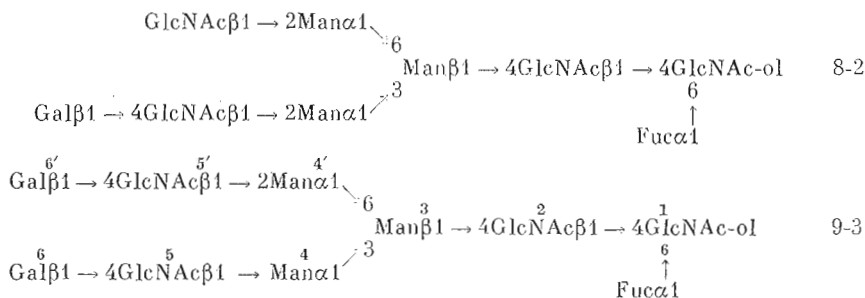


Химические сдвиги (δ , м.д.) протонов структурно-репортерных групп моносахаридов фукозилированных углеводных цепей РФ-ГП₆

Протон	Номер остатка моносахарида	Олигосахарид			
		7-1	8-1	8-2	9-3
H-1	2	4,716	4,716	4,716	4,717
	3	4,78	4,78	4,78	4,78
	4	5,119	5,105	5,125	5,125
	4'	4,916	4,923	4,919	4,927
	5	4,555	—	4,557	4,585
	5'	4,555	4,578	4,585	4,585
	6	—	—	4,472	4,475 *
	6'	—	4,470	—	4,471 *
H-2	Fuc	4,896	4,897	4,899	4,900
	1-ol	4,228	4,223	н. о. **	4,227
	2	3,770	3,770	»	3,780
	3	4,255	4,256	»	4,256
	4	4,189	4,069	»	4,195
	4'	4,108	4,107	»	4,112
	5	3,704	—	»	3,757
	5'	3,704	3,753	»	3,757
	6	—	—	»	3,543
	6'	—	3,542	—	3,543
CH ₃ (N-Ac)	Fuc	3,804	3,804	н. о.	3,806
	1-ol	2,057	2,057	2,057	2,060
	2	2,087	2,088	2,088	2,092
	5	2,055	—	2,057	2,056
	5'	2,052	2,046	2,053	2,050
CH ₃	Fuc	1,229	1,228	1,228	1,228

* Отнесение может быть обратным.

** н. о. — не определён.



В таблице приведены значения химических сдвигов протонов структурно-репортерных * групп моносахаридов выделенных олигосахаридов, а на рис. 2 и 3 представлены спектры ¹H-ЯМР олигосахаридов 7-1 и 8-1.

Олигосахариды 7-1, 8-1, 8-2 и 9-3 содержали от 8 до 10 моносахаридных остатков, 5 из которых входили в восстановленный пентасахаридный кор (Man₃GlcNAc₂), обычно присутствующий в олигосахаридах из N-гликопротеинов. Все олигосахариды содержали по одному остатку фукозы, присоединенному α1-6-связью к остатку GlcNAc-1-ol, что следует из присутствия в спектрах ¹H-ЯМР характерных сигналов [3] H-1 на ~4,897 м.д. (J_{1,2} 3,8 Гц), CH₃ ~ 1,228 м.д. остатка Fuc и сдвига в слабое поле сигнала H-1 (Δ ~ 0,08 м.д.) GlcNAc-2. Необходимо отметить, что для Fuc, присоединенной связью α1-3, характерны другие значения химических сдвигов [4]. Общие, одинаково замещенные во всех олигосахаридах остатки GlcNAc-1-ol и Man-3 дали в спектрах ¹H-ЯМР практически совпадающие сигналы (см. таблицу), которые хорошо согласуются с литературными данными [3]. Сигналы остальных моносахаридных остатков Man-4 и Man-4', GlcNAc-5 и GlcNAc-5', Gal-6 и Gal-6' в олигосахаридах 7-1, 8-1, 8-2 и 9-3 были отнесены путем сравнения их параметров как друг с другом, так и с литературными данными.

* По терминологии Флигенхарта и сотр. [3].

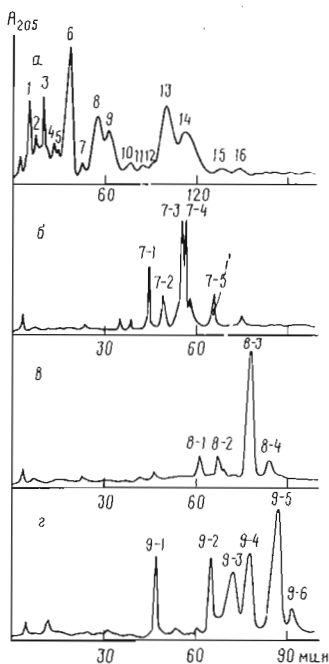


Рис. 1. Разделение смеси восстановленных олигосахаридов РФ-ГП₆ на колонке (19 × × 150 мм) μ Bondapak C-18, элюент — вода, скорость потока 6 мл/мин, детекция при 205 нм (а) и разделение фракций 7 (б), 8 (в) и 9 (z) на колонке (4,6 × 250 мм) Zorbax NH₂, элюция градиентом вода — ацетонитрил (70 → 55% ацетонитрила за 120 мин), скорость потока 1 мл/мин, детекция при 205 нм

Олигосахарид 7-1. Структура этого олигосахарида следовала из практически полного совпадения сигналов Н-1, Н-2 и CH₃(N-Ac), Man-3, Man-4 и Man-4', GlcNAc-5 и GlcNAc-5' с соответствующими сигналами в спектре олигосахарида, не содержащего фрагмента Fucα1 → 6GlcNAc-ol [3]. Олигосахарид, аналогичный 7-1, выделен ранее из иммуноглобулина (IgG) человека в виде производного 2-аминопиридина; приведены параметры его ¹H-ЯМР-спектра [5]. Структура олигосахарида 7-1 подтверждалась этими данными, а некоторые различия в химических сдвигах соответствующих протонов этих олигосахаридов связаны с присутствием остатка 2-аминопиридина и другой температурой (60° С) съемки спектров.

Олигосахарид 8-1. Согласно моносахаридному составу и данным ¹H-ЯМР, олигосахарид 8-1 — одноантенный фукозилированный олигосахарид N-ацетиллактозаминного типа. Наличие в спектре олигосахарида 8-1 сигналов Н-1 на 4,923 м.д., Н-2 на 4,107 м.д. Man-4' и сдвиг сигналов Н-1 (Δ — 0,014 м.д.), Н-2 (Δ — 0,12 м.д.) остатка Man-4 в сильное поле по сравнению с сигналами Н-1 и Н-2 Man-4 в спектре олигосахарида 7-1 свидетельствовали [3] о присутствии остатка N-ацетиллактозаминина у Man-4'. По нашим данным, олигосахарид со структурой 8-1 ранее не был описан.

Олигосахарид 8-2. Этот олигосахарид, по данным моносахаридного анализа и данным ¹H-ЯМР, представлял собой моногалактозилированный олигосахарид 7-1. Из IgG человека ранее выделены в виде производных 2-аминопиридина два изомерных олигосахарида типа 8-2 с очень близкими сигналами в спектрах ¹H-ЯМР. При этом было показано, что замещение GlcNAc-5' остатком Gal-6' в отличие от аналогичного замещения в другой антенне приводит к сдвигу (Δ — 0,003 м.д.) в сильное поле сигнала CH₃ остатка GlcNAc-5' [5]. На основании этих данных и отсутствия сдвига сигналов CH₃ остатков GlcNAc-5 и GlcNAc-5' олигосахаридов 7-1 и 8-2 можно предположить, что в олигосахариде 8-2 присутствует Gal-6.

Олигосахарид 9-3. Данные ¹H-ЯМР (таблица) свидетельствуют о том, что олигосахарид 9-3 представляет собой дигалактозилированный олигосахарид 7-1. Структура олигосахарида 9-3 подтверждалась данными ¹H-ЯМР нефукозилированного [3] и фукозилированного [3, 5, 6] олигосахаридов такого типа, выделенных ранее из различных гликопротеинов. Судя по относительному содержанию, олигосахарид 9-3 — главный нейт-

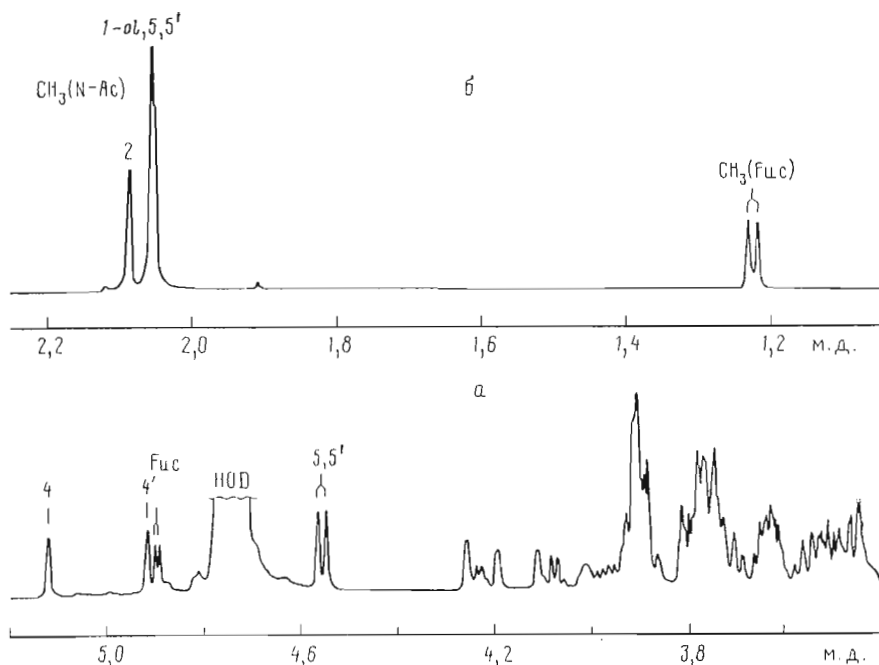


Рис. 2. Спектр ^1H -ЯМР (500 МГц, 300 К) олигосахарид 7-1. Отмечены сигналы протонов Н-1 моносахаридных остатков (а) и группы CH_3 остатков GlcNAc и Fuc (б). Цифры соответствуют номеру остатка

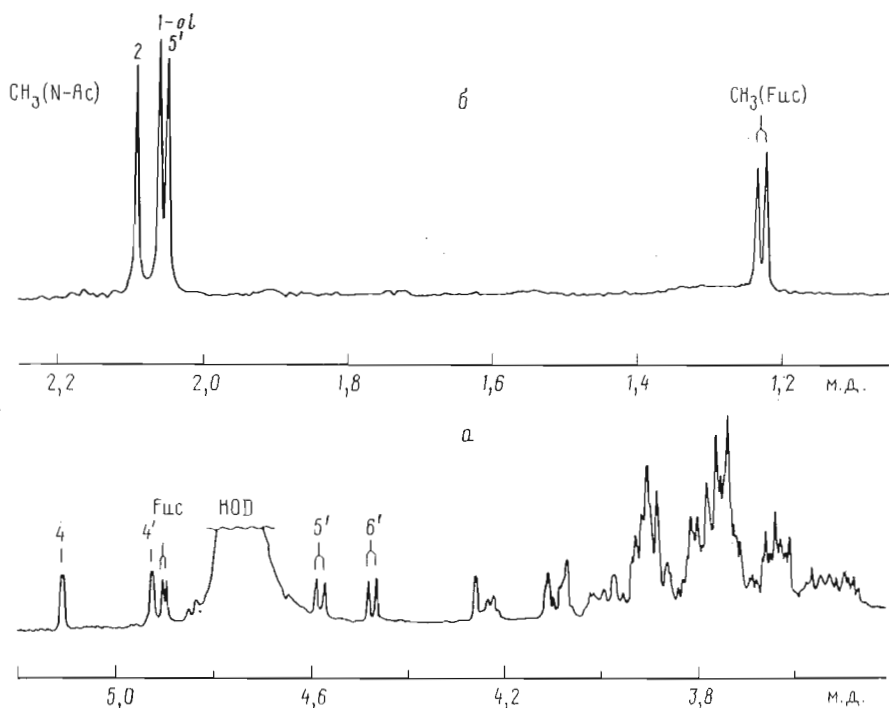


Рис. 3. Спектр ^1H -ЯМР (500 МГц, 300 К) олигосахарид 8-1. Обозначения как на рис. 2

ральный фукозилированный олигосахарид РФ-ГП₆, а олигосахариды 7-1, 8-1 и 8-2 — миноры и, возможно, интермедиаты биосинтеза олигосахарид 9-3.

Анализ нейтральных углеводных цепей куриного овомукоида, проведенный нами аналогичным образом, также позволил обнаружить олигосахарид 9-3. Фукозилированные олигосахариды РФ-ГП₆ имеют струк-

турное сходство с олигосахаридами IgG человека [5]. Важно заметить, что нам не удалось выделить бисектированных фукозилированных цепей, хотя почти все ранее описанные [1] не содержащие остатков Fuc нейтральные олигосахариды из РФ-ГП₅ были бисектированными, т. е. содержали фрагмент GlcNAc β 1 — 4Man β .

Таким образом, в гликопротеинах (овомукоид и РФ-ГП₅) белка куриного яйца впервые обнаружены фукозилированные олигосахариды, что указывает на наличие соответствующей фукозилтрансферазы в яйце-кладе кур, где происходит биосинтез этих гликопротеинов.

Экспериментальная часть

Хроматографическое оборудование, выделение гликопротеинов, отщепление, анализ и ВЭЖХ углеводных цепей описаны в работах [1, 2, 7].

Для спектроскопии ¹H-ЯМР использовали спектрометр WM-500, снабженный компьютером Aspect-2000 (Bruker, ФРГ). Образцы готовили двукратной лиофилизацией из 99,8% ²H₂O (Sigma, США) и растворяли в 0,5 мл 99,96% ²H₂O (Merck, ФРГ). Спектры записывали при 300 К, используя в качестве внутреннего стандарта ацетон (δ 2,225 м.д.).

Химический сдвиг сигнала H-1 остатка Man-3 ($\delta \sim 4,78$), находящийся под сигналом HOD, определяли методом дифференциального двойного резонанса (с точностью $\pm 0,01$ м.д.). При этом за указанный химический сдвиг принималась та частота облучения, при которой в спектре наблюдалась полная развязка спин-спинового расщепления сигнала H-2 остатка Man-3 при минимальной мощности облучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пискарев В. Е., Сепетов И. Ф., Лихошерстов Л. М., Галенко Е. Л., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 11. С. 1546—1554.
2. Лихошерстов Л. М., Пискарев В. Е., Галенко Е. Л., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 528—532.
3. Vliegenthart J. F. G., Dorland L., van Halbeek H. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 209—374.
4. Fournet B., Leroy Y., Wieruszky J.-M., Montreuil J., Poretz R. D., Goldberg R. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 166. № 2. P. 321—324.
5. Takahashi N., Ishii J., Ishihara H., Mori M., Tejima S., Jefferis R., Endo S., Arata Y. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 26. P. 1137—1144.
6. Niemann H., Dabrowski J., Dabrowski U., Geyer R., Kiel W., Klenk H.-D., Stirm S. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 146. № 3. P. 523—532.
7. Пискарев В. Е., Галенко Е. Л., Лихошерстов Л. М., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1171—1178.

Поступила в редакцию
11.IX.1989

V. E. PISKAREV, L. M. LIKHOSHERSTOV, N. F. SEPETOV*, E. I. GALENKO,
V. A. DEREVITSKAYA

STRUCTURE OF CARBOHYDRATE CHAINS OF RIBOFLAVIN-BINDING GLYCOPROTEIN FROM HEN EGG WHITE. III. ¹H NMR 500 MHz SPECTROSCOPY OF NEUTRAL FUCOSYLATED OLIGOSACCHARIDES

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

* All-Union Cardiological Centre, Institute of Experimental Cardiology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

Using LiBH₄ / Bu^tOH treatment, oligosaccharides were cleaved off the hen egg white riboflavin-binding glycoprotein. HPLC led to the isolation of four fucose-containing oligosaccharide alditols, whose structure was elucidated by means of ¹H NMR 500 MHz spectroscopy. The main fucosylated oligosaccharide, also present in hen ovomucoid, was found to be a biantennary carbohydrate chain of N-acetylactosamine type.