



УДК 577.112.853:547.963.1.06

РАСЩЕПЛЕНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ БОРГИДРИДА ЛИТИЯ. ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ *O*-ГЛИКОПЕПТИДОВ С ВОССТАНОВЛЕННОЙ *C*-КОНЦЕВОЙ АМИНОКИСЛОТОЙ

© 2000 г. Н. П. Арбатский[#], Л. М. Лихошерстов, М. В. Серебрякова*, О. С. Брусов*,
В. Н. Шibaев, В. А. Деревицкая, Н. К. Кочетков

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913, Москва, Ленинский просп., 47;

* Всероссийский центр психического здоровья РАМН, 113152, Москва, Загородное шоссе, 2, кор. 2

Поступила в редакцию 11.05.99 г. Принята к печати 20.09.99 г.

На примере фетуина и группоспецифического гликопротеина показано, что в условиях восстановительного расщепления гликопротеинов под действием $\text{LiBH}_4\text{-LiOH}$ в 70% водном *трет*-бутиловом спирте восстановление амидных связей и их разрыв протекают значительно быстрее, чем β -элиминирование *O*-гликанов, связанных с остатками серина и треонина в пептидной цепи. Главные продукты деградации, содержащие *O*-связанные гликаны, имеют структуру *O*-гликозильных производных 2-аминопропан-1,3-диола и 2-аминобутан-1,3-диола (продуктов восстановления гликозилированных серина и треонина) и гликопептидов, содержащих 2–4 а.о. с восстановленной *C*-концевой аминокислотой. Описано разделение *O*-гликопептидов ионообменной хроматографией и обращенно-фазовой ВЭЖХ с выделением 17 индивидуальных гликопептидов и установление их структуры с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии и анализа аминокислот, аминокислот и углеводов. Обсуждаются возможности использования реакции для характеристики *O*-гликанов в *O*- и *N,O*-гликопротеинах и локализации сайтов *O*-гликозилирования.

Ключевые слова: *O*-гликопротеины; сайты *O*-гликозилирования; *O*-гликопептиды, анализ; хроматография, MALDI-TOF-масс-спектрометрия.

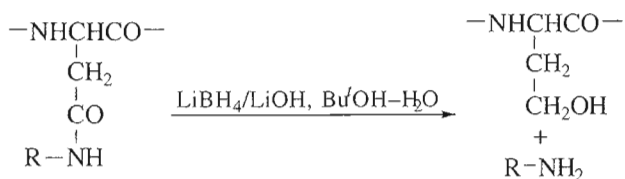
Подавляющее число клеточных и секреторных белков содержит ковалентно связанные углеводные фрагменты, выполняющие различные функции: от контроля за правильной укладкой вновь синтезируемого белка до регуляции его катаболизма [1]. Для выяснения роли углеводных фрагментов и их влияния на свойства белка важно знать их точную структуру и место расположения в молекуле белка. Первая задача решается обычно путем отщепления углеводных цепей химическими [2, 3] или ферментативными [4, 5] методами и исследования полученных олигосахаридов с помощью хроматографии [6, 7], масс-спектрометрии [8–10] и ЯМР-спектроскопии [11, 12]. Для решения второй задачи гликопротеин, как правило, подвергают фрагментации протеолитическими ферментами (проназа, трипсин и т.п.), образующиеся гликопептиды разделяют хроматографией и секвенируют, локализуя сайты *N*- и *O*-гликозилирования [13–17]. Эта процедура является по сути дела единственным способом установления положения цепи *O*-гликана, так как в отличие от строгих требований к структуре сайта *N*-гликозилирования (наличие фрагмента Asn-Xaa-Ser/Thr), последователь-

ность аминокислот вблизи сайта *O*-гликозилирования (обычно остатки серина и треонина) довольно разнообразна [18].

По своей химической природе *N*- и *O*-гликозидные связи существенно различаются, поэтому для отщепления *N*- и *O*-связанных гликанов используют разные методы. Наиболее часто применяемым методом отщепления *O*-гликанов является обработка гликопротеина разбавленной щелочью в присутствии NaBH_4 [2], приводящая с выходом 70–80% к восстановленным олигосахаридам с остатком *N*-ацетилгалактозаминита на конце. Для отщепления *N*-гликанов в большинстве случаев используют гидразинолиз [3]. Другой способ отщепления *N*-гликанов, разработанный Н.К. Кочетковым с сотр. [19, 20], заключается в восстановительном расщеплении гликопротеина под действием $\text{LiBH}_4/\text{LiOH}$ в водно-органической среде (схема 1).

В обоих случаях первоначально образующиеся гликозилгидразины (или соответственно гликозиламины) олигосахаридов превращаются в кислой среде в восстанавливающие олигосахариды, которые затем либо восстанавливают до полиолов, либо переводят в удобные для анализа производные [6, 21].

[#] Автор для переписки (e-mail: shiba@ioc.ac.ru; факс: (095) 135-53-28).



R = остаток гликана

Схема 1.

Полученные при деградации различных *N*-гликопротеинов действием $\text{LiBH}_4/\text{LiOH}$ результаты показывают, что полипептидная цепь при этом расщепляется, а выход олигосахаридов составляет 70–80% [22–24]. Что происходит в этих условиях с *O*-связанными углеводами оставалось неясным, однако некоторые данные позволяли предполагать, что *O*-гликаны не элиминируются, а остаются связанными с пептидами.

В качестве объекта для более детального изучения различий в поведении *N*- и *O*-гликанов при деградации гликопротеинов $\text{LiBH}_4/\text{LiOH}$ и установления структуры продуктов реакции нами выбран фетуин тельенка, молекула которого содержит три *N*-связанные и три *O*-связанные углеводные цепи, типичные примеры их структуры [12, 25] приведены на схеме 2. Кроме того, в качестве примера *O*-гликопротеина муцинового типа мы использовали группоспецифический гликопротеин Н (ГСГ-Н) из слизистой желудка свиньи, углеводные цепи которого подробно охарактеризованы нами ранее [26, 27].

Целью первого этапа работы была оценка соотношения отщепляющихся и остающихся связанными с пептидами *N*- и *O*-цепей гликопротеинов. Обработку фетуина $\text{LiBH}_4/\text{LiOH}$ проводили в условиях, применявшихся нами ранее для отщепления *N*-связанных цепей гликопротеинов [19, 20]. Продукты реакции после обессоливания гель-хроматографией на сефадексе G-15 разделяли на колонке с дауэксом 50W × 2 (H^+) на олигосахаридную (А) и гликопептидную (В) фракции последо-

вательной элюцией 1% AsON и 1 М NH_4OH . Каждую из этих фракций хроматографировали далее на сефадексе G-25 (рис. 1) и в полученных фракциях определяли (после гидролиза аликвот) содержание углеводов, аминокислот и аминокспиртов.

Поскольку *N*-гликаны по размеру значительно больше *O*-гликанов, они достаточно хорошо отделяются при гель-хроматографии. Результаты анализа фракций (табл. 1) подтверждают это: основное количество глюкозамина и маннозы (87 и 93% соответственно), характерных для *N*-гликанов моносахаридов, находится в более высокомолекулярных фракциях АI и ВI, а галактозамин, содержащийся только в *O*-гликанах, обнаруживается преимущественно (вместе с галактозаминитом – 94%) во фракциях АII и ВII. Невысокое по сравнению с глюкозамином содержание глюкозаминита и практически полное отсутствие аминокислот во фракции АI показывает, что она содержит преимущественно восстанавливающие олигосахариды. По сравнению с фракцией АI во фракции ВI присутствует в 4 раза меньше глюкозаминита, но значительно больше аминокислот (2.7 остатка на углеводную цепь), т.е. *N*-гликаны в этой фракции находятся, в основном, в виде гликопептидов. Таким образом, деградация фетуина сопровождается отщеплением ~75% *N*-связанных гликанов (фракция АI) и только 15–20% *N*-цепей остается в виде *N*-гликопептидов (фракция ВI). Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными нами ранее [22–24] при деградации различных *N*-гликопротеинов.

Более низкомолекулярные *O*-гликаны фетуина, судя по содержанию галактозамина и галактозаминита (табл. 1), находятся во фракциях АII и ВII. Соотношение галактозамин/галактозаминит во фракции АII равно ~1 : 6 и, таким образом, большая часть *O*-гликанов в этой фракции (~85%) находится в виде восстановленных олигосахаридов. Во фракции ВII содержится сравнительно небольшое количество галактозаминита (галактозамин/галактозаминит ~15 : 1), а суммарное содержание аминокислот равно ~4 моль в

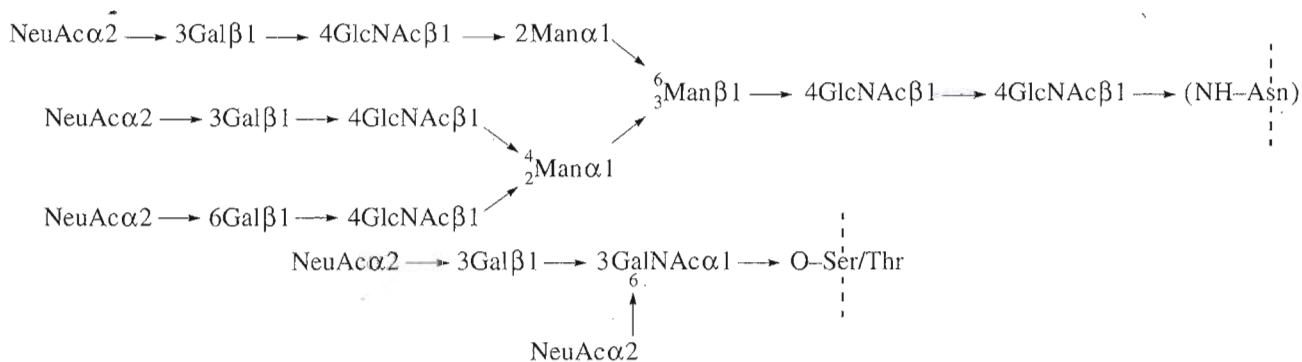


Схема 2.

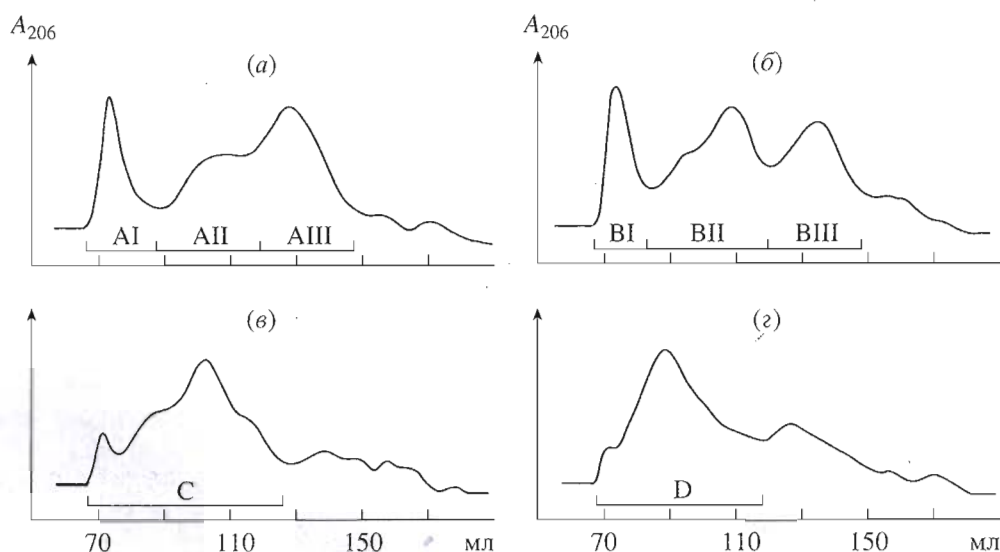


Рис. 1. Хроматография олигосахаридных (а, в) и гликопептидных (б, г) фракций, полученных из фетуина (а, б) и ГСГ-Н (в, г) на колонке (1.5 × 100 см) с сефадексом G-25. Элюент – вода.

расчете на 1 моль галактозамина. Это показывает, что основными компонентами фракции ВII являются *O*-гликопептиды. Фракции АIII и ВIII, содержащие лишь следы сахаров (менее 2% общего содержания) и очень большое количество аминокислот, очевидно, представляют собой пептиды и продукты деградации углеводных цепей. Таким образом, из приведенных данных следует, что при восстановительном расщеплении *O*-гликаны в

отличие от *N*-гликанов в основном остаются связанными с пептидом.

Переходя к рассмотрению результатов восстановительного расщепления ГСГ-Н, необходимо отметить существенные отличия этого гликопротеина от фетуина. Полипептидная цепь ГСГ-Н составляет лишь ~20% общей массы гликопротеина и состоит из ~60% из остатков треонина, серина и пролина, т.е., в среднем, представляет собой повторяющиеся пентапептиды с общим составом

Таблица 1. Распределение углеводов (%)* в олигосахаридных (А, С) и гликопептидных (В, D) фракциях после хроматографии продуктов расщепления фетуина и ГСГ-Н на сефадексе G-25

Фракция	GlcN	GlcN-ol	GalN	GalN-ol	Gal	Man	Аминокислоты**
Фетуин							
AI	71	2.9	0.6	0.3	62	79	0.5
AII	3.1	0.6	2.1	12	3.0	2.3	1.1
AIII	1.2	0.2	0.8	0.6	2.2	1.1	***
BI	16	0.7	0.8	0.1	15	14	2.7
BII	2.5	0.2	75	4.8	16	2.8	3.9
BIII	1.5	0.1	2.2	0.7	1.8	0.8	***
Сумма	95.3	4.7	81.5	18.5	100	100	
ГСГ-Н							
С	21	–	6	17	18	–	0.2
D	79	–	68	9	82	–	1.8
Сумма	100		74	26	100		

* Для каждого моносахарида его суммарное содержание в анализируемых фракциях принято за 100% (т.е. GlcN + GlcN-ol, GalN + GalN-ol, Gal, Man). *N*-Ацетилнейраминная кислота не определялась.

** Мольное соотношение (аминокислоты + восстановленные аминокислоты) на 3 моль маннозы (для фракций AI и BI) или на 1 моль галактозамина (для остальных фракций).

*** Соотношение не определено из-за низкого содержания сахаров.

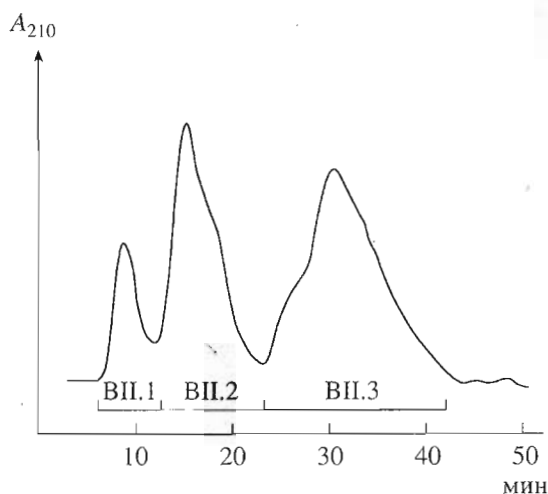


Рис. 2. ВЭЖХ фракции VII (рис. 1) на колонке (10 × 250 мм) с DEAE-силасорбом. Элюент – 15 мМ К-фосфат pH 5.1.

(Хаа)₂Thr₁Pro₁Ser₁ [28]. Почти каждый из остатков треонина и серина несет *O*-связанную углеводную цепь, которая включает от 2 до 15 и более моносахаридных остатков (*N*-ацетилглюкозамин, галактоза, фукоза), но все *O*-гликаны содержат только один остаток *N*-ацетилгалактозамина, связанный непосредственно с треонином или серином [26, 27]. Гликопротеин с такой структурой предоставляет возможность выяснить особенности протекания восстановительного расщепления в том случае, когда углеводные фрагменты расположены на пептидной цепи близко друг к другу, т.е. образуют кластеры.

ГСГ-Н обрабатывали LiBH₄/LiOH в тех же условиях, что и фетуин, продукты реакции обессоливали и хроматографией на даэксе 50W × 2 (H⁺) получали олигосахаридную (С) и гликопептидную (D) фракции. Гель-хроматография этих фракций на сефадексе G-25 показала, что полипептидная цепь ГСГ-Н полностью расщепляется, поскольку по молекулярно-массовому распределению гликопептиды (рис. 1з) мало отличались от олигосахаридов (рис. 1в). При взятом за 100% суммарном количестве галактозамина и галактозаминита во фракциях С и D, содержание каждого из них во фракции С составило 6 и 17% соответственно, а во фракции D – 68 и 9% (табл. 1). Присутствие галактозаминита в гликопептидной фракции D связано, очевидно, с *N*-деацетилированием олигосахаридов, в результате чего они задерживаются на катионите. Эта побочная реакция при деградации ГСГ-Н протекает заметно интенсивнее, чем при деградации фетуина, поскольку *O*-гликаны ГСГ-Н содержат большое число остатков *N*-ацетилглюкозамина, способных к *N*-деацетилированию. Анализ аминокислот, серинола (2-аминопропан-1,3-диола) и треонинола (2-ами-

нобутан-1,3-диола) показал, что соотношение (сумма аминокислот и восстановленных аминокислот)/галактозамин равно 1.8 (табл. 1), из чего можно заключить, что главными компонентами фракции D являются гликопептиды с пептидной частью в виде Хаа-Ser-ol/Thr-ol, где Хаа представлена, в основном, пролином, аланином или α-аминомасляной кислотой – продуктом восстановления α-аминоакриловой кислоты, образующейся после β-элиминирования *O*-гликана с остатка треонина [29].

Таким образом, как в случае одиночных *O*-связанных углеводных цепей (фетуин), так и при кластерном их расположении на белке (ГСГ-Н), обработка гликопротеина LiBH₄/LiOH в водно-органической среде приводит лишь к небольшому (на 20–25%) элиминированию *O*-гликанов, тогда как основная часть их остается связанной с остатками серина и треонина. Этот результат коренным образом отличается от результатов деградации *O*-гликопротеинов под действием NaBH₄/NaOH в воде, когда более 70% *O*-гликанов отщепляется и превращается в восстановленные олигосахариды [26, 27].

Для более подробной характеристики *O*-гликопептидов, образующихся при расщеплении фетуина, описанная деградация была проведена на большем количестве гликопротеина. Олигосахаридную и гликопептидную фракции получали аналогично описанному выше с использованием колонок большего размера для ионообменной и гель-хроматографии. Результаты анализа фракций в целом не отличались от полученных в аналитических опытах: около 73% *N*-гликанов было выделено в виде олигосахаридов и ~78% *O*-гликанов – в виде гликопептидов. Помимо обнаруженных ранее моносахаридов, фракция VII содержит *N*-ацетилнейраминную кислоту; соотношение *N*-ацетилнейраминная кислота/галактоза/галактозамин/аминокислоты составляет ~1.3 : 0.9 : 1.0 : 2.3. Главными среди аминокислот являются серин, пролин, аланин и треонин, причем часть их находится в виде аминокислот – серинола, треонинола и аланинола (данные не приведены). Это позволяет заключить, что полученные *O*-гликопептиды имеют общую формулу: NeuAc₁₋₂-Gal-GalNAc(пептид), где пептид содержит 1–2 а.о. и остаток восстановленной аминокислоты на C-конце.

С целью выделения индивидуальных *O*-гликопептидов фракцию VII подвергали дополнительному фракционированию. Первоначально хроматографией на DEAE-силасорбе гликопептиды разделяли на несалилированные, моно- и дисалилированные гликопептиды (фракции VII.1, VII.2 и VII.3 соответственно, рис. 2). Наличие сиаловой кислоты во фракциях VII.2 и VII.3 подтверждено аналитическими опытами по десалилированию, в результате которого пики, соответствующие этим фракциям исчезали, а продукты

реакции смывались с колонки DEAE-силасорб с фронтом растворителя, т.е. на месте выхода несиалилированных гликопептидов.

Фракции VII.1, VII.2 и VII.3 далее подвергали обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Zorbax C18 с элюцией разбавленными растворами CF₃COOH (рН 3.6–3.9). В подобранных нами оптимальных условиях удалось добиться эффективного разделения смесей гликопептидов (рис. 3). Выяснение состава выделенных гликопептидов было проведено с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии в режиме регистрации положительных ионов. Результаты масс-спектрометрического анализа, подтвержденные определением моносахаридов, аминокислот и аминокислот для главных компонентов смеси или качественной их идентификацией для минорных компонентов, позволяют (с учетом известной первичной структуры фетуина) предложить приводимые ниже структуры для полученных соединений (схема 3).

Необходимо отметить, что в использованных нами условиях ионизации и детекции (в рефлекто-режиме) происходило значительное десалилирование гликопептидов, в результате чего величина пиков, соответствующих исходным салилированным гликопептидам была гораздо меньше, чем величина пиков, соответствующих продуктам их десалилирования (рис. 4). Наряду с десалилированием происходило также декарбоксилирование салилированных гликопептидов, о чем свидетельствуют пик с m/z 823.6 [$M - \text{NeuAc} - \text{H} - \text{CO}_2 + \text{Na}$]⁺ в спектре десалилированного гликопептида (1) (рис. 4а) и пик с m/z 925.8 [$M - \text{CO}_2 + \text{Na}$]⁺ в спектре моносалилированного гликопептида (8) (рис. 4б). Интенсивное десалилирование и декарбоксилирование при MALDI-TOF-масс-спектрометрии салилосодержащих олигосахаридов и гликопептидов отмечалось и другими авторами [9, 30]. Несмотря на интенсивную деградацию, в спектрах всех гликопептидов имелись сигналы, соответствующие моносалилированным гликопептидам с двумя (или одним) атомами Na и десалилированным гликопептидам с тремя (или двумя) атомами Na (табл. 2).

Имеющиеся данные о первичной структуре фетуина [31] и химическом составе гликопептидов, полученных расщеплением фетуина проназой [25], показывают, что *O*-связанные цепи находятся при остатках Ser²⁵³, Thr²⁶² и Ser²⁶⁴, расположенных на коротком фрагменте из 12 остатков: ...-Ala-Pro-Ser²⁵³-Ala-Val-Pro-Asp-Ala-Ala-Gly-Pro-Thr²⁶²-Pro-Ser²⁶⁴-Ala-Ala-Gly-.... Полученные нами результаты согласуются с этими данными, подтверждая наличие двух Ser-сайтов гликозилирования с последовательностями -Pro-Ser-Ala-Val- и -Pro-Ser-Ala-Ala-Gly- и одного Thr-сайта с последовательностью -Pro-Thr-Pro-. Подавляющая часть *O*-гликанов фетуина содержит 1 или 2 ос-

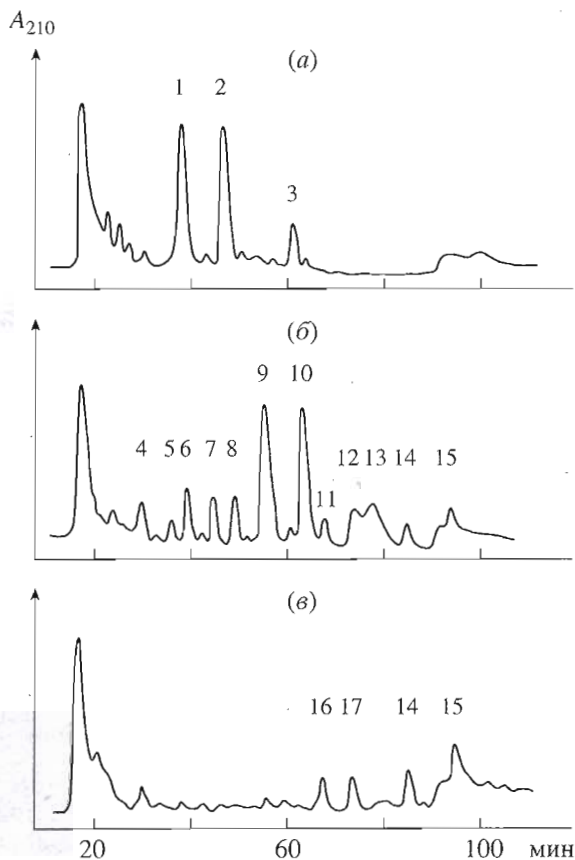


Рис. 3. ВЭЖХ на колонке (9.4 × 250 мм) Zorbax C18 фракций гликопептидов VII.3 (а), VII.2 (б) и VII.1 (в) в воде, подкисленной CF₃COOH до рН 3.6 (А) и 3.85 (В). Условия элюции: 10 мин – раствор А, скорость элюции 0.5 мл/мин, 35 мин – раствор В, 0.5 мл/мин; 15 мин – В, 1 мл/мин, 20 мин – В, 3 мл/мин, 40 мин – А, 3 мл/мин.

татка *N*-ацетилнейраминовой кислоты, причем десалилированный *O*-гликан (гликопептид (3)) находится только при Ser²⁵³ (но не Ser²⁶⁴), что подтверждает ранее полученные данные [25]. В то же время идентификация десалилированного гликопептида с пептидным фрагментом Pro-Thr (гликопептид (2)) противоречит выводу Спиро и сотр. [25] о том, что при треонине имеется только моносалилированный *O*-гликан; по данным ВЭЖХ количество моно- и десалилированных гликанов при Thr²⁶² примерно одинаково.

Приведенные выше результаты хроматографии и анализа *O*-гликопептидов открывают новые возможности в области исследования структуры гликопротеинов. Описанный метод деградации позволяет получать *N*- и *O*-связанные углеводные цепи *N,O*-гликопротеинов в виде легко разделяемых соединений – восстанавливающих олигосахаридов, образующихся из *N*-связанных гликанов, и *O*-гликопептидов с восстановленной *C*-концевой аминокислотой соответственно. Это значительно облегчает последующее фракционирование *N*- и

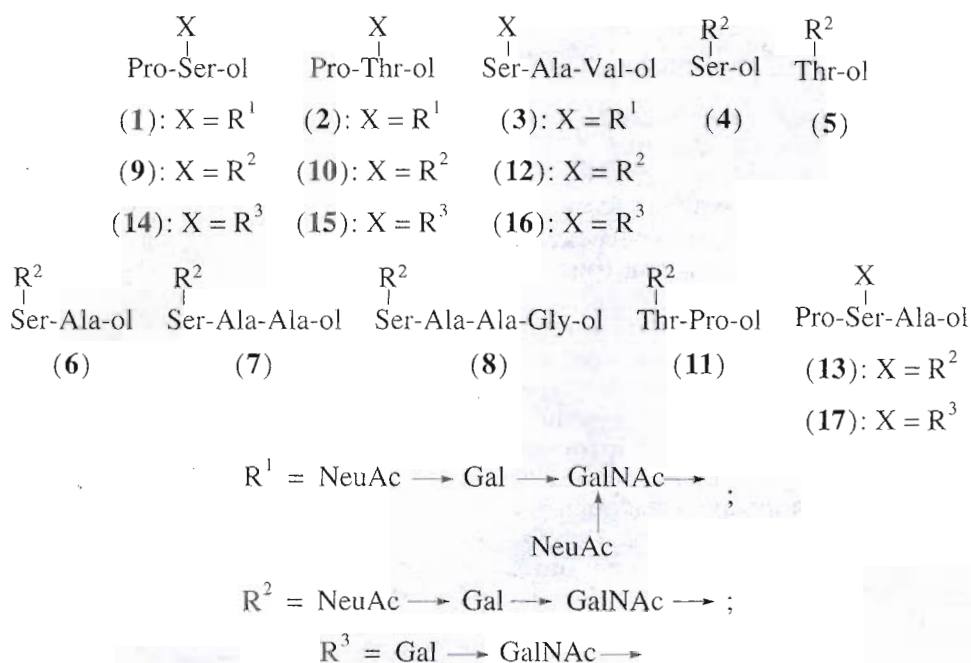


Схема 3.

O-гликанов и выделение индивидуальных компонентов с целью структурного анализа и дальнейшего использования. Важным обстоятельством является возможность превращения как *O*-гликопептидов (реакцией по NH_2 -группе), так и олигосахаридов (реакцией по CHO -группе), в производные, удобные для их разделения, анализа и получения неогликоконъюгатов.

Различное поведение в условиях описанной деградации *O*-гликозидной и *N*-гликозиламинидной связей, очевидно, объясняется тем, что реакция восстановительного расщепления амидной (пептидной) связи протекает значительно быстрее, чем реакция β -элиминирования. Вследствие этого образующиеся в результате первой реакции гликопептиды со свободной NH_2 -группой и/или восстановленной COOH -группой у остатков серина и треонина, несущих углеводную цепь, оказываются устойчивыми к β -элиминированию углеводной цепи. Тот факт, что главными продуктами реакции являются гликопептиды с последовательностью Pro-Ser/Thr, подтверждает ранее полученные данные о большей устойчивости этой пептидной связи в условиях восстановительного расщепления [20]. Можно надеяться, что дальнейшее изучение этой реакции позволит, изменяя условия, регулировать интенсивность расщепления пептидной цепи гликопротеина и получать гликопептиды с большим или меньшим числом аминокислотных остатков.

Одновременно с разделением смеси гликопептидов ионообменной хроматографией и ВЭЖХ возможна идентификация отдельных гликопеп-

тидов. Сравнение времени элюции полученных из фетуина *O*-гликопептидов (рис. 4, схема 3) дает лишь некоторое представление о влиянии отдельных аминокислот на хроматографическую подвижность, которая, очевидно, зависит от их полярности, а также от состава углеводного фрагмента. Подбирая в каждом отдельном случае оптимальные условия разделения смеси *O*-гликопептидов и имея достаточный набор свидетелей (гликопептидов с известной структурой), можно идентифицировать гликопептиды точно так же, как это показано нами для восстановленных олигосахаридов [7].

Масс-спектрометрический анализ *O*-гликопептидов (индивидуальных или в смеси) дает возможность определить их углеводный и аминокислотный состав. Однако наиболее часто применяемые в последнее время варианты масс-спектрометрии (ESI, MALDI) обычно не позволяют установить последовательность аминокислот в пептиде. Такую возможность дает тандемная масс-спектрометрия (MS/MS), применяющаяся для секвенирования пептидов [32, 33], а также PSD-MALDI- и нано-ESI-масс-спектрометрия [34, 35], но для секвенирования гликопептидов эти методы пока еще редко используются.

Установление структуры *O*-гликопептида, в том числе аминокислотной последовательности в гликопептиде, содержащем 2–4 а.о. позволяет локализовать сайт *O*-гликозилирования в белке. Вывод о последовательности аминокислот в восстановленном *O*-гликопептиде, включающем 2 а.о., следует непосредственно из результатов аминокис-

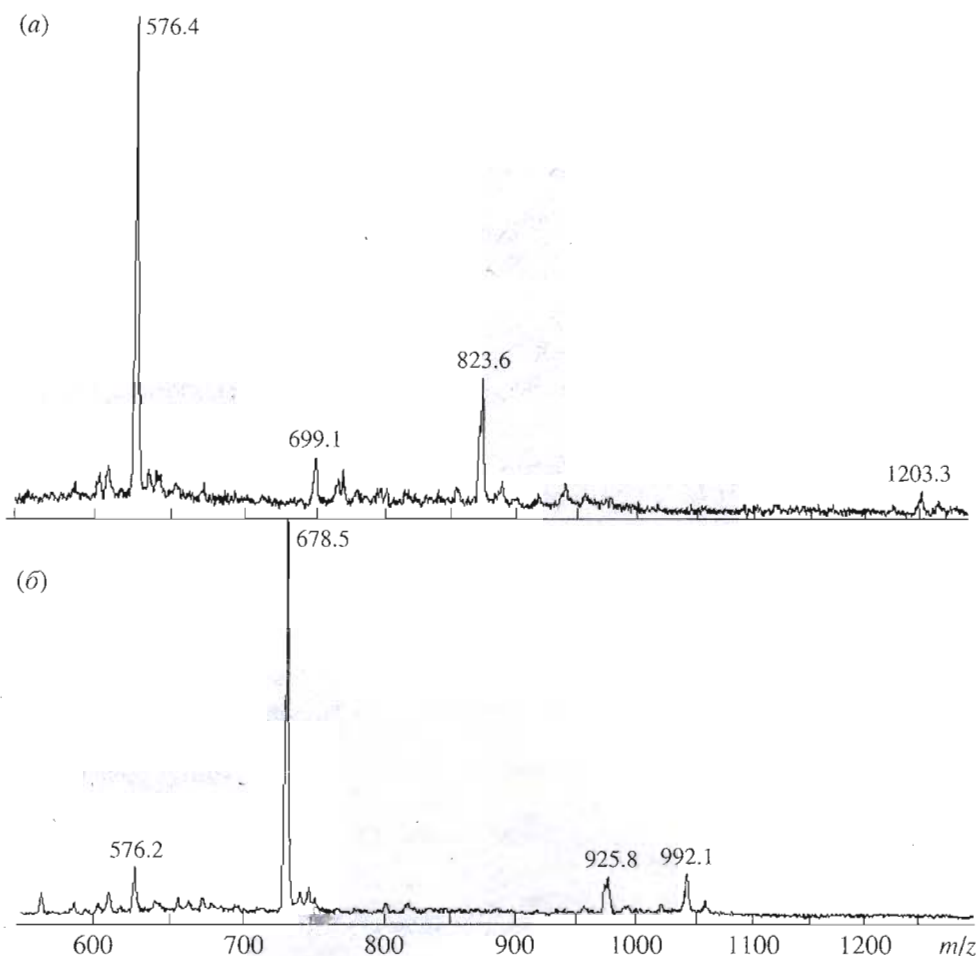


Рис. 4. Фрагменты MALDI-TOF-масс-спектров гликопептидов (1) и (8) (см. рис. 3).

кислотного анализа – идентификации аминокислоты и восстановленной аминокислоты. Для решения вопроса о структуре пептидного фрагмента в гликопептидах с тремя и более остатками аминокислот требуется проведение его *N*-концевого анализа. В то же время есть основания полагать, что изомерные по аминокислотной последовательности гликопептиды могут быть разделены ВЭЖХ; примером этому являются гликопептиды (10) и (11). Таким образом, при наличии данных о первичной структуре белка установление с помощью ВЭЖХ, масс-спектрометрии и аминокислотного анализа структуры одного или нескольких *O*-гликопептидов в продуктах расщепления позволяет локализовать сайт *O*-гликозилирования без фрагментации гликопротеина и секвенирования гликопептидов.

Описанный в данной работе подход к характеристике *O*-гликанов, вероятно, применим и к гликопротеинам, содержащим в узле углевод-пептидной связи остаток *N*-ацетилглюкозамина (ядерные белки), маннозы (маннопротеины), ксилоты (протеогликаны) и другие моносахариды.

Хроматографический и масс-спектрометрический анализ образующихся гликопептидов, в принципе, позволяет одновременно охарактеризовать типы *O*-связанных углеводных цепей в гликопротеине, выявить степень гетерогенности *O*-гликанов в каждом отдельном сайте и локализовать сайты *O*-гликозилирования. Полученные данные могут оказать большую помощь в структурных исследованиях гликопротеинов, разработке новых методов анализа *O*-гликанов и возможностей их использования в качестве исходных соединений для синтеза конъюгатов с углеводными лигандами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали фетуин (тип III) из сыворотки теленка (Sigma) и ГСГ-Н из слизистой желудка свиньи, полученный и охарактеризованный ранее [26, 27].

Анализ углеводов проводили после гидролиза 3 М CF_3COOH (110°C, 4 ч) на жидкостном хроматографе Biotronik LC 2000 (ФРГ) на колонке (4 ×

Таблица 2. Характерные ионы в MALDI-TOF-масс-спектрах гликопептидов, выделенных офВЭЖХ из фетуина (рис. 3)

Гликопептид	m/z^*
(1)	1203.3 ($[M-2H+3Na]^+$, 1203.0); ~890 ($[M-NeuAc-H+2Na]^+$, 888.8); 823.6 ($[M-NeuAc-H-CO_2+Na]^+$, 822.8); 576.2 ($[M-2NeuAc+Na]^+$, 576.6)
(2)	1216.0 ($[M-2H+3Na]^+$, 1217.0); ~1195 ($[M-H+2Na]^+$, 1195.0); ~948; 926.2; ~904 ($[M-NeuAc-H+2Na]^+$, 902.8); ~895; 882.1 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 880.8); ~837 ($[M-NeuAc-CO_2+Na]^+$, 836.8); 590.3 ($[M-2NeuAc+Na]^+$, 589.5); 559.0; ~537
(3)	1276.4 ($[M-2H+3Na]^+$, 1276.1); ~1254 ($[M-H+2Na]^+$, 1254.1); 895.7 ($[M-NeuAc-H-CO_2+Na]^+$, 895.9); 649.8 ($[M-2NeuAc+Na]^+$, 649.6); 617.5; 559.4; 536.8
(4)	883.3; 793.3 ($[M-H+2Na]^+$, 792.7); ~770 ($[M+Na]^+$, 770.7); ~744; ~725 ($[M-CO_2+Na]^+$, 726.7); 529.5; 513.4; 479.2 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 479.4)
(5)	881.9; ~807 ($[M-H+2Na]^+$, 806.7); ~741 ($[M-CO_2+Na]^+$, 740.7); 595.3; 493.8 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 493.4)
(6)	863.1 ($[M-H+2Na]^+$, 863.8); 841.2 ($[M+Na]^+$, 841.8); 796.4 ($[M-CO_2+Na]^+$, 796.8); 550.4 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 550.5)
(7)	935.2 ($[M-H+2Na]^+$, 934.8); 913.2 ($[M+Na]^+$, 912.8); 869.0 ($[M-CO_2+Na]^+$, 868.8); 621.6 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 621.5); 559.1
(8)	992.1 ($[M-H+2Na]^+$, 991.9); 925.8 ($[M-CO_2+Na]^+$, 925.9); 678.5 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 678.6); 576.2
(9)	889.7 ($[M-H+2Na]^+$, 889.8); 867.8 ($[M+Na]^+$, 867.8); 822.7 ($[M-CO_2+Na]^+$, 823.8); 576.3 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 576.5)
(10)	903.9 ($[M-H+2Na]^+$, 903.8); 882.0 ($[M+Na]^+$, 881.8); 836.7 ($[M-CO_2+Na]^+$, 837.8); 590.4 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 590.5)
(11)	993.3; 903.1 ($[M-H+2Na]^+$, 903.8); 896.7; 880.9 ($[M+Na]^+$, 881.8); ~837 ($[M-CO_2+Na]^+$, 837.8); ~745; 590.1 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 590.5)
(12)	~962 ($[M-H+2Na]^+$, 962.9); 941.2 ($[M+Na]^+$, 940.9); ~939; ~896 ($[M-CO_2+Na]^+$, 896.9); 893.1; ~715; 649.5 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 649.6); ~647
(13)	~960 ($[M-H+2Na]^+$, 960.9); 939.3 ($[M+Na]^+$, 938.9); ~894 ($[M-CO_2+Na]^+$, 894.9); 866.8; 649.4; ~647 ($[M-NeuAc+Na]^+$, 647.6)
(14)	576.3 ($[M+Na]^+$, 576.5); 592.3 ($[M+K]^+$, 592.6)
(15)	590.5 ($[M+Na]^+$, 590.5); 513.3
(16)	784.4; 762.2; 649.5 ($[M+Na]^+$, 649.6); 575.9
(17)	756.3; 625.2 ($[M+H]^+$, 625.6); 559.2; 537.4

* Наблюдаемые значения, расчетные значения для ионов предполагаемой структуры приведены в скобках.

× 120 мм) с DA × 8 (Durrum, США) в 0.3 М боратном буфере pH 8.2; детекция реакцией с Cu-бицинхонинатом. Аминокислоты, аминоксахара и аминокспирты определяли после гидролиза 4 М HCl (120°C, 6 ч) с помощью аминокислотного анализатора Biotronik LC 2000 хроматографией на колонке (4 × 200 мм) с Ostion LC AN B в Na-цитратно-солянокислом буфере (0.2 М pH 3.2 или 0.35 М pH 5.2); детекция реакцией с нингидрином. *N*-Ацетилнейраминовою кислоту анализировали после гидролиза 0.1 М CF₃COOH (85°C, 1 ч) ВЭЖХ (Bio Rad, США) на колонке DEAE-силасорб (4 × 250 мм, 7 мкм) в 12 мМ KH₂PO₄, pH 5.1; УФ-детекция при 210 нм. Для препаративного разделения гликопептидов использовали колонки (10 × 250 мм) DEAE-силасорб и Zorbax C18 (DuPont Instruments).

Масс-спектры MALDI-TOF получены на приборе MALDI-MS VISION 2000 (ThermoBioanalysis, Англия) в режиме положительных ионов в рефлекто-моду. Ускоряющее напряжение 5 кВ, УФ-лазер 336 нм, импульс 3 нс, энергия в импуль-

се 100–150 мкДж. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (Aldrich), раствор 20 мг/мл в 20% водном MeCN. Раствор матрицы (0.2 мкл) и раствор образца в воде (0.2 мкл, 0.1–1 нмоль/мкл) наносили на мишень и высушивали на воздухе. Спектры от 40–80 лазерных ударов суммировались для получения итогового спектра.

Восстановительное расщепление фетуина и ГСГ-Н и разделение образующихся продуктов.

К раствору фетуина (4 мг) в 0.1 мл воды, помещенному в пробирку объемом ~5 мл, прибавляли 0.1 мл 0.2 М раствора Li-цитрата, 0.1 мл 0.5 М раствора LiOH, 0.7 мл Bu'OH и ~30 мг LiBH₄. После тщательного перемешивания смесь нагревали 6 ч при 45°C, оставляли на ночь при 20°C, разбавляли водой, подкисляли AcOH и упаривали 5–7 раз с добавлением MeOH и AcOH. Остаток обессоливали на колонке (1.2 × 50 см) с сефадексом G-15 в воде (УФ-детекция при 206 нм) и высокомолекулярную фракцию упаривали. Остаток растворяли

в 1% АсОН, наносили на колонку ~0.2 мл с дауэком 50W × 2 (H⁺), промытого 1% АсОН, и после элюции 1% АсОН (1 мл) и 1 М NH₄ОН (1 мл) и упаривания получали фракции А и В соответственно. Каждую фракцию хроматографировали далее на колонке (1.5 × 100 см) с сефадексом G-25 в воде (см. рис. 1) и в аликвотах полученных фракций (АI–АIII и ВI–ВIII) определяли содержание углеводов, аминокислот и аминокспиртов.

Аналогичным образом подвергали деградации ГСГ-Н (2 мг).

Препаративный опыт на фетуине (80 мг) проводили как описано выше, за исключением того, что концентрацию гликопротеина увеличивали в 2 раза, обессоливание реакционной смеси проводили на колонке (1.5 × 90 см) с сефадексом G-15, а гель-хроматографию на колонке (3.8 × 120 см) с сефадексом G-25.

Фракционирование гликопептидов. Фракцию гликопептидов (ВII) хроматографировали порциями по ~100 нмоль на колонке (10 × 250 мм) ДЕАЕ-силасорб (8 мкм) в 12 мМ КН₂РО₄, рН 5.1; скорость элюции 1 мл/мин; УФ-детекция при 210 нм. Соответствующие фракции (рис. 2) упаривали, обессоливали на колонке (1.2 × 50 см) с сефадексом G-15 (элюент – вода) и в аликвотах определяли содержание углеводов.

Фракции ВII.1, ВII.2 и ВII.3 хроматографировали на колонке (9.4 × 250 мм) Zorbax С18 в растворе CF₃COOH с рН 3.6 и 3.9. Обозначенные на рис. 3 гликопептиды выделяли, рехроматографировали и определяли в них содержание углеводов, аминокислот и аминокспиртов.

Десиалилирование гликопептидов. Десиалилирование фракций гликопептидов (~5 нмоль) проводили путем нагревания в 0.1 М CF₃COOH (85°C, 1 ч), продукты реакции анализировали ВЭЖХ на колонке ДЕАЕ-силасорб в 12 мМ КН₂РО₄, рН 5.1, УФ-детекция при 210 нм.

Работа выполнена при частичной финансовой помощи Американского фонда поддержки гражданских исследований и разработок (АФГИР, CRDF), грант № RN1-415.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rudd P.M., Dwek R.A. // *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1997. V. 32. P. 1–100.
2. Maye T.W., Carlson D.M. // *Carbohydr. Res.* 1970. V. 15. P. 300–303.
3. Takasaki S., Mizuochi T., Kobata A. // *Methods Enzymol.* 1982. V. 83. P. 263–268.
4. Maley F., Trimble R.B., Tarentino A.L., Plummer T.H. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 180. P. 195–204.
5. Plummer T.H., Tarentino A.L. // *Glycobiology.* 1991. V. 1. P. 257–263.

6. Takahashi N., Nakagawa H., Fujikawa K., Kawamura Y., Tomiya N. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 226. P. 139–146.
7. Arbatsky N.P., Martynova M.D., Zheltova A.O., Derevitskaya V.A., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* 1989. V. 187. P. 165–171.
8. Dell A. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 193. P. 647–660.
9. Harvey D.J. // *J. Chromatogr. A.* 1996. V. 720. P. 429–446.
10. Barr J.R., Anumula K.R., Vettese M.B., Taylor P.B., Carr S.A. // *Anal. Biochem.* 1991. V. 192. P. 181–192.
11. Vliegenthart I.F.G., Dorland L., van Halbeek H. // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1983. V. 41. P. 209–374.
12. Cumming D.A., Hellerqvist C.G., Harris-Brandts M., Michnik S.W., Carver J.P., Bendiak B. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. P. 6500–6512.
13. Tyagarajan K., Lipniunas P.H., Townsend R.R., Forte J.G. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. P. 10200–10212.
14. Yu X.C., Sturrock E.D., Wu Z., Biemann K., Ehlers M.R.W., Riordan J.F. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 3511–3519.
15. Rahbek-Nielsen H., Roepstorff P., Reischl H., Wozny M., Koll H., Haselbeck A. // *J. Mass Spectrometry.* 1977. V. 32. P. 948–958.
16. Strub J.-M., Sorokine O., van Dorsselaer A., Aunis D., Metz-Boutigue M.-H. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 11928–11936.
17. Neumann G.M., Marinaro J.A., Bach L.A. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 6572–6585.
18. Hansen J.E., Lund O., Rapacki K., Brunak S. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 278–282.
19. Лихошерстов Л.М., Новикова О.С., Деревицкая В.А., Кочетков Н.К. // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 274. С. 222–225.
20. Likhosherstov L.M., Novikova O.S., Piskarev V.E., Trusikhina E.E., Derevitskaya V.A., Kochetkov N.K. // *Carbohydr. Res.* 1988. V. 178. P. 155–163.
21. Kuraya N., Hase S. // *Anal. Biochem.* 1996. V. 233. P. 205–211.
22. Arbatsky N.P., Derevitskaya V.A., Zheltova A.O., Kochetkov N.K., Likhosherstov L.M., Senchenkova S.N., Yurtov D.V. // *Carbohydr. Res.* 1988. V. 178. P. 165–181.
23. Арбатский Н.П., Лихошерстов Л.М., Калякина И.В., Желтова А.О., Шубаев В.Н. // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 885–889.
24. Зенкевич Г.А., Арбатский Н.П., Желтова А.О., Сланке В.П., Лаце З.М. // *Биоорганическая химия.* 1994. Т. 20. С. 682–689.
25. Spiro R.G., Bhojroo V.D. // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 5704–5717.
26. Kochetkov N.K., Derevitskaya V.A., Arbatsky N.P. // *Eur. J. Biochem.* 1976. V. 67. P. 129–136.
27. Derevitskaya V.A., Arbatsky N.P., Kochetkov N.K. // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 86. P. 423–437.
28. Лихошерстов Л.М., Деревицкая В.А., Федорова В.И. // *Биохимия.* 1969. Т. 34. С. 45–50.
29. Downs F., Pigman W. // *Biochemistry.* 1969. V. 8. P. 1760–1766.

30. Papac D.I., Wong A., Jones A.J.S. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 3215–3223.
31. Dziegielewska K.M., Brown W.M., Casey S.-J., Christie D.L., Foreman R.C., Hill R.M., Saunders N.R. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 4354–4357.
32. Wilm M., Shevchenko A., Houthaeve T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T., Mann M. // *Nature.* 1996. V. 379. P. 466–469.
33. Desiderio D.M. // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 3215–3223.
34. Goletz S., Thiede B., Hanisch F.-G., Schultz M., Peter-Katalinic J., Mueller S., Seitz O., Karsten U. // *Glycobiology.* 1997. V. 7. P. 881–896.
35. Bateman K.P., White R.L., Yaguchi M., Thibault P. // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 794. P. 327–344.

The Degradation of Glycoproteins with Lithium Borohydride: Isolation and Analysis of *O*-Glycopeptides with Reduced *C*-Terminal Amino Acid Residue

N. P. Arbatsky^{*,#}, L. M. Likhoshesterov^{*}, M. V. Serebryakova^{**}, O. S. Brusov^{**},
V. N. Shibaev^{*}, V. A. Derevitskaya^{*†}, and N. K. Kochetkov^{*}

^{*}*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia*

^{**}*National Mental Health Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Zagorodnoe sh. 2, korp. 2, Moscow, 113152 Russia*

By the example of fetuin and a blood-group-specific mucin from porcine stomach, we showed that, under conditions of reductive degradation of glycoproteins with LiBH₄–LiOH in 70% aqueous *tert*-butyl alcohol, the reduction and cleavage of amide bonds occur much faster than the simultaneous β-elimination of carbohydrate chains *O*-linked with Ser and Thr residues of the peptide chain. The major degradation products containing the *O*-linked glycans are the *O*-glycosylated derivatives of 2-aminopropane-1,3-diol and 2-aminobutane-1,3-diol (the products of reduction of glycosylated Ser and Thr) and the glycopeptides containing 2–4 amino acid residues with reduced *C*-terminal amino acid. Seventeen homogeneous *O*-glycopeptides were isolated from the fetuin degradation products by ion-exchange and reversed-phase HPLC. Their structures were determined by MALDI-TOF mass spectrometry and by analyses for amino acids, amino alcohols, and carbohydrates. The application of the reaction for characterization of *O*-glycans and localization of *O*-glycosylation sites in *O*- and *N,O*-glycoproteins is discussed.

Key words: *O*-glycoproteins, *O*-glycosylation sites; *O*-glycopeptides, analysis, chromatography, MALDI-TOF mass-spectrometry

[#] *To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 135-5328; e-mail: shiba@ioc.ac.ru.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.