



УДК 547.963.1.02 : 578.832.1 : 578.112.853.088.5

СТРУКТУРА ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ
ГЛИКОПРОТЕИНОВ ВИРУСА ГРИППА
А/КРАСНОДАР/101/59(H2N2)—ТЯЖЕЛОЙ
И ЛЕГКОЙ ЦЕПЕЙ ГЕМАГГЛЮТИНИНА И НЕЙРАМИНИДАЗЫ

*Арбатский Н. П., Желтова А. О., Юртов Д. В.,
Дерезицкая В. А., Гочетков Н. К.*

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

Проведен структурный анализ углеводных цепей выделенных ранее гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA) — поверхностных гликопротеинов вируса гриппа А/Краснодар/101/59 (H2N2). Восстановлением HA и последующей гель-хроматографией получены его тяжелая (HA₁) и легкая (HA₂) цепи, установлен аминокислотный и углеводный состав HA₁, HA₂ и NA. Углеводные цепи гликопротеинов отщеплены действием щелочного раствора LiBH₄, и полученные олигосахариды восстановлены NaB[³H]₄. С помощью ВЭЖХ на двух колонках проведено фракционирование меченых олигосахаридов, и сравнением с немечеными олигосахаридами известного строения идентифицированы некоторые главные углеводные фрагменты HA₁, HA₂ и NA. Установлено, что для каждого из исследованных гликопротеинов характерна высокая гетерогенность углеводных цепей, в том числе наличие олигоманнозидных цепей и комплексных цепей различного строения.

Вирус гриппа А человека имеет два поверхностных антигена — гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA). На основании антигенных свойств различают три подтипа HA (H1, H2 и H3) и два подтипа NA (N1 и N2) [1], которые значительно различаются по первичной структуре полипептидной цепи. Поскольку формирование вторичной и третичной структур белка идет одновременно с его гликозилированием, можно ожидать, что углеводные цепи гликопротеинов, относящихся к разным подтипам, будут в большей или меньшей степени различаться.

Ранее нами изучено строение главных углеводных цепей HA подтипов H1 и H3 [2—4]. Полученные результаты, а также анализ литературных данных [5—9] позволяют заключить, что действительно различные подтипы HA, а иногда и NA внутри одного подтипа, имеют свой характерный набор олигоманнозидных и комплексных углеводных цепей. Экспериментальные данные о первичной структуре углеводных фрагментов NA и HA подтипа H2 отсутствуют. Нами из вируса А/Краснодар/101/59 (H2N2) выделены оба поверхностных антигена — HA и NA [10]. В данной работе с помощью разработанного ранее нового подхода к структурному анализу углеводных цепей гликопротеинов — метода «олигосахаридных карт» [2, 4, 11, 12] — проведено исследование структуры и гетерогенности олигосахаридных фрагментов в тяжелой (HA₁) и легкой (HA₂) цепях HA подтипа H2, а также в NA подтипа N2.

Препарат HA восстанавливали меркаптоэтанолом в присутствии додецилсульфата натрия и хроматографией на Ультрогеле АсА-34 [13] выделяли HA₁ и HA₂, контролируя разделение электрофорезом в полиакриламидном геле. Аминокислотный и углеводный состав образцов HA₁ и HA₂ и выделенной ранее NA [10] приведен в таблице. Как видно, в образце HA₁ содержится вдвое больше аминокислот, чем в HA₂. Это соответствует данным, согласно которым полипептид HA₁ почти в 2 раза длиннее полипептида HA₂; на 325 и 175 аминокислот, из которых состоят HA₁ и HA₂ [14], приходится ~50 и 15 моносахаридных остатков соответственно. Таким образом, в HA₁ и HA₂ имеются соответственно 4 и 1 углеводные цепи, что согласуется с числом сайтов гликозилирования в тяжелой и легкой

Аминокислотный и углеводный состав тяжелой (HA₁) и легкой (HA₂) цепей гемагглютинина в нейраминидазы (NA) *

Компоненты	HA ₁		HA ₂		NA	
	А	Б	А	Б	А	Б
Asp	2,5	15,9	1,5	20,7	0,27	19,1
Thr	1,7	10,8	0,4	5,2	0,12	8,5
Ser	1,6	10,2	0,4	5,2	0,19	13,4
Glu	2,4	15,3	1,2	15,6	0,16	11,3
Pro	0,4	2,5	1,2	15,6	0,16	11,3
Gly	1,8	11,5	0,9	11,7	0,17	12,0
Ala	0,7	4,5	0,4	5,2	0,07	4,9
Val	0,6	3,8	0,3	3,9	0,06	4,2
Ile+Leu	1,3	8,3	0,5	6,5	0,13	9,2
Tyr	0,6	3,8	0,5	6,5	0,05	3,5
Phe	0,5	3,2	0,5	6,5	0,06	4,2
Lys	1,2	7,6	0,7	9,1	0,07	4,9
His	0,4	2,6	0,2	2,6	0,03	2,1
Сумма	15,7	100	7,7	100	1,42	100
GlcNAc	1,14	7,3	0,24	3,1	0,07	4,9
GalNAc	0,02	0,1	Следы	—	Следы	—
Man	0,49	3,1	0,19	2,5	0,07	4,9
Fuc	0,12	0,8	0,05	0,6	0,02	1,4
Gal	0,55	3,5	0,17	2,2	0,06	4,2
Сумма	2,32	14,8	0,65	8,4	0,22	15,4

* Аминокислотный анализ — полуколичественный; Met, Cys, Arg не определяли. Приведено: А — общее количество аминокислот и углеводов в образце (мкмоль), Б — состав в молях на 100 моль определяемых аминокислот.

цепях гемагглютинина подтипа H2 вируса гриппа А/Япония/305/57 (H2N2) [14]. В NA на 400 аминокислотных остатков приходится около 60 моносахаридных остатков, т. е. 4 углеводные цепи, что соответствует литературным данным [15–17].

Таким образом, мы располагали образцами HA₁, HA₂ и NA в количестве ~45, 40 и 2 нмоль, что теоретически соответствует содержанию в них ~180, 40 и 8 нмоль углеводных фрагментов. Исходя из этого, а также учитывая неполное отщепление (50–70%) углеводных цепей и потери при очистке олигосахаридной фракции, можно было ожидать, что в случае NA, например, предстоит анализ смеси олигосахаридов на уровне нескольких нмоль. Минимальное количество индивидуального олигосахарида, обнаруживаемого с помощью УФ-детекции при 200 нм, составляет, как мы убедились ранее, около 0,1 нмоль. Следовательно, разделение смеси олигосахаридов из HA₁ можно было надежно контролировать, используя проточный УФ-детектор, однако для анализа олигосахаридов из HA₂, и тем более из NA, путем последовательной ВЭЖХ на двух колонках чувствительности этого метода детекции, принимая во внимание большую гетерогенность углеводных цепей, уже недостаточно.

Наиболее чувствительными способами детекции являются флуоресцентные и радиоизотопные методы анализа, позволяющие обнаруживать пикомольные количества органических соединений. В литературе имеются примеры использования 2-аминопиридиновой [18, 19] и 4-метилкумариновой [20] флуоресцентных меток для анализа углеводных фрагментов N-гликопротеинов. Мы решили использовать для этой цели меченные тритием олигосахариды, что обусловлено следующими причинами. Во-первых, введение изотопной метки не изменяет хроматографическое поведение олигосахаридов, и, следовательно, в качестве свидетелей можно было использовать немеченные олигосахариды, полученные нами ранее из доступных гликопротеинов [11, 12]. Во-вторых, для введения ³H-метки не требуется никаких дополнительных реакций, так как применяемый нами

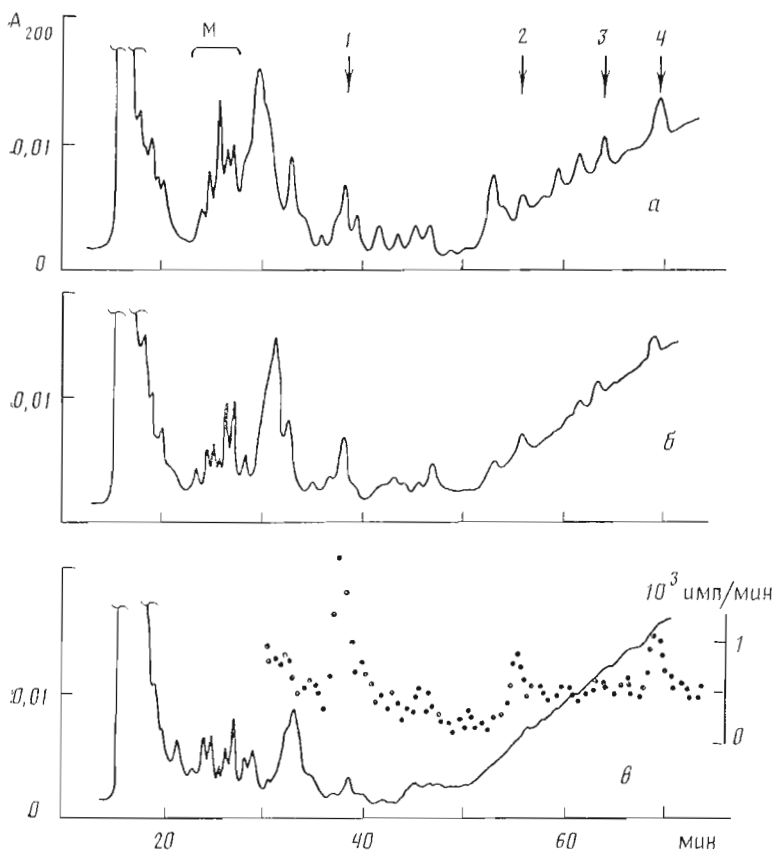


Рис. 1. ВЭЖХ олигосахаридных фракций из NA_1 (а), NA_2 (б) и NA (в) на колонке Ultrasphere-C8. Отмечены времена элюции олигоманнозидных цепей (М) и комплексных: биантенной нефукозилированной (1) и фукозилированной (2), триантенной фукозилированной (3), бисектной фукозилированной (4). Точками показана радиоактивность фракций

метод получения олигосахаридов включает стадию восстановления отщепившихся углеводных цепей [21].

Образцы NA_1 , NA_2 и NA обрабатывали щелочным раствором $LiBH_4$ в водном *tert*-бутиловом спирте, как описано ранее [22], и полученные после гель-хроматографии на сефадексе G-15 и ионообменной хроматографии смеси олигосахаридов восстанавливали $NaB[^{3}H]_4$, очищали на биоэле 2-6 и хроматографировали в отработанных ранее условиях [2, 22] на колонке Ultrasphere-C8 (рис. 1), прокалиброванной олигосахаридами с известным строением. При разделении смесей олигосахаридов из NA_1 и NA_2 оказалось вполне возможным обойтись лишь УФ-детекцией; соответствующие компоненты поэтому были собраны без просчета радиоактивности. Хроматография олигосахаридов из NA проводилась с двойной детекцией: записывалась кривая эволюции по УФ и одновременно собирались фракции (1 мл, 0,5 мин), в аликвотах которых (10 мкл) измеряли радиоактивность (рис. 1в). Как выяснилось, детекция по радиоактивности в применявшихся нами условиях хроматографии неэффективна для обнаружения близкондуцих и элюирующихся острыми пиками олигосахаридов (например, на 23–28 мин). Однако эти компоненты, соответствующие, как было установлено ранее [2, 22], олигоманнозидным цепям, достаточно хорошо регистрируются при проточной УФ-детекции. Для детекции комплексных (лактозаминных) цепей измерение радиоактивности во фракциях оказалось единственным способом их обнаружения, так как они содержались в количестве, которое не регистрируется УФ-детектором. Кроме того, выяснилось, что некоторые пики, видимые в УФ, могут быть «ложными» (например, пик на ~33 мин), поскольку они не содержат 3H -метки, т. е. не являются олигосахаридами.

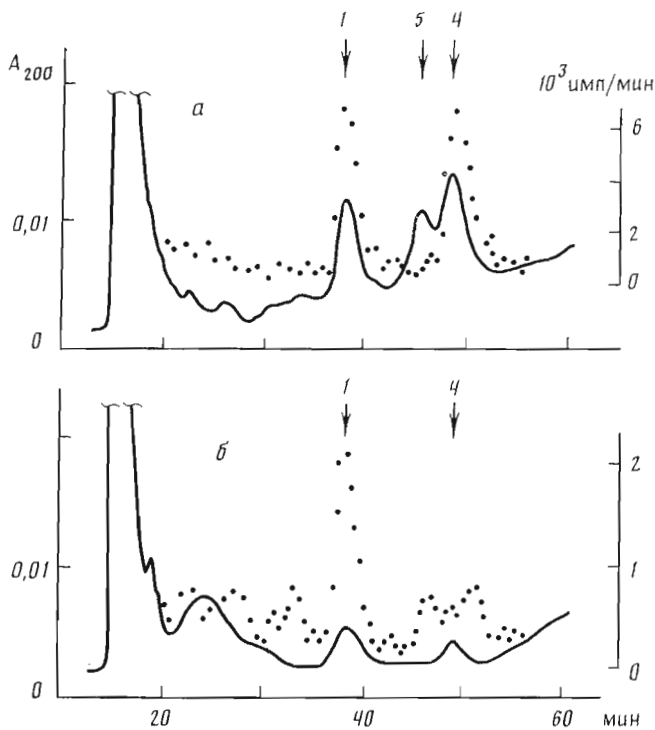


Рис. 2. ВЭЖХ олигосахаридов на колонке Zorbax-NH₂. Хроматография олигосахаридных фракций из НА₁ (а) и НА (б), элюирующихся на колонке Ultrasphere-C8 (рис. 1а, в) на 55-й и 38-й мин соответственно. 1, 4, 5 — времена элюции заведомых олигосахаридов, введенных в анализируемые образцы в качестве внутреннего стандарта (см. подпись к рис. 1)

Таким образом, с помощью ВЭЖХ на Ultrasphere-C8 из каждого образца гликопротеина было выделено большое число компонентов, для некоторых из них на основании совпадения по времени элюции со стандартными олигосахаридами можно предположить один или несколько вариантов структуры. Для более надежной идентификации полученные меченые олигосахариды далее хроматографировали на колонке Zorbax-NH₂ в условиях, применявшихся ранее [2, 4], при этом во всех случаях к анализируемому образцу добавляли в качестве внутреннего стандарта немеченые олигосахариды известного строения, полученные нами ранее [11, 12]. В качестве примера на рис. 2 приведена хроматография олигосахаридных фракций из НА₁ и НА. Олигоманнозидные фрагменты (фракция М, рис. 1), как нами неоднократно было показано [2, 22, 23], представляют собой набор структур, различающихся как числом остатков маннозы (от 5 до 9), так и их положением. Выделение каждого из них на колонке Ultrasphere-C8 связано с определенными трудностями, хотя и вполне осуществимо в других условиях хроматографии (при меньшей скорости элюции). В данном случае олигоманнозидные фракции хроматографировали на колонке Zorbax-NH₂ целиком, без разделения на отдельные компоненты.

Полученный из каждого гликопротеина в результате такой последовательной хроматографии набор олигосахаридов представлен в виде олигосахаридных карт (рис. 3). Олигосахариды, изображенные в виде пятен, расположены в соответствии с их хроматографическими параметрами, размер пятна отражает относительное содержание олигосахаридов, которое оценивалось по УФ-поглощению и радиоактивности.

Из сравнения олигосахаридных карт НА₁ и НА₂ видно, что для обоих фрагментов НА характерна высокая гетерогенность углеводных цепей: они содержат олигосахариды как олигоманнозидного, так и комплексного типа. Среди комплексных цепей идентифицированы: биантенная нефукозилированная (1, рис. 3) и фукозилированная (2) цепи, бисектная пе-

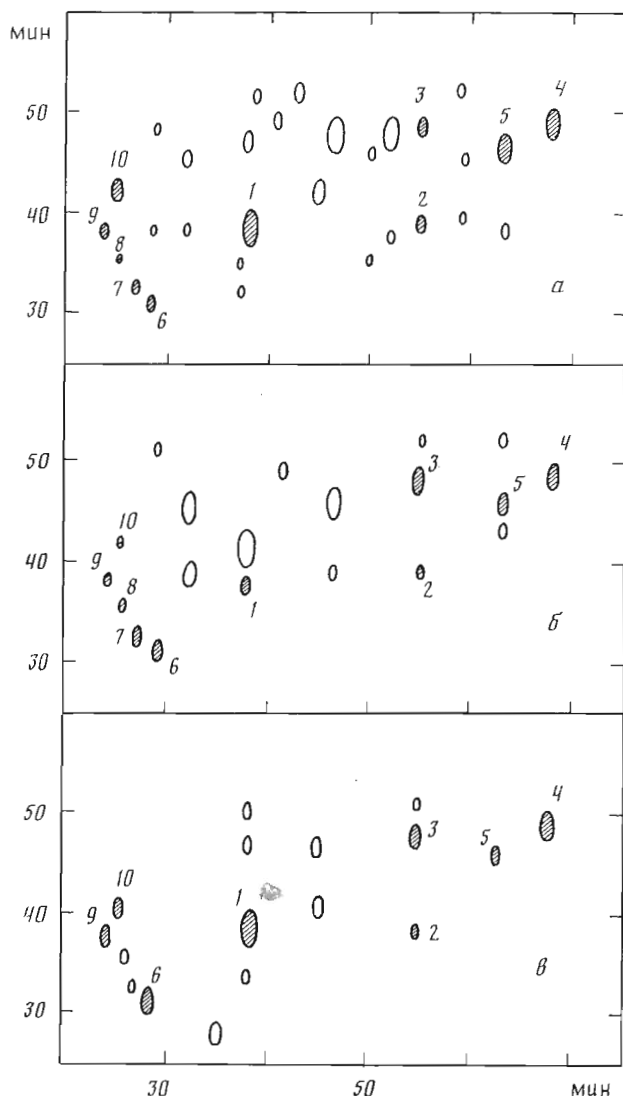


Рис. 3. Олигосахаридные карты HA_1 (а), HA_2 (б) и HA (в). По оси абсцисс и ординат — время элюции (мин) на колонках Ultrasphere-C8 и Zorbax-NH₂ соответственно. Цифрами отмечены идентифицированные олигосахариды; комплексные цепи: биантенная нефукозилированная (1) и фукозилированная (2), бисектная нефукозилированная (3) и фукозилированная (4), триантенная фукозилированная (5); олигоманнозидные цепи, содержащие 5, 6, 7, 8 и 9 остатков маннозы (олигосахариды 6, 7, 8, 9 и 10 соответственно)

фукозилированная (3) и фукозилированная (4) цепи, триантенная фукозилированная цепь (5). Олигоманнозидные цепи представлены большим набором структур, содержащих от 5 до 9 остатков маннозы, причем соотношение их в HA_1 и HA_2 сильно различается. В HA_1 главным является олигосахарид $Man_9GlcNAc_2$ (10), в меньшем количестве содержатся цепи с 8, 5 и 6 остатками маннозы (олигосахариды 9, 6 и 7 соответственно) и почти отсутствует $Man_7GlcNAc_2$ (8). В HA_2 , наоборот, преобладают структуры, содержащие 5–6 остатков маннозы.

Следует отметить, что обнаруженные в HA_1 и HA_2 олигосахаридные структуры были среди главных и в Н1- и Н3-гемагглютинаинах, изучавшихся ранее методом олигосахаридных карт [2, 4]. В то же время они отличаются от углеводных цепей HA из вируса А/Ленинград/385/80 (Н3N2), для которого характерны в основном недостроенные триантенные цепи [3, 24]. Ряд олигосахаридов, в том числе многие минорные, не удалось

идентифицировать из-за отсутствия необходимых свидетелей. Поскольку в настоящее время нет строго установленной зависимости хроматографических свойств олигосахарида от его строения, пока трудно обсуждать какие-либо варианты структур. Можно лишь предполагать, что большинство из них не фукозилированы и содержат до 10 и более моносахаридных остатков.

Как уже отмечалось выше, по литературным данным [14–17], а также результатам анализа выделенных нами гликопротеинов HA_1 , содержит 4 сайта гликозилирования, поэтому обнаруженное нами разнообразие олигосахаридных структур в какой-то мере объяснимо. Более интересным является наличие большого числа углеводных цепей различного типа в HA_2 , имеющем лишь один сайт гликозилирования. Такой же результат был получен и при анализе углеводных цепей HA_1 и HA_2 гемагглютинина вируса А/Ленинград/385/80 (H3N2) [3, 22]. При изучении гемагглютинина подтипа H1 это также наблюдалось, хотя в этом случае нам не удалось выделить HA_1 и HA_2 в чистом виде вследствие неизбирательного протеолиза HA [2, 4]. Таким образом, тяжелая и легкая цепи HA , несмотря на большую разницу в числе сайтов гликозилирования, содержат похожий набор углеводных фрагментов, различаясь в то же время по соотношению олигосахаридов и наличию отдельных, пока неидентифицированных структур. Присутствие в HA_2 такого большого набора как олигоманнозидных, так и комплексных цепей не соответствует представлению о «сайт-специфичном» гликозилировании [1, 5, 25], согласно которому в каждом сайте гликозилирования находится один или несколько незначительно различающихся типов углеводных структур (различия в термминации). Не подтверждают также данные о том, что в единственном сайте HA_2 находится углеводная цепь комплексного типа [1, 5]. Стоит отметить, что такое представление основано лишь на моносахаридном составе гликопептидов, содержащих один сайт гликозилирования, который может не отражать реальной гетерогенности углеводных фрагментов в этом сайте. Очевидно, только при детальном анализе всех находящихся в данном сайте олигосахаридных фрагментов можно сделать обоснованное заключение о сайт-специфичном распределении углеводных цепей в гликопротеине.

Данные о структуре углеводных цепей NA практически отсутствуют, определен лишь углеводный состав триптических гликопептидов NA вируса А/Токуо/3/67 (H2N2), на основании которого авторами сделан вывод о том, что в двух сайтах (Asn-86 и Asn-200) находятся олигоманнозидные цепи, а в двух других сайтах (Asn-146 и Asn-234) — лактозаминные цепи [26]. Заметим, однако, что этот вывод не вытекает из приведенных в этой работе данных, которые допускают возможность наличия в каждом из четырех сайтов как олигоманнозидных, так и комплексных цепей, но в различном соотношении. Нам показано, что для NA подтипа N2 характерна высокая гетерогенность углеводных фрагментов, хотя и менее значительная, чем для HA (рис. 3). Среди олигоманнозидных цепей обнаружены структуры, содержащие от 5 до 9 остатков маннозы, причем находятся они в близком соотношении, главным среди олигосахаридов такого типа является $Man_5GlcNAc_2$. Из комплексных цепей преобладает биантенная нефукозилированная (1), в меньшем количестве имеются бисектные (3, 4) и триантенная (5) цепи. Поскольку идентификация олигосахаридов из NA проводилась с детекцией исключительно по радиоактивности, что значительно осложняет работу, многие минорные фракции подробно не анализировались, и, следовательно, набор олигосахаридных фрагментов NA не исчерпывается представленным на рис. 3. В целом по структуре и разнообразию углеводных цепей NA мало отличается от HA .

Таким образом, в результате проведенного исследования идентифицированы многие главные олигосахаридные фрагменты в HA_1 - и HA_2 -цепях гемагглютинина и нейраминидазы. Это первые данные о структуре углеводных цепей нейраминидазы и гемагглютинина подтипа H2. Очень важным следует признать тот факт, что анализ олигосахаридов из NA был проведен на уровне 2 нмоль ($\sim 0,1$ мг) гликопротеина. Это показывает, что применяемый нами хроматографический подход к анализу углеводных

18. Tomiya N., Awaya J., Kurono M., Endo S., Arata Y., Takahashi N. // *Analyt. Biochem.* 1988. V. 171. № 1. P. 73-90.
19. Ishii J., Takahashi N., Kato S., Akamatsu N., Kawazoe Y. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 345. № 1. P. 134-139.
20. Шилян С. Д., Насонов В. В., Маркин В. А., Беляничков И. М. // *Биоорганич. химия.* 1988. Т. 14. № 9. С. 1197-1207.
21. Лихошерстов Л. М., Новикова О. С., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 274. № 1. С. 222-225.
22. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Лихошерства Л. М., Сенченкова С. Н., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // *Биоорганич. химия.* 1985. Т. 11. № 6. С. 837-844.
23. Арбатский Н. П., Шашков А. С., Желтова А. О., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // *Биоорганич. химия.* 1985. Т. 11. № 11. С. 1556-1561.
24. Арбатский Н. П., Желтова А. О., Юртов Д. В., Деревицкая В. А., Кочетков Н. К. // *Биоорганич. химия.* 1986. Т. 12. № 8. С. 1111-1117.
25. Schwarz R. T., Klenk H.-D. // *Virology.* 1981. V. 113. № 2. P. 584-593.
26. Ward C. W., Murray J. M., Roxburgh C. M., Jackson D. C. // *Virology.* 1983. V. 126. № 2. P. 370-375.

Поступила в редакцию
15.V.1989

**THE STRUCTURE OF OLIGOSACCHARIDE FRAGMENTS
OF GLYCOPROTEINS FROM INFLUENZA VIRUS
A/KRASnodAR/101/59 (H2N2): HEAVY AND LIGHT CHAINS
OF HEMAGGLUTININ AND NEURAMINIDASE**

ARBATSKY N. P., ZHELTOVA A. O., YURTOV D. V., DEREVITSKAYA V. A.,
KOCHETKOV N. K.

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

The structure and heterogeneity of carbohydrate chains of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), the surface glycoproteins of influenza virus A/Krasnodar/101/59 (H2N2), were investigated. Hemagglutinin was reduced with β -mercaptoethanol and its heavy (HA₁) and light (HA₂) chains were separated by gel chromatography. Amino acid and sugar composition of HA₁, HA₂ and NA was elucidated. The carbohydrate chains of the glycoproteins were cleaved off by the alkaline LiBH₄ treatment and oligosaccharides were reduced with NaB[³H]₄. They were fractionated by subsequent two-step HPLC on Ultrasphere-C8 and Zorbax-NH₂ columns with simultaneous identification using nonlabelled oligosaccharides of known structures. Some of the major oligosaccharides isolated from HA₁, HA₂ and NA were thus identified as high mannose chains, containing 5-9 mannose residues, and complex chains, first of all biantennary chains having or not having bisecting N-acetylglucosamine and/or fucose residues. The approach which has been developed enables one to study the structure and heterogeneity of carbohydrate chains starting from one nmole of a desialylated N-glycoprotein.