



УДК 577.114.5:577.152.321*18.04

СИАЛИЛИРОВАНИЕ *N*-УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ ГЛИКОПРОТЕИНОВ С ПОМОЩЬЮ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ТРАНС-СИАЛИДАЗЫ *Trypanosoma cruzi*

© 2004 г. С. Д. Шиян[#], В. С. Зуева, В. В. Насонов, Л. С. Жигис, Н. Ц. Цой, Н. В. Бовин

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

117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 29.04.2003 г. Принята к печати 23.07.2003 г.

Описано $\alpha 2,3$ -сиалилирование *N*-гликанов лактозаминового типа с помощью транс-сиалидазы *Trypanosoma cruzi*. Транс-сиалидаза (160 кДа, рI 5.35–5.65) и ее каталитический фрагмент (70 кДа, рI 6.0–6.3), выделенные из лизата клеток *T. cruzi*, иммобилизованы на ConA-сефарозе. Полученный препарат сохранял свою активность в течение нескольких месяцев и был многократно использован для получения моно-, ди-, три- и тетра-сиалилированных олигосахаридов различной антенности, меченных 7-амино-4-метилкумарином, а также для $\alpha 2,3$ -сиалилирования гликанов в составе гликопротеинов и неогликоконъюгатов.

Ключевые слова: гликопротеины, гликоконъюгаты, сиалилирование, гликаны; $\alpha 2,3$ -транс-сиалидаза *Trypanosoma cruzi*, иммобилизация, применение.

ВВЕДЕНИЕ

Одноклеточный паразит *Trypanosoma cruzi* вызывает болезнь Чагаса, от которой ежегодно умирает около 16 млн человек в Центральной и Южной Америке [1]. При дифференциации паразита в инфекционную форму на его плазматической мембране экспрессируется фермент транс-сиалидаза (β -D-галактозил- $\alpha 2,3$ -транс-сиалидаза), который обладает как гидролитической (нейраминидазной), так и трансферазной активностью. В отличие от сиалилтрансфераз этот фермент переносит остаток Neu5Ac не с CMP-NeuAc, а с $\alpha 2,3$ -сиалилированных гликоконъюгатов клеток-мишеней на терминальный остаток β -галактозы в составе гликоконъюгатов собственной мембраны паразита, сохраняя α -конфигурацию гликозидного центра остатка Neu5Ac [2, 3].

Фермент был впервые выделен с помощью моноклональных антител к синтетическому 12-членному пептиду (эпиту по С-концевого фрагмента) [3, 4]. Позднее была получена рекомбинантная транс-сиалидаза и описано ее выделение с помощью металлохелатной хроматографии [5]. Изучение донорно-акцепторной специфичности фер-

мента показало, что он может переносить остаток Neu5Ac с $\alpha 2,3$ -сиалилированной лактозы (3'SL) и Neu5Ac α -MU в 3'-положение остатка Gal β в составе гликанов различной структуры (таких, как Gal β 1-4GlcNAc, Gal β 1-3GlcNAc, Gal β 1-3GalNAc или Gal β 1-4Glc), проявляя наибольшее сродство к лактозаминовым фрагментам гликанов [3, 6]. Таким образом, продуктами реакции являются олигосахариды, содержащие концевой фрагмент Neu5Ac α 2-3Gal β .

Ранее было описано использование фермента для $\alpha 2,3$ -сиалилирования ганглиозидов и олигосахаридов [7, 8], а также для получения двух- и трехантенных $\alpha 2,3$ -сиалилированных *N*-олигосахаридов комплексного типа [6]. Недавно показана способность рекомбинантного фермента 3'-сиалилировать внутренние остатки Gal β в дисахариде Gal α 1-6Gal β -Me [9]. В другой работе для повышения выхода сиалилированных олигосахаридов было предпринято совместное использование $\alpha 2,3$ -транс-сиалидазы и Gal β 1,3/4GlcNAc α -R- $\alpha 2,3$ -сиалилтрансферазы и получены Neu5Ac α 2-3Gal β -терминированные олигосахариды [8]. В настоящей работе описано получение иммобилизованного каталитического фрагмента транс-сиалидазы *T. cruzi* и синтез с его помощью $\alpha 2,3$ -сиалилированных двух-, трех- и четырехантенных олигосахаридов комплексного типа, а также изучение сиалилирования гликанов в составе гликопротеинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение иммобилизованного фермента. Клетки *T. cruzi* лизировали как описано в "Экспери-

Сокращения: AMC – 7-амино-4-метилкумарин; ConA – конканавалин А; Flu – флуоресцеин; Lac – лактоза; LacNAc – *N*-ацетиллактозамин (Gal β 1-4GlcNAc); MU – 4-метилумбеллиферон; Neu5Ac – 5-*N*-ацетилнейраминавая кислота; PAA – полиакриламид; PMSF – фенолметилсульфонил-фторид; 3'SL – Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc; АГП – $\alpha 1$ -кислый гликопротеин; ОС – олигосахариды.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-74-92; эл. почта: Shiyanc@carb.ibch.ru).

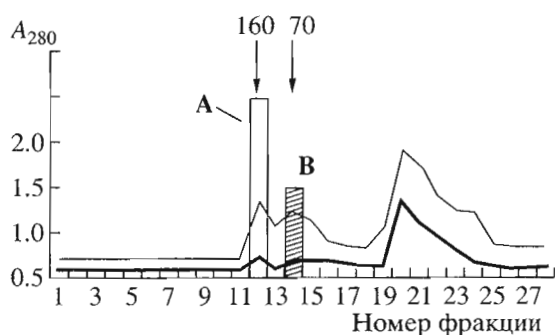


Рис. 1. Гель-хроматография цитоплазматической фракции клеток *T. cruzi* (супернатант 1 – жирная линия, супернатант 2 – тонкая линия) на сефакриле S-200 (1 × 28 см) в Na-какодилатном буфере pH 7.0. Стрелками указаны фракции стандартных белков (альдолаза 160 кДа, альбумин 70 кДа); высота столбиков пропорциональна ферментативной активности фракций **A** и **B**, полученных из супернатанта 1 и 2 соответственно.

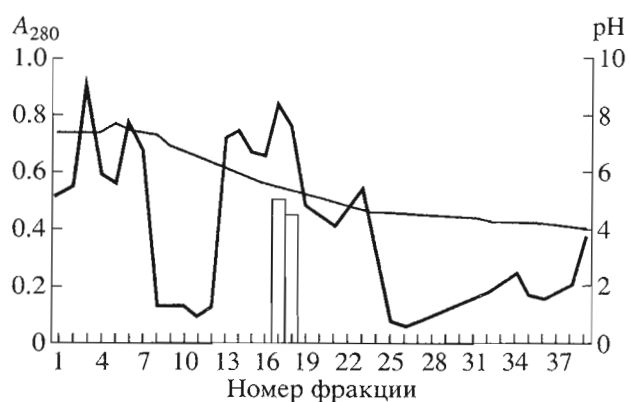


Рис. 2. Хроматофокусирование супернатанта 1, полученного из цитоплазматической фракции клеток *T. cruzi*, на PBE 94 в градиенте pH 7.4–4.0 (верхняя сплошная линия); столбиками отмечены фракции 17 и 18, обладающие ферментативной активностью (высота пропорциональна активности).

мент. части” в присутствии или в отсутствие ингибитора протеиназ (PMSF), а полученные цитоплазматические фракции – соответственно супернатант 1 или супернатант 2, подвергали гель-хроматографии на сефакриле S-200 (рис. 1). Во фракциях определяли ферментативную активность по методу А (донор Neu5Ac α -MU, акцептор Lac) или Б (донор 3'SL, акцептор Lac-AMC) (см. “Эксперимент. часть”). В супернатанте 1 была выявлена ферментативно активная фракция **A**, отвечающая молекулярной массе нативного фермента (160 кДа). В супернатанте 2 транс-сиалидазную активность проявляла фракция **B** с мол. массой 70 кДа, отвечающей, согласно литературным данным [3], молекулярной массе каталитического домена транс-сиалидазы.

При хроматофокусировании супернатанта 1 или фракции **A** ферментативной активностью обладали фракции 17 и 18 (на рис. 2 обозначены столбиками, высота которых пропорциональна величине активности), элюировавшиеся при pH 5.35–5.65, что отвечает изоэлектрической точке нативного фермента (pI 5.5) [3]. Мол. масса этих фракций при гель-хроматографии на сефакриле соответствовала молекулярной массе нативного фермента (160 кДа). Активные фракции, полученные при хроматофокусировании супернатанта 2 или фракции **B** (не показано), элюировались при pH 6.0–6.3, что соответствует изоэлектрической точке каталитического домена (pI 6.3) [3]. При рехроматографии на сефакриле эти фракции отвечали молекулярной массе каталитического домена фермента (70 кДа).

Исходные супернатанты 1 и 2, как и активные фракции, полученные из них с помощью хроматофокусирования (фр. 17, 18) и гель-хроматографии (фракции **A** и **B**), анализировали с помощью

SDS-электрофореза (рис. 3, дорожки 1–4, 6–10). Основным компонентом всех активных фракций был белковый продукт с *M* 70 кДа, образование которого, вероятно, было вызвано частичным протеолизом полипептидной цепи фермента. Его молекулярные характеристики и наличие ферментативной активности позволяли предполагать, что он является, по-видимому, каталитическим доменом фер-

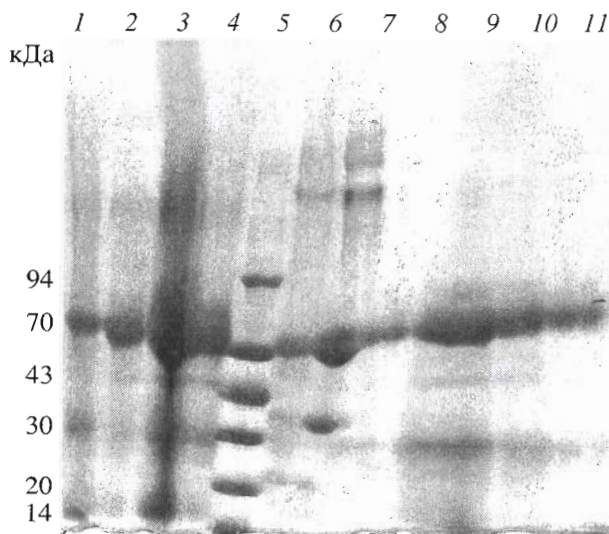


Рис. 3. SDS-электрофорез в градиентном ПААГ (4–30%) цитоплазматических фракций клеток *T. cruzi* (3, 4 – супернатант 2; 6, 7 – супернатант 1) и фракций, полученных из них при гель-хроматографии (1 – фр. **A** из супернатанта 1; 2 – фр. **B** из супернатанта 2) и при хроматофокусировании (8 – фр. 17–18 из фр. **A**; 9 – фр. 17–18 из супернатанта 1; 10 – фр. 15–16 из супернатанта 2; 11 – фр. 15–16 из фр. **B**); 5 – стандартная смесь белков: слева указаны мол. массы (кДа); цифрами обозначены номера дорожек (3, 4 и 6, 7 – разная нагрузка).

мента. Согласно литературным данным [3], каталитический домен должен содержать, как минимум, один маннозный анхор, обладающий высоким сродством к ConA. Присутствие такого маннозного анхора в 70 кДа-фрагменте было подтверждено нами его связыванием с ConA-сефарозой (см. ниже), что в свою очередь подтвердило идентификацию этого фрагмента как каталитического домена.

Ферментативно активные фракции, полученные с помощью хроматофокусирования и гелехроматографии и отвечавшие мол. массе каталитического домена 70 кДа (рис. 3, дорожки 8–11), иммобилизовали на ConA-сефарозе FF (см. “Эксперимент. часть”). Иммобилизация не только повышала стабильность фермента (препарат сохранял активность 10–60 мМЕ/мл геля в течение нескольких месяцев), но позволяла легко отделять его от реакционной смеси и многократно использовать для сиаилирования олигосахаридов. При инкубации иммобилизованного препарата с олигосахаридами или белками в течение трех суток не происходило дегликозилирования олигосахаридов (по данным ТСХ) и протеолиза белков (по данным ЭФ), что свидетельствует об отсутствии в препарате примесей гликозидаз или протеиназ. Иммобилизованный каталитический фрагмент сохранял свой температурный (+13°C) и pH-оптимум (pH 7.0) [3], а уровень нейраминидазной активности (метод А, см. ниже) был низким даже при температуре +30–40°C.

Определение ферментативной активности. Для определения ферментативной активности препаратов были использованы три тест-системы.

Метод А основан на флуориметрическом определении 4-метилумбеллиферона, образующегося из Neu5Ac α -MU при +37°C (нейраминидазная активность) или при +20°C в присутствии субстрата-акцептора лактозы (транс-сиалидазная активность) [10].

Метод Б. Наличие трансферазной активности во фракциях подтверждали хроматографически с помощью ТСХ по появлению в инкубационной среде сиаилированных олигосахаридов: в качестве акцепторов использовали флуоресцентно меченные олигосахариды (Lac-AMC или LacNAc-Flu, рис. 4), а в качестве донора – 3'SL. Транс-сиалидазную активность иммобилизованного препарата определяли в суспензии при +30°C в присутствии LacNAc-Flu и 3'SL: флуоресцентно меченные продукты анализировали с помощью ТСХ или ВЭЖХ как описано в “Эксперимент. части”. Иммобилизованный препарат практически не проявлял гидролитической (нейраминидазной) активности в этих условиях.

Метод В использовали для анализа включения Neu5Ac α в гликопротеины, так как методы А и Б не подходили для этих целей. Окислением терми-

нальных остатков сиаловой кислоты в фетуине (три O-цепи + три N-цепи, 12 остатков Neu5Ac α /моль) периодатом натрия по C7–C8 с последующим восстановлением окисленного конечного фрагмента бортритидом натрия был получен радиоактивно меченный по этому модифицированному остатку сиаловой кислоты (Sia*) [³H]фетуин [11], который иммобилизовали на сефарозе и далее использовали в качестве донора (см. “Эксперимент. часть”). Этот оригинальный метод основан на том, что многие сиаилтрансферазы и нейраминидазы не отличают модифицированный окислением-восстановлением остаток Sia* от остатка Neu5Ac α в нативных гликопротеинах.

Использование иммобилизованного [³H]фетуина в качестве донора оказалось удобным для контроля включения остатков Sia* в гликопротеины, которые находились в растворе. После инкубации и центрифугирования реакционной смеси определяли радиоактивность в супернатанте, а после осаждения трихлоруксусной кислотой – в осадке, выявляя таким образом присоединенные к акцептору остатки Sia*.

Иммобилизованный [³H]фетуин по скорости переноса с него остатков Sia* на лактозу (в пересчете на один остаток Neu5Ac α) занимал промежуточное положение между двумя другими использованными нами субстратами-донорами (3'SL и Neu5Ac α -MU). При этом скорость переноса остатка Neu5Ac α с 3'SL на лактозу была примерно в 5 раз выше, чем с Neu5Ac α -MU, а из всех использованных нами акцепторов (Lac, LacNAc, OC-AMC, гликопротеины, OC-РАА) наименее эффективной оказалась лактоза.

Получение α 2,3-сиаилированных олигосахаридов. Прежде чем перейти к сиаилированию гликанов в составе гликопротеинов, необходимо было выяснить действие иммобилизованного препарата на типичные фрагменты N-цепей комплексного типа. Особенно нас интересовала возможность исчерпывающего сиаилирования четырехантенных гликанов LacNAc-типа, присутствующих в эритропоэтине и α ₁-кислом гликопротеине (АГП), поскольку эти данные отсутствовали в литературе. Олигосахариды, полученные гидразинолизом АГП, метили AMC, десиаилировали и выделяли флуоресцентно меченные двух-, трех- и четырехантенные олигосахариды (OC-AMC) методом ВЭЖХ как было описано нами ранее [12]. Структуры полученных олигосахаридных акцепторов (OC₂-AMC, OC₃-AMC и OC₄-AMC) приведены на рис. 4.

Ферментативную реакцию сиаилирования проводили в течение 12–120 ч при температуре +20–30°C (в этом интервале ее колебания мало влияли на выход продуктов), меняя соотношение донор (3'SL) – акцептор (OC-AMC) от эквимолярного до 20 : 1. При сиаилировании Lac-AMC и

Включение [³H] в десиаилированные углеводные цепи гликопротеинов и гликоконъюгата ОС-РАА под действием транс-сиалидазы (2 мМЕ фермента, 10 мкг акцептора и 40 мкл [³H]фетуин-сефарозы инкубировали и анализировали как описано в "Эксперимент. части")

Акцепторы	M, кДа	Количество гликанов, моль/моль			Количество остатков Gal, моль/моль (на 10 мкг)	Включение** [³ H], 10 ³ имп./мин (%)
		2*	3*	4*		
Трансферрин	80	2	–	–	4 (0.5)	2 (61)
Фетуин	45	–	3	–	12 (2.6)	40 (52)
АГП	40	0.6	2.2	2.2	16 (4.0)	38 (32)
АГП-А	41	–	2.5	2.5	17 (4.2)	31 (25)
АГП-С	37	2	1.5	1.5	14 (3.5)	44 (42)
ОС-РАА	40	0.6	2.6	2.6	19 (4.9)	66 (48)

* Число антенн.

** Среднее из 3-х параллельных опытов; в скобках – включение в % от теоретического.

LacNAc-Flu степень их превращения не превышала 50% при эквимолярном соотношении донор–акцептор, но возрастала до 90 % при его увеличении до 20 : 1. При работе с двух-, трех- и четырехантенными олигосахаридами (ОС₂-АМС, ОС₃-АМС и ОС₄-АМС) приходилось менять это соотношение пропорционально количеству терминальных остатков Gal. В зависимости от концентрации донора, акцептора или фермента, а также времени проведения реакции получали олигосахаридами разной степени сиалилирования. За ходом реакции следили с помощью ТСХ на силикагеле в системе Б по образованию сиалоолигосахаридов, а их количество оценивали с помощью ВЭЖХ (рис. 5–7). При этом использовали условия разделения моно-, ди-, три- и тетрасиалилированных ОС-АМС, описанные ранее [13].

На рис. 5–7 приведены результаты сиалилирования олигосахаридных акцепторов ОС₂-АМС, ОС₃-АМС и ОС₄-АМС иммобилизованным ферментом при температуре +30°C и 20-кратном избытке донора. Степень превращения четырех-, трех- и двухантенных олигосахаридов в этих условиях за сутки составляла 75–95%: двухантенный ОС₂-АМС давал смесь моносиало- и дисиаололигосахаридов в соотношении 1 : 1 (рис. 5, фракции 2 и 3), а трехантенный ОС₃-АМС – смесь моносиало-, дисиаоло- и трисиалоолигосахаридов в соотношении 1 : 3 : 3 (рис. 6, фракции 2–4), однако его степень конверсии была ниже (75%), чем у ОС₂-АМС (95%). В этих условиях из четырехантенного ОС₄-АМС с выходом 85% была получена смесь моносиало-, дисиаоло-, трисиало- и тетрасиалоолигосахаридов в соотношении 1 : 6 : 5 : 3 (рис. 7, фракции 2–5).

Рехроматография фракций двух-, трех- и четырехантенных сиалоолигосахаридов с различным содержанием остатков сиаловой кислоты с помощью аминотазной ВЭЖХ (как указано в "Эксперимент. части") выявила наличие практи-

чески всех возможных изомеров положения введенного остатка Neu5Acα, хотя и в разном соотношении (не показано). Это подтверждает выводы работы [6] об отсутствии у фермента строгой специфичности по отношению к разным антеннам.

Для получения полностью сиалилированных олигосахаридов различной антенности и увеличения их выхода до 80–90% были оптимизированы условия проведения реакции для каждого из трех олигосахаридных акцепторов. В результате были получены полностью сиалилированные: двухантенный (Neu5Acα_{2,3})₂ОС₂-АМС (2 сут, 40-кратный избыток 3'SL по отношению к ОС₂-АМС), трехантенный (Neu5Acα_{2,3})₃ОС₃-АМС (3 сут, 60-кратный избыток 3'SL), а также четырехантенный (Neu5Acα_{2,3})₄ОС₄-АМС (5 сут, 80-кратный избыток 3'SL) олигосахариды.

Сиалилирование гликопротеинов. На следующем этапе работы изучалось сиалилирование гликанов в составе природных и синтетических гликоконъюгатов. Для этой цели был получен радиоактивно меченный донор [³H]фетуин [11], иммобилизованный на сефарозе так, чтобы содержание модифицированной Sia* составляло 2.5 мкмоль/мл геля. В этом случае в работе использовали неиммобилизованный фермент, стабилизированный 0.2% альбумина (см. "Эксперимент. часть"). Сиалилированию подвергали десиаилированные гликопротеины (таблица), а также полиакриламидный гликоконъюгат ОС-РАА, полученный присоединением углеводных цепей АГП к полимеру [13]. Использовали трансферрин, содержащий диантенные гликаны (две *N*-цепи), фетуин (три *O*- и три *N*-цепи), α₁-кислый гликопротеин (пять *N*-цепей) и его гликоформы АГП-А и АГП-С, различающиеся структурой гликанов [14].

Включение [³H]метки в нативные сиалилированные гликопротеины было на уровне фона. Степень конверсии десиаилированных глико-

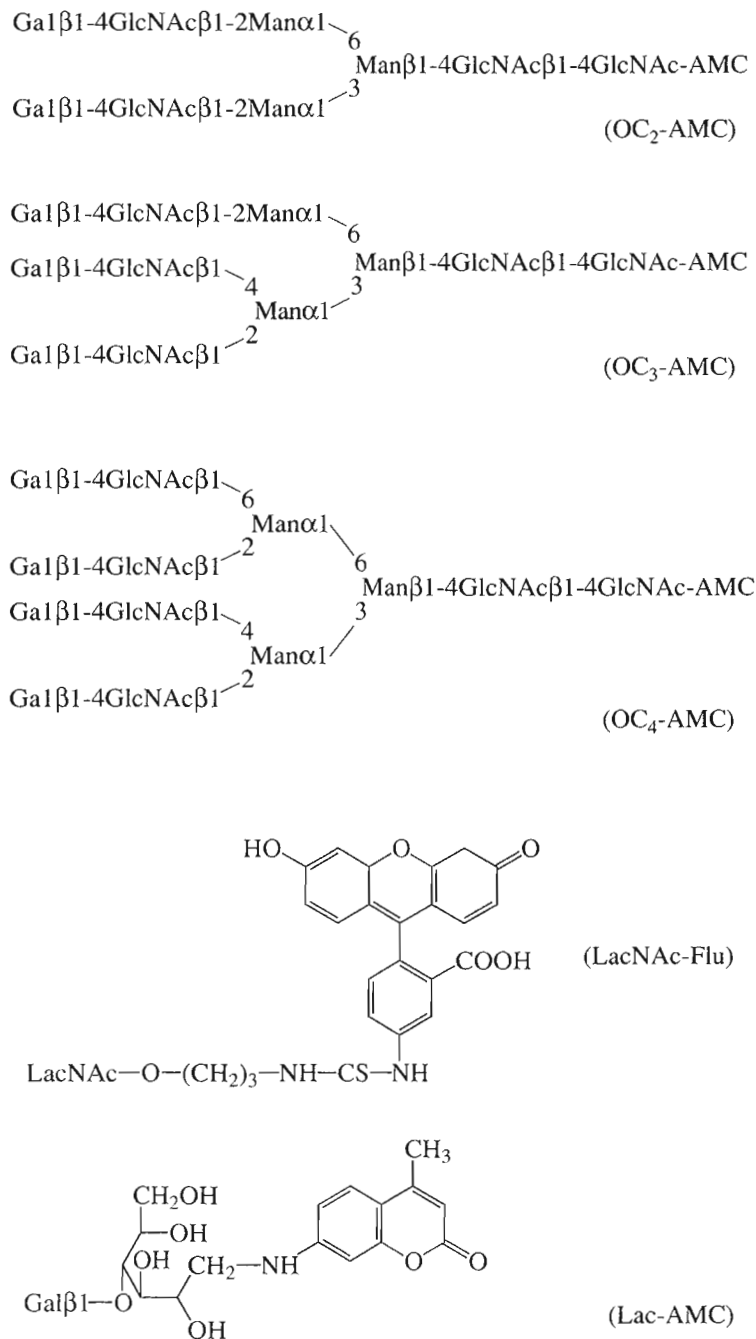


Рис. 4. Структуры использованных олигосахаридных акцепторов.

протеинов и ОС-РАА при работе с 10-кратным избытком Sia* по отношению к терминальным остаткам Gal за сутки достигало для трансферрина, фетуина и ОС-РАА соответственно 60, 52 и 48% от расчетного (таблица). Включение Sia* в АГП составило 32, в АГП-А – 25 и в АГП-С – 42%. Аналогичные результаты были получены при использовании транс-сиалидазы, выделенной нами из плазмы крови человека [15]. Различия в сиалировании АГП-А и АГП-С связаны с разной

доступностью остатков Gal в составе гликопротеинов. Гликоформа АГП-А имеет более компактную конформацию, чем у АГП-С [16], которая к тому же зафиксирована двумя дисульфидными связями, отсутствующими у более развернутой гликоформы АГП-С [17]. Это, на наш взгляд, и могло быть причиной более высокого включения метки в АГП-С.

Для увеличения степени сиалилирования АГП и гликоконъюгата ОС-РАА мы перешли к ис-

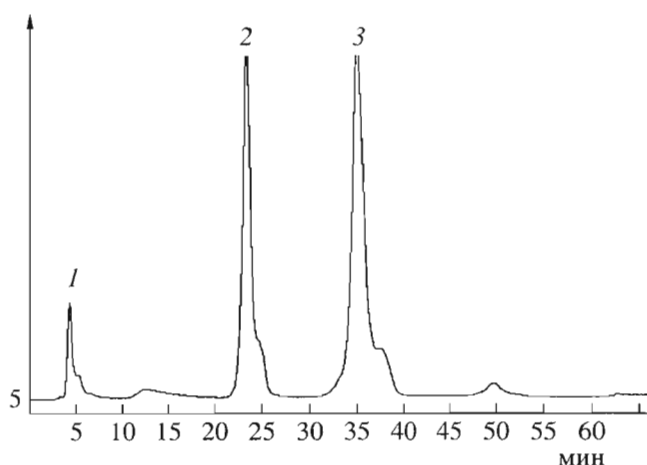


Рис. 5. Разделение методом ВЭЖХ на колонке HEMA-BIO 1000Q сиаололигосахаридов, полученных из диантенного OC_2 -АМС с помощью иммобилизованной транс-сиалидазы (1 сут, $+30^\circ C$, также и на рис. 6, 7): 1 – $(Gal\beta 1-4GlcNAc)_2Man_3GlcNAc_2AMC \{OC_2-AMC\}$; 2 – $(Neu5Ac\alpha 2-3)_1(Gal\beta 1-4GlcNAc)_2Man_3GlcNAc_2AMC \{(Neu5Ac\alpha 2-3)_1OC_2-AMC\}$; 3 – $(Neu5Ac\alpha 2-3)_2(Gal\beta 1-4GlcNAc)_2Man_3GlcNAc_2AMC \{(Neu5Ac\alpha 2-3)_2OC_2-AMC\}$.

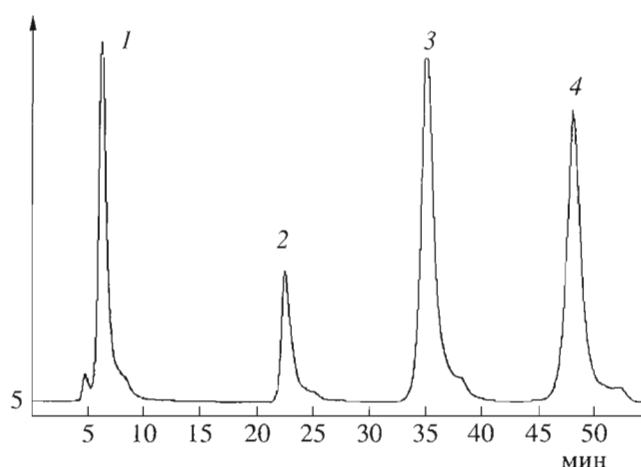


Рис. 6. Разделение методом ВЭЖХ на колонке HEMA-BIO 1000Q сиаололигосахаридов, полученных из трехантенного OC_3 -АМС с помощью иммобилизованной транс-сиалидазы: 1 – $(Gal\beta 1-4GlcNAc)_3Man_3GlcNAc_2AMC \{OC_3-AMC\}$; 2 – $\{(Neu5Ac\alpha 2-3)_1(Gal\beta 1-4GlcNAc)_3Man_3GlcNAc_2AMC \{Neu5Ac\alpha 2-3\}_1OC_3-AMC\}$; 3 – $(Neu5Ac\alpha 2-3)_2(Gal\beta 1-4GlcNAc)_3Man_3GlcNAc_2AMC \{(Neu5Ac\alpha 2-3)_2OC_3-AMC\}$; 4 – $(Neu5Ac\alpha 2-3)_3(Gal\beta 1-4GlcNAc)_3Man_3GlcNAc_2AMC \{(Neu5Ac\alpha 2-3)_3OC_3-AMC\}$.

пользованию более активного донора, а именно 3'SL, в условиях, описанных в работе [18] для рекомбинантного фермента. Реакцию вели с 5–10 мМЕ иммобилизованного фермента в присутствии 2 мМ 3'SL и 0.5–1 мг/мл асиало-АГП (количество остатков Gal в АГП указано в таблице). В этих условиях за 2 сут была достигнута значительная степень сиаилирования АГП, о чем свидетельствовали появление полосы, отвечающей мол. массе 42–44 кДа (электрофоретический контроль), и наличие 9–10 остатков Neu5Ac α при ее анализе по методу [19] (см. “Эксперимент. часть”). Однако получить полностью $\alpha 2,3$ -сиалилированный АГП, идентичный нативному (44 кДа, 12 моль Neu5Ac α /моль АГП), как это было сделано в работе [18] с помощью рекомбинантного фермента, не удалось.

Таким образом, нами разработан простой способ получения иммобилизованного каталитического фрагмента транс-сиалидазы *T. cruzi*; показана стабильность препарата в течение нескольких месяцев и пригодность для $\alpha 2,3$ -сиалилирования олигосахаридов комплексного типа. С его помощью получены двух-, трех- и четырехантенные гликаны различной степени сиаилирования, а также полностью сиаилированные. $\alpha 2,3$ -Сиаилирование гликанов и гликопротеинов подтверждено с помощью $\alpha 2,3$ -специфичной нейраминидазы из *Newcastle virus disease* (см. “Эксперимент. часть”). Полученные результаты хорошо коррелируют с описанными в литературе для высокоочищенной транс-сиалидазы *T. cruzi* в отношении

двух- и трехантенных гликанов [6]. Кроме того, показано, что эффективность сиаилирования гликанов в составе гликопротеинов зависит от их пространственной организации.

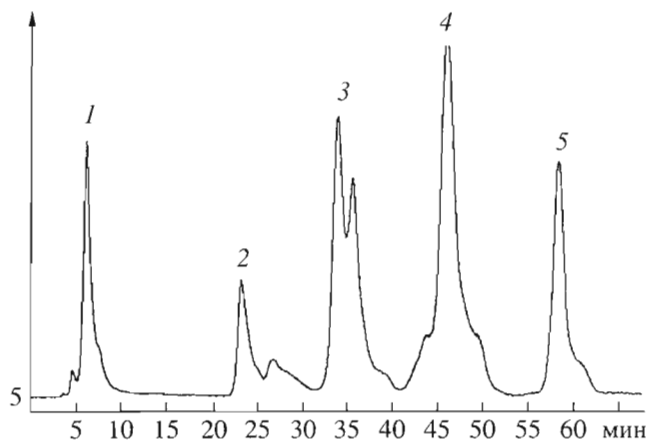


Рис. 7. Разделение методом ВЭЖХ на колонке HEMA-BIO 1000Q сиаололигосахаридов, полученных из четырехантенного OC_4 -АМС с помощью иммобилизованной транс-сиалидазы: 1 – $(Gal\beta 1-4GlcNAc)_4Man_3GlcNAc_2AMC \{OC_4-AMC\}$; 2 – $(Neu5Ac\alpha 2-3)_1(Gal\beta 1-4GlcNAc)_4Man_3GlcNAc_2AMC \{(Neu5Ac\alpha 2-3)_1OC_4-AMC\}$; 3 – $(Neu5Ac\alpha 2-3)_2(Gal\beta 1-4GlcNAc)_4Man_3GlcNAc_2AMC \{(Neu5Ac\alpha 2-3)_2OC_4-AMC\}$; 4 – $(Neu5Ac\alpha 2-3)_3(Gal\beta 1-4GlcNAc)_4Man_3GlcNAc_2AMC \{(Neu5Ac\alpha 2-3)_3OC_4-AMC\}$; 5 – $(Neu5Ac\alpha 2-3)_4(Gal\beta 1-4GlcNAc)_4Man_3GlcNAc_2AMC \{(Neu5Ac\alpha 2-3)_4OC_4-AMC\}$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хроматографию в тонком слое проводили на силикагеле (DC Alufolien Kieselgel 60, Merck, США) в системе хлороформ–метанол–вода, 10 : 5 : 1 (система А), а также метанол–ацетонитрил–вода–АсОН, 6 : 6 : 1 : 2 (система Б). Олигосахариды обнаруживали 7% фосфорной кислотой и прогреванием до 250°C, флуоресцентно меченные ОС-АМС детектировали при 365 нм под УФ-лампой (Desaga, Германия).

ВЭЖХ олигосахаридов проводили на жидкостном хроматографе Beckman System Gold (Beckman, США), снабженном программируемым модулем Solvent Module 126 и флуориметрическим детектором Fluorometer Model 121 (Gilson, Франция). Использовали колонки C18 (4.6 × 250 мм, ODS-Ultrasphe, Beckman, США), элюируя градиентом концентрации ацетонитрила (0–25%, 30 мин) в воде, НЕМА-БИО 1000Q (4 × 250 мм, Tessek Ltd., Чехословакия), элюируя градиентом концентрации NaCl (0–0.3 М 5–65 мин) в воде, и Zorbax-NH₂ (4 × 250 мм), элюируя градиентом концентрации ацетонитрила (30–70% 5–50 мин) в воде в присутствии 0.2% 1,8-диаминооктана. Скорость элюции 0.5 мл/мин, комнатная температура.

Количество сиаловой кислоты определяли по методу [19].

Электрофорез проводили по модифицированной методике Лэммли [20] в восстанавливающих условиях в присутствии SDS в градиенте концентрации 4–30% ПААГ и рН 8.6.

В работе использованы α2,3-нейраминидаза из *N. virus disease* (КФ 3.2.1.18), бычий сывороточный альбумин, α₁-кислый гликопротеин сыворотки человека, 3'-сиалиллактоза, лактоза, Neu5Acα-MU, Na-какодилат, Кумасси бриллиантовый голубой G-250 и глицин (Sigma, США), фетуин эмбриональной сыворотки теленка, SDS, Трис (Serva, Германия), 7-амино-4-метилкумарин и NaCNBH₃ (Fluka, Швейцария), сорбент PBE 94, раствор для элюции Polybuffer 74, стандартный набор белков LMW-Standart Kit, сефакрил S-200, сефадекс G-15, ConA-сефароза FF и BrCN-сефароза FF (Pharmacia, Швеция), биогель P-4 (Bio Rad, США).

АМС-метку в лактозу вводили по реакции восстановительного аминирования в присутствии NaCNBH₃ как в работе [21].

Фракцию олигосахаридов получали гидразинолизом АГП [12], АМС-метку в олигосахариды вводили в присутствии NaCNBH₃ в смеси вода–DMFA–АсОН, 4 : 4 : 1 (+40°C, 1 сут), фракцию ОС-АМС выделяли хроматографией на биогеле P-4 (1 × 50 см), элюируя водой (выход 70%). Фракцию ОС-АМС десалилировали и выделяли флуоресцентно меченные ОС₂-АМС, ОС₃-АМС и ОС₄-АМС с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила 9–12% в воде как в работе [12]. Гликопротеины десалилировали

0.1 н. TFA (80°C, 1 ч). Полиакриламидный гликоконъюгат ОС-РАА (2 мол. % ОС) получали согласно работе [13] присоединением углеводных цепей АГП к *n*-нитрофенилакрилату.

Приготовление радиоактивно меченной [³H]фетуин-сефарозы [11]. Фетуин (5 мг, 1.2 мкмоль Neu5Acα) в 2.5 мл 4 мМ NaIO₄ в 0.1 М натрий-ацетатном буфере (рН 5.0) окисляли в течение 10 мин при +4°C, добавляли 100 мкл глицерина, выдерживали 20 мин и диализовали против 2 л воды. Раствор доводили до рН 8.5 с помощью 1 н. NaOH, выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре с 10 мкмоль (1 мКи) NaB³H₄ (Россия), затем добавляли 50 мкмоль (20 мг) NaBH₄ и выдерживали еще 1 ч, после чего подкисляли АсОН до рН 4.5 и диализовали против воды и бикарбонатного буфера рН 8.6 (3 × 2 л). Полученный [³H]фетуин (величина радиоактивности 7.5 × 10⁶ имп./мин/мг белка) иммобилизовали на BrCN-сефарозе FF в бикарбонатном буфере рН 8.6 (+4°C, ночь): 1 мг/мл геля (240 нмоль Sia*/мл) или 10 мг/мл геля (2.4 мкмоль Sia*/мл). 1 нмоль такой иммобилизованной Sia* отвечал величине радиоактивности 3 × 10⁴ имп./мин. Иммобилизованный субстрат-донор ([³H]фетуин-сефарозу) хранили при +4°C в 0.02 М Na-какодилатном буфере рН 7.0, содержащем 0.2% BSA и 0.02% NaN₃, в течение нескольких месяцев.

Клетки *T. cruzi* отделяли центрифугированием от культуральной жидкости, отмывали и суспендировали в воде (2 × 10⁶ клеток/мл воды), замораживали и хранили при –20°C. Для получения цитоплазматической фракции замороженную суспензию клеток медленно размораживали в присутствии 10 мМ EDTA и 0.05 мМ PMSF и центрифугировали 30 мин при 10000 об/мин (супернатант 1); супернатант 2 получали аналогично, но без добавления ингибиторов протеиназ: получали 1 мл лизата из 2 × 10⁶ клеток. Фермент выделяли при +4°C. Содержание белка во фракциях определяли по методу Брэдфорд [22] и спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

Гель-хроматографию проводили на колонке (1 × 28 см) с сефакрилом S-200, уравновешенным 0.02 М Na-какодилатным буферным раствором (рН 7.0), содержащим 0.05 мМ PMSF и 0.02% NaN₃; колонку предварительно калибровали с помощью стандартного набора белков для гель-фильтрации (Pharmacia); скорость элюции 0.5 мл/мин: наносили 0.5 мл супернатанта 1 или 2 (2.5 A₂₈₀), собирали фракции объемом 1 мл, обладающие ферментативной активностью и отвечающие молекулярной массе 160 кДа с V_g/V₀ = 1.0–1.25 (фр. А из супернатанта 1) и 70 кДа с V_g/V₀ = 1.35–1.5 (фр. В из супернатанта 2).

Хроматофокусирование проводили на колонке (0.6 × 21 см) с сорбентом PBE 94, уравновешенным 0.025 М имидазол-НСI-буферным раство-

ром, pH 7.4. На колонку наносили 1 мл супернатанта 1 или 2, уравновешенного против того же хроматографического буферного раствора (pH 7.4), и элюировали полибуфером Polybuffer 74, разведенным предварительно водой (1 : 8) и подкисленным 0.01 M HCl до pH 4.0; скорость элюции 10 мл/ч. Собирали фракции по 2 мл, немедленно нейтрализовали 1 M NaOH до pH 7.0, отделяли от полибуфера и низкомолекулярных примесей ультрафильтрацией на мембране PM-10. Фракции, обладавшие ферментативной активностью, концентрировали и хранили при -20°C ; стабилизация растворов с содержанием белка менее 50 мкг/мл в течение недели при $+4^{\circ}\text{C}$ достигалась добавлением 0.2% альбумина.

Получение иммобилизованного фермента. 1 мл CopA-сефарозы FF, уравновешенной 0.02 M Na-какодилатным буферным раствором (pH 7.0) с 2 mM CaCl₂, 0.5 M NaCl, 0.02% NaN₃ и 0.2% альбумина, суспендировали в 2–3 мл раствора фермента (20 мкг/мл) в указанном буфере, перемешивали при комнатной температуре в течение 20–30 мин, центрифугировали и трижды отмывали буферным раствором; гель хранили при $+4^{\circ}\text{C}$ в присутствии 0.02% NaN₃. Иммобилизованный фермент имел активность 10–60 мМЕ/мл геля, сохранял ее в течение нескольких месяцев и был использован для сиалилирования олигосахаридов пять раз.

Определение ферментативной активности. За единицу ферментативной активности (1 МЕ) принимали количество фермента, которое отвечало переносу 1 мкмоль Neu5Ac α за 1 мин с донора (3'SL) на акцептор (LacNAc-Flu).

Метод А. Ферментативную активность определяли флуориметрически по образованию метилумбеллиферона [10], используя в качестве субстрата Neu5Ac α -MU (акцептор лактоза – транс-сиалидазная активность или без акцептора – нейраминидазная активность). Инкубацию проводили при $+20^{\circ}$ или 37°C в течение 2–16 ч в 50 мкл 0.02 M Na-какодилатного буферного раствора (pH 7.0), содержащего 2 mM CaCl₂, 0.2% альбумина, 0.2 mM Neu5Ac α -MU, 10 мкл фермента (2–10 мкг белка) и 1 нмоль лактозы (если нужен акцептор). Реакцию останавливали добавлением 150 мкл 0.2 M глицинового буфера (pH 10). Флуоресценцию в растворе определяли при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 365/465$ нм в 96-луночных планшетах Fluoroplate (Flow Lab., Финляндия) на ридере Micro Fluor Reader (Dynatech Lab. Inc.) или в кювете (объемом 0.7 мл) на спектрофлуориметре F 4000 (Hitachi, Япония). Количество свободного метилумбеллиферона определяли по калибровочной кривой в интервале концентраций 0.02–200 мкМ.

Метод Б. Гель с иммобилизованным ферментом (50 мкл, 1.5 мМЕ) суспендировали в 50 мкл 0.02 M Na-какодилатного буферного раствора pH 7.0, содержащего 2 mM CaCl₂, 20 нмоль 3'SL и 2 нмоль LacNAc-Flu (или Lac-AMC) и перемешивали

в течение 18 ч при $+30^{\circ}\text{C}$; отбирали аликвоты по 20 мкл через 2, 4, 8 и 18 ч, центрифугировали и анализировали супернатант. Величина R_f при ТСХ в системе А составляла 0.65 для Lac-AMC и 0.35 для 3'SL-AMC.

Метод В. 100 мкл 0.02 M Na-какодилатного буферного раствора (pH 7.0), содержащего 2 mM CaCl₂, 1 mM дитиотреит, 10 мкг асиало-фетуина, 20 мкл фермента (10 мкг) и 20 мкл геля [³H]фетуин-сефарозы (1.5×10^5 имп./мин), перемешивали в течение 24 ч при $+30^{\circ}\text{C}$, суспендировали в 0.5 мл воды, центрифугировали и отбирали 0.2 мл супернатанта для определения радиоактивности в растворе. Другие 0.2 мл осаждали трихлоруксусной кислотой и определяли радиоактивность в осадке.

α 2,3-Сиалилирование олигосахаридов OC₂-AMC, OC₃-AMC, OC₄-AMC в присутствии 100 мкл иммобилизованного фермента проводили в 0.02 M Na-какодилатном буферном растворе pH 7.0, содержащем 2 mM CaCl₂, 2 mM 3'SL и 5–20 нмоль акцептора: 200 мкл суспензии перемешивали в течение 1–7 сут при $+20^{\circ}\text{C}$ или $+30^{\circ}\text{C}$; затем реакционную массу центрифугировали (гель с иммобилизованным ферментом отмывали буфером и использовали повторно) и определяли сиалоолигосахариды в супернатанте: величина R_f при ТСХ в системе Б составляла 0.25 для (Neu5Ac α 2,3)₂OC₂-AMC, 0.40 для Neu5Ac α 2,3OC₂-AMC и 0.60 для OC₂-AMC.

Полученные α 2,3-сиалилированные OC₂-AMC, OC₃-AMC и OC₄-AMC выделяли с помощью ионообменной ВЭЖХ, упаривали и хранили при -20°C . α 2,3-Сиалилирование олигосахаридов подтверждали их обработкой α 2,3-специфичной нейраминидазой (0.5 мМЕ на 1 нмоль олигосахаарида, 16 ч при $+37^{\circ}\text{C}$).

α 2,3-Сиалилирование гликоконъюгатов. Суспензию, содержащую 1 mM CaCl₂, 1 mM дитиотреит, 2 мМЕ фермента, 40 мкл [³H]фетуин-сефарозы (2.5 мкмоль Sia*/мл геля) и 10 мкг десалилированного гликопротеина или OC-РАА в 100 мкл 0.05 M Трис-HCl-буферного раствора (pH 7.0), перемешивали в течение 2 сут при $+30^{\circ}\text{C}$, суспендировали в 0.4 мл воды, центрифугировали (10000 об/мин, 10 мин) и отбирали аликвоту 0.2 мл для определения радиоактивности. Включение метки оценивали по отношению к контрольным пробам, которые не содержали акцептора или фермента.

α 2,3-Сиалилирование АГП [18]. Суспензию 100 мкл иммобилизованного фермента (5 мМЕ) в 100 мкл 0.02 M Na-какодилатного буферного раствора (pH 7.0), содержащего 1 mM CaCl₂, 2 mM 3'SL и 100 мкг десалилированного АГП (40 нмоль Gal), инкубировали 2 сут при $+30^{\circ}\text{C}$, центрифугировали и анализировали супернатант с помощью SDS-электрофореза в градиенте ПААГ (см. выше). О сиалилировании асиало-АГП (40 кДа) судили по появлению фракции, отвечающей молекулярной массе 42–43 кДа. Кроме того, определяли содержание Neu5Ac α в пробах по методу [19].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудников кафедры зоологии беспозвоночных (биофак МГУ им. М.В. Ломоносова) Калининкову В.Д. и Оглоблину Т.А. за предоставленный клеточный материал, а сотрудницу лаборатории химии углеводов (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) Корчагину Е.Ю. – за предоставленный LacNAc-Flu.

Работа финансирована грантом РФФИ № 01-04-48672.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schencman S., Jiang M.S., Hart G.W., Nussenzweig V. // *Cell*. 1991. V. 65. P. 117–125.
2. Schencman S., Eichinger D., Pereira M., Nussenzweig V. // *Ann. Rev. Microbiol.* 1994. V. 48. P. 499–523.
3. Schudder P., Doom J.P., Chuenkova M., Manger Ian D., Pereira M.E.A. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 9886–9891.
4. Schencman S., Chaves L.B., Pontes de Carvalho L.C., Eichinger D. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 7970–7975.
5. Buschiazio A., Frasch A.C.C., Campetella O. // *Cell. Mol. Biol.* 1996. V. 42(5). P. 703–710.
6. Takanashi N., Lee K.B., Nakagawa H., Tsukamoto Y., Kawamura Y., Li Yu-Teh, Lee Y.Ch. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 230. P. 333–342.
7. Ferrero-Garcia M.A., Trombetta S.E., Sanchez D.O., Reglero A., Frasch A.C.C., Parodi A.J. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 213. P. 765–771.
8. Ito Y., Paulson J.C. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 7862–7863.
9. Singh S., Scigelova M., Hallberg M.L., Howarth O.W., Schenkman S., Crout D.H.G. // *Chem. Commun.* 2001. P. 1013–1014.
10. Engstler M., Talhouk J.W., Smith R.E., Schauer R. // *Anal. Biochem.* 1997. V. 250. P. 176–180.
11. Reuter G., Schauer R., Szeiki C., Kamerling J.P., Vliegenter J.F.G. // *Glycoconj. J.* 1989. V. 6(1). P. 35–44.
12. Шиян С.Д., Насонов В.В., Бовин Н.В., Новикова Л.И., Алешкин В.А. // *Биоорган. химия*. 1991. Т. 17. С. 663–670.
13. Шиян С.Д., Пухальский А.Л., Топтыгина А.П., Насонов В.В., Бовин Н.В. // *Биоорган. химия*. 1994. Т. 20(8–9). С. 994–1000.
14. Shiyani S.D., Bovin N.V. // *Glycoconj. J.* 1997. V. 14. P. 632–638.
15. Тертов В.В., Никонова Е.Ю., Нифантьев Н.Э., Бовин Н.В., Орехов А.Н. // *Биохимия*. 2002. Т. 67. С. 1093–1100.
16. Олейников В.А., Феофанов А.В., Шиян С.Д., Тузиков А.Б., Крюков Е.Ю., Янкуль А.И., Бовин Н.В., Набиев И.П. // *Биоорган. химия*. 1998. Т. 24(6). С. 412–421.
17. Oleinikov V.A., Kovner M.A., Kryukov E.Yu., Kudelina I.A., Shiyani S.D., Bovin N.V., Nabiev I.R. // *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions* / Eds J. Greve, G.J. Puppels, C. Otto. N.Y.: Kluwer Academic Publisher, 1999. P. 335–336.
18. Marchal I., Cerutti M., Mir A.M., Juliant S., Devauchelle G., Cacan R., Verbert A. // *Glycobiology*. 2001. V. 11(7). P. 593–603.
19. Anumula K.R. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 230. P. 24–30.
20. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–682.
21. Хорлин А.Я., Шиян С.Д., Маркин В.А., Насонов В.В., Мирзаянова М.Н. // *Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. С. 1203–1212.
22. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. P. 142–146.

Sialylation of N-Carbohydrate Chains of Glycoproteins with Trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi*

S. D. Shiyani[#], V. S. Zueva, V. V. Nasonov, L. S. Zhigis, N. C. Coi, and N. V. Bovin

[#]Phone: +7 (095) 330-7492; e-mail: shiyani@carb.ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

α 2,3-Sialylation of the lactosamine type N-glycans with trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* is reported. Trans-sialidase (160 kDa, pI 5.35–5.65) and its catalytic fragment (70 kDa, pI 6.0–6.3) were isolated from *T. cruzi* cells and immobilized on ConA-Sepharose. The resulting preparation retained activity for several months and was repeatedly used for obtaining mono-, di-, tri-, and tetrasialylated 7-amino-4-methylcoumarine-labeled oligosaccharides with various numbers of antennas and for α 2,3-sialylation of glycans within glycoproteins and neoglycoconjugates. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: glycans, sialylation, glycoconjugates; glycoproteins; α 2,3-trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*, immobilization, application