



УДК 577.112.853.014:577.114.5

© 1994 С. Д. Шиян, В. В. Насонов, Н. В. Бовин,
В. А. Алешкин*, Л. И. Новикова*, А. Г. Лютов*

СТРУКТУРА УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ α_1 -КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА ИЗ АСЦИТНОЙ ЖИДКОСТИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

** МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского МЗ РФ, Москва*

Ключевые слова: α_1 -кислый гликопротеин, углеводные цепи; рак желудка.

α_1 -Кислый гликопротеин из асцитной жидкости больных раком желудка (аАГП), иммунохимически идентичный АГП из нормальной человеческой крови (нАГП), хроматографией на Соп-А-сефарозе разделен на Соп-А-несвязываемую (аАГП-1, 44,0 кДа, 70%) и две Соп-А-связываемые (аАГП-2, 41,5 кДа, 24%, и аАГП-3, 40,0 кДа, 5%) формы. Содержание обеих Соп-А-связываемых форм в асците было в 2,5 раза выше, чем в донорской сыворотке.

Показано, что молекулярные формы аАГП различаются между собой содержанием двух-, трех- и четырехантенных углеводных N-цепей сложного типа. В то же время молекулярные формы аАГП отличались от нАГП большей микрогетерогенностью: в них увеличено содержание монодегалактоолигосахаридов, а также фрагментов Le^x .

Неопластический рост клеток и ряд других заболеваний сопровождаются изменением уровня в крови некоторых белков, так называемых «белков острой фазы» [1—3]. Для многих из них найдены нарушения в степени и характере гликозилирования, индуцированные цитокинами [4—8]. Наиболее характерны изменения в сравнении с нормой в степени разветвленности N-цепей. Так, для α_1 -кислого гликопротеина (АГП) в зависимости от источника (кровь, асцитная жидкость или опухоль онкобольных) и вида заболевания (рак, цирроз печени, аллергические реакции) показаны изменения в соотношении двух-, трех- и четырехантенных цепей комплексного типа [5, 6, 9, 10], количестве сайтов гликозилирования [10] и характере их замещения [11], а также различия в степени фукозилирования и сиаилирования углеводных цепей [7, 12].

Для многих белков острой фазы функциональные нарушения, связанные с уровнем гликозилирования, остаются невыясненными. Однако, например, известно, что молекулярные формы АГП из крови здоровых доноров, различающиеся структурой углеводных цепей, имеют разную иммуномодулирующую активность [13—16]. Поэтому можно ожидать, что изменение содержания АГП или отдельных

Адрес для переписки: 117871 ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ РАН, С. Д. Шиян

Молекулярные массы и углеводный состав АГП и его молекулярных форм

Характеристика	аАГП-1	аАГП-2	аАГП-3	аАГП [9]	нАГП [18]
<i>M</i> , кДа	44,0	41,5	40,0	44,0	43,5
<i>rI</i>	2,5—3,0	3,0—3,4	2,8—3,2	2,5—3,2	2,7—3,4
Углеводный состав, моль/3 моль Map					
Gal	3,60	2,65	2,40	3,40	3,95
GlcNAc	5,90	4,90	4,45	5,50	5,90
Map	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Fuc	0,36	0,26	0,30	0,30	0,15
Neu5Ac	3,40	2,65	2,40	3,20	3,00

его молекулярных форм в организме больного существенно скажется на его иммунном статусе.

Действительно, для АГП, выделенных из донорской крови (нАГП), абортинной крови и асцитной жидкости больных раком желудка (аАГП), и их молекулярных форм показаны дозозависимые различия в их иммуномодулирующих свойствах [15]. В АГП онкобольных (кровь и асцитная жидкость) перекрестным иммуноаффинным электрофорезом с Cop A и антисывороткой к АГП выявлено несколько молекулярных форм, соотношения между которыми отличаются от таковых в нормальной сыворотке крови [5, 6, 9]. Анализ структуры углеводных цепей АГП онкобольных обнаружил изменения в соотношении N-цепей разной антенности и в степени микрогетерогенности [9, 12, 17]. В настоящей работе аАГП, выделенный нами ранее из асцитной жидкости больных раком желудка [9], был разделен на молекулярные формы, для которых проведен анализ структуры углеводных цепей.

Молекулярные формы АГП. Электрофоретически и иммунохимически чистый аАГП с *M* 44 кДа, выделенный из асцитной жидкости онкобольных, отличался от нАГП по моносахаридному составу и соотношению четырех-, трех- и двух-антенных цепей сложного типа [9, 17]. Хроматографией на Cop-A-сефарозе в условиях работы [18] он был разделен на три формы: Cop-A-несвязываемую (аАГП-1, 70%) и две Cop-A-связываемые (аАГП-2, 24%, и аАГП-3, 5%) формы. Все три формы были иммунохимически идентичны нАГП и мало отличались по электрофоретической подвижности от аналогичных форм нАГП. По данным градиентного SDS-электрофореза, они имели *M* 44,0, 41,5 и 40,0 кДа, близкие молекулярным массам соответствующих форм нАГП (43,5, 41,2 и 39,5 кДа соответственно [18]). Однако в асците содержание Cop-A-связываемых форм аАГП-2 и аАГП-3 было примерно вдвое выше, чем в норме.

Молекулярные формы аАГП различались между собой относительными молекулярными массами, изоэлектрическими точками и содержанием углеводов; заметных различий в аминокислотном составе обнаружено не было (табл. 1). Содержание Gal и GlcNAc в аАГП и его формах было ниже, чем в аналогичных формах в норме; аАГП-2 и аАГП-3 различались по содержанию Fuc. Количество Neu5Ac, определенное тиобарбитуратным способом, в аАГП из пула и в Cop-A-несвязываемой форме (аАГП-1) было близко таковому в нАГП и нАГП-1 соответственно, тогда как в Cop-A-связываемых формах (АГП-2 и АГП-3) оно было несколько ниже. Хотя детальный анализ сиалилирования разных форм АГП не являлся предметом настоящего исследования, некоторые отличия для

Распределение N-углеводных цепей в аАГП и его молекулярных формах (в %) и их характеристика

АМК-ОС	Хроматографические характеристики		Содержание АМК-ОС, %**				
	RRT	N _i	нАГП [18]	аАГП	аАГП-1	аАГП-2	аАГП-3
1	0,49	25,60	3	1	1	1	1
2	0,58	24,90	3	1	1	1	2
3	0,69	22,71	4	1,5	2	1	1
4	0,76	21,86	2	2,5	3	2	3
5	0,83	21,55	32	26	30	22	12
6	0,86	20,10	3	6	6	2	1
7	1,00	19,25	36	34	36	29	15
8	1,09	17,90	3	4	5	2	1
9	1,17	16,05	10	17	9	36	56
10	1,25	24,45	0,5	3	3,3	2	3,5
11	1,31	14,3	1	1	1	0,5	1
12	1,42	22,15	0,5	2,3	2,0	2,2	2,4
13	1,67	19,05	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1

*RRT — по данным офВЭЖХ в системе А, N_i — по данным эВЭЖХ в системе В.

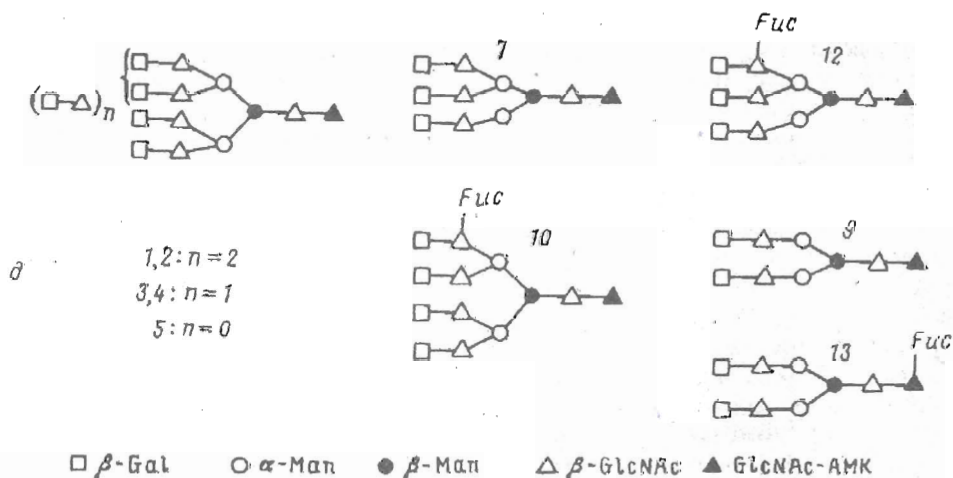
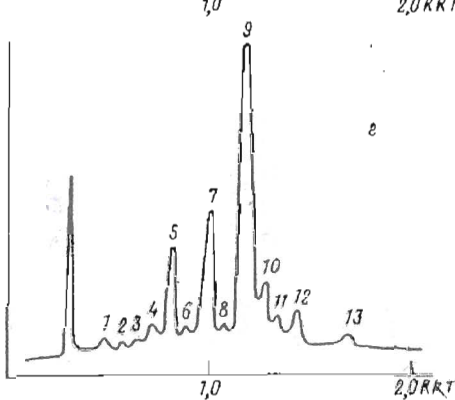
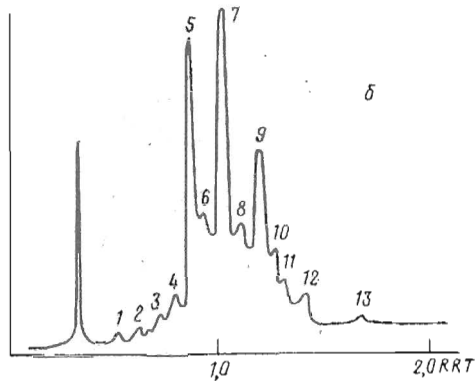
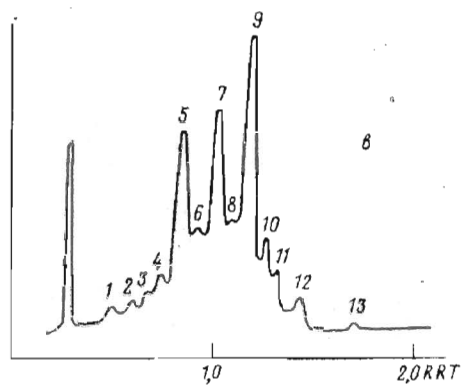
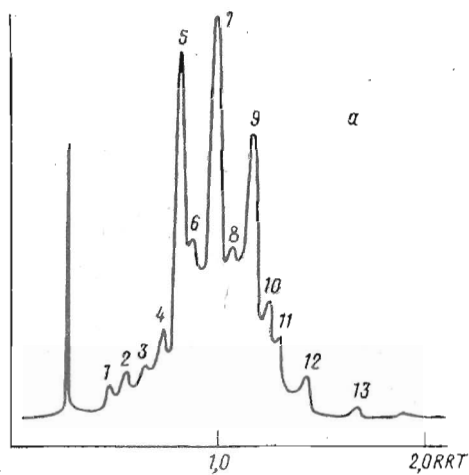
**Определено флуориметрически в системе Б.

аАГП обнаружены как при ВЭЖХ-анализе сиалосодержащих ОС, так и при спектральном анализе методом гигантского комбинационного рассеивания [19].

Анализ структуры N-связанных углеводных цепей аАГП и его молекулярных форм проводили методом, описанным ранее [18]: образцы АГП десилилировали, отщепляли углеводные цепи гидрозинолизом, превращали во флуоресцентные аминометилкумариновые производные (АМК-ОС), разделяли и анализировали обращенно-фазовой (оф) ВЭЖХ в изократическом режиме (система А) и в градиенте ацетонитрила в воде (система Б, рис. 1а). В результате было получено более 13 фракций АМК-ОС, каждую из которых анализировали эксклюзионной (э) ВЭЖХ, оценивали относительную молекулярную массу и определяли моносахаридный состав. Профили элюции и хроматографические характеристики каждого выделенного АМК-ОС из аАГП сравнивали с таковыми для нАГП [18] (табл. 2). Для подтверждения структуры АМК-ОС подвергали действию гликозидаз известной специфичности и анализировали полученные продукты расщепления с помощью ВЭЖХ аналогично тому, как описано в работах [9, 18].

Ранее нами был приведен суммарный состав олигосахаридов аАГП [9], установлено его сходство с составом нАГП и показано, что основными (около 75% в сумме) являются четырех-, трех- и двухантенные гликаны сложного типа (АМК-ОС (5), (7) и (9), рисунок, а, д). Олигосахариды аАГП в целом отличались от нАГП повышенным содержанием диантенных цепей (АМК-ОС (9)), фукозилированных олигосахаридов (главным образом четырех- и трехантенных с фрагментом Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc (Le^x) — АМК-ОС (10) и (12), а также недостроенных агалактоолигосахаридов, АМК-ОС (6), (8) и (11)). В то же время количество цепей с повторяющимся лактозаминным блоком, АМК-ОС (1) — (4), в аАГП было несколько ниже, чем в нАГП (табл. 2).

ВЭЖХ-анализ АМК-ОС молекулярных форм аАГП-1, аАГП-2 и аАГП-3



ВЭЖХ 0,1 нмоль АМК-ОС на Ultrasphere ODS в 12% CH_3CN (а — АМК-олигосахариды аАПТ; б — аАПТ-1; в — аАПТ-2; г — аАПТ-3) и схематическая структура АМК-ОС (д)

показал их сходство с тремя аналогичными формами НАГП ([18], табл. 2) по содержанию углеводных цепей разной антенности (АМК-ОС (5), (7) и (9) на рисунке, б—г, и в табл. 2). Содержание цепей оценивали флуориметрически, считая, что общее количество их в АГП равно пяти: минимальное количество диантенных цепей было в аАГП-1 (менее 1 цепи на 1 моль АГП, рисунок, б), максимальное (не менее 3 цепей на 1 моль АГП) — в аАГП-3 (рисунок, г); аАГП-2 имел две диантенные цепи на 1 моль (рисунок, в, АМК-ОС (9)). Соотношение четырех- и трехантенных цепей между собой (АМК-ОС (5) и (7)) было близко 1:1 для всех трех форм (табл. 2).

Сравнение полученных данных о содержании асиалоолигосахаридов в различных формах аАГП с таковыми в НАГП [18] показывает (табл. 2) их расхождение по двум параметрам. Во-первых, наличие в аАГП заметных количеств четырех-, трех- и двухантенных монодегалактоолигосахаридов (АМК-СО (6), (8) и (11)) (у одного из больных таких ОС в сумме до 20%), в то время как в составе НАГП обнаруживались лишь следы подобных ОС (до 3%). Агалакто-ОС содержались во всех трех формах аАГП, хотя и в разном соотношении; наибольшее их количество наблюдалось в четырехантенных цепях (табл. 2).

Вторым различающим параметром является содержание фукозилированных ОС. Хотя количество фукозилированных ОС как в НАГП [18], так и в аАГП [9] в целом было невелико, следует отметить, что в молекулярных формах аАГП содержание олигосахаридов (10) и (12), несущих фрагмент Le^x на четырех- и трехантенных цепях, было заметно выше, чем в НАГП (табл. 2). Небольшое количество диантенного ОС с фукозой в коре (АМК-ОС (13)) содержалось как в НАГП, так и в аАГП. В то же время ни в НАГП, ни в аАГП нами не обнаружены олигосахариды с несколькими фрагментами Le^x , найденные недавно в АГП крови онкобольных [20].

Таким образом, детальный анализ структуры углеводных цепей разных препаратов АГП и его молекулярных форм выявляет несколько возможных факторов макро- и микрогетерогенности, которые могут влиять на взаимодействие гликопротеина с клетками: 1) степень разветвленности (антенность) углеводных цепей, которая определяет конформацию самих углеводных цепей и, вероятно, влияет на конформацию всей молекулы АГП; 2) количество остатков Neu5Ac и, по-видимому, их презентация углеводными цепями разной антенности, а также тип связи с остатками Gal ($\alpha 2-3$ или $\alpha 2-6$ в аАГП); 3) повышенное содержание фрагментов Le^x и, следовательно, Neu5Ac- Le^x в некоторых формах аАГП; 4) присутствие асиалоагалактоолигосахаридов в аАГП (см. табл. 2).

Последний фактор может быть весьма существенным для проявления иммуномодулирующих свойств АГП, поскольку, с одной стороны, аАГП и его молекулярные формы отличаются по иммуносупрессивной активности от НАГП [15], а с другой — показано, что НАГП, углеводные цепи которого подвергнуты десиаилированию и дегалактозилированию *in vitro*, обладает более высокой иммуносупрессивной активностью [21]. Поскольку сиаилированная форма Le^x является лигандом селектинов — молекул, участвующих в адгезии нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток при острофазном ответе [22, 23], изменение экспрессии Neu5Ac- Le^x на АГП влияет на его способность ингибировать селектинопосредованное взаимодействие лейкоцитов с другими клетками при острофазном ответе [12, 22]. Это, в свою очередь, влияет на иммуномодулирующие свойства АГП и развитие острофазного ответа [22, 23].

В заключение следует отметить, что выявленные изменения в структуре углеводных цепей аАГП по сравнению с НАГП могут быть обусловлены несколькими факторами. Так, различия в соотношении четырех-, трех- и двухантенных N-цепей связаны, по-видимому, с иным соотношением молекулярных форм АГП в асците: увеличение содержания диантенных цепей коррелирует с увеличением содержания Соп-А-связываемых форм АГП (аАГП-2 и аАГП-3). Изменения в фукозилировании и сиаилировании аАГП обусловлены, по-видимому, экспрессией (и специфичностью) соответствующих гликозилтрансфераз и гликозидаз в гепатоцитах онкобольных [22]. Степень галактозилирования углеводных цепей аАГП может меняться в зависимости от активности и экспрессии соответствующих галактозилтрансфераз в

гепатоцитах. В то же время нельзя забывать, что кроме АГП гепатоцитов, циркулирующих в крови, в асцит, вероятно, попадает АГП лейкоцитов и опухолевых клеток, различающиеся характером гликозилирования [10, 24]. Однако оценить вклад последних трудно из-за отсутствия необходимых данных о структуре их углеводных цепей.

Экспериментальная часть

Использовали те же реактивы и оборудование, что и в работах [9, 18]; моноспецифическую антисыворотку к АГП (Boehringerwerke); аналитические колонки Ultrasphere ODS (4,6 × 250 мм, Beckman) и TSK Gel G 2000 SW (7,5 × 300 мм, Altex); хроматографические системы: 12% CH₃CN в H₂O (А), градиент 7—12% CH₃CN в H₂O с 0,1% трифторуксусной кислоты (Б) (1 мл/мин, 25° С) и 7% водный этанол (0,2 мл/мин, 30° С) (В).

SDS-электрофорез, ВЭЖХ, получение олигосахаридов и их АМК-производных проводили как в работах [9, 18]. Содержание белка определяли по методу Брэдфорда [25], углеводов — фенол-сернокислотным методом [26], сиаловые кислоты — тиобарбитуратным методом [27]; использовали микромодификации методов согласно [9, 18].

аАГП выделяли из асцитной жидкости больных раком желудка III—IV стадии (низкодифференцированная аденокарцинома желудка, пул от 4 больных) как описано в работе [9]. 10 мг аАГП разделяли на молекулярные формы хроматографией на колонке (0,6 × 6 см) с Соп-А-сефарозой 4В (Pharmacia), уравновешенной 0,02 М трис-НСl-буфером, рН 7,2, с 0,15 М NaCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MnCl₂ и 1 мМ MgCl₂ аналогично работе [18]; аАГП-1 элюировали 10 объемами этого буфера; аАГП-2 — 0,15 М α-метилманнозидом (Sigma) в этом буфере; аАГП-3 элюировали 0,1 М Na-ацетатным буфером (рН 3,0) (на холоду); α-метилманнозид удаляли гель-фильтрацией на биогеле Р-2 (1,5 × 40 см, Bio-Rad); в 0,5% АсОН; полученные фракции диализовали и лиофилизовали.

Для определения моносахаридного состава пробу, содержащую 0,05—0,1 нмоль олигосахарида, гидролизовали смесью 4 н. ТФА — НСl (1 : 1), ре-*N*-ацетилировали уксусным ангидридом в смеси пиридина с метанолом (5 : 1 : 50) как в работе [9], превращали в АМК-производные и анализировали офВЭЖХ аналогично работе [18].

Ферментативное дегликозилирование проводили при 37° С в 0,1 М Na-ацетатном буфере в течение суток; брали 0,01 ед. акт. фермента на 0,1 нмоль олигосахарида в 50 мкл буфера: АМК-ОС (5)—(9) и (11) обрабатывали β-галактозидазой *jeak bean* при рН 3,5, β-гексозаминидазой *jeak bean* при рН 4,5; АМК-ОС (10), (12) и (13) инкубировали с α-фукозидазой почки быка при рН 6,5; обрабатывали и анализировали как в работах [9, 18].

Работа субсидирована грантом Российского фонда фундаментальных исследований 93-04-6256.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bone G., Lauder I. // Brit. J. Cancer. 1974. V. 30. P. 215—221.
2. Cooper E. H., Stone J. // Adv. Cancer Res. 1979. V. 30. P. 1—43.
3. Алешкин В. А., Новикова Л. И., Лютов А. Г., Алешкина Т. Н. // Клин. медицина. 1988. Т. 8. С. 39—48.
4. Rudman D., Treadwell P. E., Vogler W. R., Howard C. H., Hollins B. // Cancer Res. 1972. V. 32. P. 1951—1959.
5. Hansen J.-E. S., Larsen V. A., Bog-Hansen T. C. // Clin. Chem. Acta. 1987. V. 138. № 1. P. 41—47.
6. Bog-Hansen J. E., Bog-Hansen T. C., Pederson P., Neland K. // Electrophoresis. 1989. V. 10. P. 574—578.
7. Biou D., Konan D., Feger J., Agneray J., Leroy Y., Cardon P., Fournet B., Duran G. // Biochim. et biophys. acta. 1987. V. 913. P. 308—312.
8. Новикова Л. И., Алешкин В. А. // Лабор. дело. 1991. Т. 6. С. 3—10.

9. Shiyani S. D., Nasonov V. V., Bovin N. V., Novikova L. I., Aleshkin V. A., Lyutov A. G.//Exp. Onkol. 1993. V. 15. N 5. P. 53—61.
10. Chandrasekaran E. V., Davila M., Nixon D., Mendicino D.//Cancer Res. 1984. V. 44. P. 1557—1567.
11. Treuheit M. J., Halsall H. B.//Chromatographie. 1993. V. 35. P. 90—92.
12. De Graaf T. W., Van der Stelt M. E., Anbergen M. G., van Dijk W.//J. Exp. Med. 1993. V. 177. P. 657—666.
13. Fujii M., Takahashi N., Hayashi H., Matsunaga K., Yoshimi C.//Clin. Biochem. 1987. V. 20. P. 183—189.
14. Fujii M., Takahashi N., Hayashi H., Furusho T., Matsunaga K., Yoshikumi C.//Anticancer Res. 1988. V. 8. P. 303—306.
15. Shiyani S. D., Nasonov V. V., Bovin N. V., Medvedev A. E.//Exp. Oncol. 1993. V. 15. № 2. P. 46—50.
16. Pos O., Oostendorf R. A. J., Van der Stelt M. E., Scheper R. J.//Inflammation. 1990. V. 14. № 2. P. 133—141.
17. Shiyani S. D., Nasonov V. V., Bovin N. V., Novikova L. I., Aleshkin V. A.//Glycoconj. J. 1991. V. 8. № 3. P. 188.
18. Шиян С. Д., Насонов В. В., Бовин Н. В., Новикова Л. И., Алешкин В. А.//Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 663—670.
19. Sokolov K. V., Byramova N. E., Mochalova L. V., Tuzikov A. B., Shiyani S. D., Bovin N. V., Nabiev I. R.//Applied Spectroscopy. 1993. V. 47. P. 535—538.
20. De Graaf T. W., Van der Stelt M. E., Anbergen M. G., van Dijk W.//J. Exp. Med. 1993. V. 177. P. 657—666.
21. Bennet M., Schmid K.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 6109—6113.
22. Walz G. A., Aruffo A., Kolanus W., Bevilacqua M., Seed B.//Science. 1990. V. 250. P. 1132—1135.
23. Lasky L. A.//J. Cell. Biochem. 1991. V. 45. P. 139—146.
24. Gahmberg C. G., Anderson L. C.//J. Exp. Med. 1978. V. 148. P. 507—521.
25. Bradford M.//Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.
26. Du Bois M., Gilles K. S., Hamilton J. K., Smith F.//Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350—356.
27. Warren L.//J. Biol. Chem. 1959. V. 234. P. 1971—1975.

Поступила в редакцию 20.IX.1993

После доработки 17.XII.1993

*S. D. Shiyani, V. V. Nasonov, N. V. Bovin, **
V. A. Aleshkin, L. I. Novikova*, A. G. Lutov*

STRUCTURES OF THE CARBOHYDRATE CHAINS OF THE MOLECULAR FORMS OF α_1 -ACID GLYCOPROTEIN FROM ASCITIC FLUID OF STOMACH CANCER PATIENTS

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

**G. N. Gabrichevski Institute of Epidemiology and Microbiology, Health Ministry
of Russian Federation, Moscow*

Key words: α_1 -acid glycoprotein, stomach cancer, structure of the carbohydrate chains.

The immunochemically pure α_1 -acid glycoprotein (aAGP) from ascitic fluid of patients with stomach cancer was separated by chromatography on Con A—Sephacrose into Con A—nonbound (aAGP-1, 43, 5 kDa, 70%) and Con A—bound (aAGP-2, 41,5 kDa, 24% and aAGP-3, 40,0 kDa, 5%) forms, differing in the monosaccharide composition. Comparative study of structures of their N-carbohydrate chains with the aid of the HPLC of fluorescence-labelled oligosaccharides showed that the molecular forms differ by the ratio of the di-, tri-, and tetraantennary carbohydrate N-chains of a complex type. The molecular forms of aAGP differ from nAGP by amounts of Le^x-fragments and agalacto-oligosaccharides.

Address: S. D. Shiyani, 117871 GSP-7, Moscow V-437, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences;
*125212 Moscow, ul. Admirala Makarova, 10, Institute of Epidemiology and Microbiology, Health Ministry of Russian Federation.