гликозил-амидной связи в полученном гликоконъюгате.

Природа возникающей при гликозилровании связи была также подтверждена результатами анализа продуктов протеолиза гликопротеинов, полученного из БСА и β-олигогликозиламинов овальбумина состава GlcNAc₃Man_{4,5}. 25 мг синтетического гликопротеина инкубировали при 50° С с 1 мг проназы E (Sigma, США), добавляя еще по 1 мг фермента через 12 и 24 ч. Через 48 ч реакционную смесь обессоливали на колонке (1,5 × 90 см) с сефадексом G-15 в 0,1 М пиридин-ацетатном буфере и выходящую с фронтом фракцию наносили на даэкс 50W-X2. Катионит промывали водой, после чего 0,5 М NH₄OH элюировали фракцию, содержащую в качестве основных компонентов GlcNH₂, Man, Asp и Glu в соотношении GlcNH₂—(Asp + Glu) 3 : 1 и GlcNH₂—Man 3 : 4,5. Из других аминокислот присутствовали Gly (0,3), Ser (0,25) и Thr (0,2), остальные — менее 0,1—0,2 моль на 1 моль (Asp + Glu). Этот результат подтверждает образование N-гликозил-амидной связи при конденсации β- или γ-карбоксиль-

**Продукты пришивки β -олигогликозиламинов (ОГА) из различных
N-гликопротеинов к белкам и poly(L-Asp)**

Белок (полипептид)	Источник ОГА	Соотношение белок/ОГА в реакции, мг/мг	Соотношение (Asp+Glu)/OC в гликоконъюгате
БСА	Овальбумин	5 : 8	20 : 1
БСА	РФ-ГП _б	5 : 5	38 : 1
Лизоцим	Асиалофетуин	5 : 5	32 : 1
»	Овомукоид	5 : 8	20 : 1
poly(L-Asp)	Ди-N,N'-ацетилхитобиоза	1 : 4	5 : 1

ных групп остатков Asp и Glu соответственно белка с аминогруппой β -олигогликозиламинов. Сохранение конфигурации гликозидного центра при реакциях ацилирования β -гликозиламинов в присутствии растворимого карбодимида, продемонстрированное нами ранее [6], позволяет и в данном случае приписать N-гликозиламидной связи β -конфигурацию.

Таким образом, предлагаемый метод впервые позволяет синтезировать N-гликопротеины, моделирующие природные, в том числе типом и конфигурацией углевод-пептидной связи, и может найти применение для искусственного гликозилирования различных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goebel W. F., Avery O. T. // J. Exp. Med. 1931. V. 54. P. 431—436.
2. Shier W. T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1971. V. 68. № 9. P. 2078—2082.
3. Gray G. R. // Arch. Biochem. and Biophys. 1974. V. 163. № 1. P. 426—428.
4. Stowell C. P., Lee C. Y. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1980. V. 37. P. 225—281.
5. Berman P. W., Lasky L. A. // Trends Biotechnol. 1985. V. 3. № 2. P. 51—53.
6. Лихошерстов Л. М., Новикова О. С., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1986. № 7. С. 1663—1670.
7. Пискарев В. Е., Лихошерстов Л. М., Сенетов Н. Ф., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1704—1707.
8. Likhosherstov L. M., Novikova O. S., Piskarev V. E., Trusikhina E. E., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 178. P. 155—163.

Поступило в редакцию
15.VIII.1989.

**SYNTHESIS OF N-GLYCOPROTEINS WITH A NATURAL TYPE
OF CARBOHYDRATE-PEPTIDE BOND**

LIKHOSHERSTOV L. M., PISKAREV V. E., DEREVIЦКАЯ В. А., КОЧЕТКОВ Н. К.

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

Reaction of β -oligoglycosylamines obtained from carbohydrate chains of N-glycoproteins (ovalbumin, ovomucoid, riboflavin-binding glycoprotein from hen egg white, and asialofetuin) with bovine serum albumin, lysozyme, and poly(L-Asp) in presence of water-soluble carbodiimide gave rise to a series of glycoconjugates, modelling natural N-glycoproteins. Carbohydrate-peptide bond was shown to be of N-glycosylamide type with participation of Asp and Glu residues. The method allows one to obtain synthetic N-glycoproteins from oligomannoside, complex and hybride oligosaccharide chains, and may find application both in biochemistry and biotechnology for improvement of physico-chemical properties of unglycosylated proteins.