



УДК 547.458.1:543.424

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ В α_1 -КИСЛОМ ГЛИКОПРОТЕИНЕ И ПСЕВДОГЛИКОПРОТЕИНАХ ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

© 1998 г. В. А. Олейников[#], А. В. Феофанов, С. Д. Шиян, А. Б. Тузиков, Е. Ю. Крюков,
А. И. Януль, Н. В. Бовин, И. Р. Набиев

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 21.11.97 г. Принята к печати 04.03.98 г.

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) применена для исследования особенностей структурной организации углеводных цепей в составе гликоформ α_1 -кислого гликопротеина (АГП) и в псевдогликопротеинах, полученных количественным перенесением углеводных цепей АГП на полиакриламидный носитель. Обнаружено, что имеющие высокую иммуномодулирующую активность гликоформа АГП-D и псевдогликопротеины, содержащие три и более гликанов на молекулу, характеризуются специфической пространственной организацией углеводных цепей. Показано, что данная структурная организация поддерживается взаимодействием соседних гликанов друг с другом и не зависит от природы носителя (полипептидная цепь или полиакриламид).

Ключевые слова: сиаловые кислоты, неогликоконъюгаты, псевдогликопротеины, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния, ГКР.

α_1 -Кислый гликопротеин (АГП) относится к белкам острой фазы, играющим важную роль в процессах адаптации иммунной системы к стрессорным воздействиям. АГП является природным иммуномодулятором, присутствующим в плазме периферической крови как в норме, так и при патологических состояниях (острые инфекции, неоплазии, аллергия, ожоговая болезнь), причем в последнем случае уровень АГП в крови может в 2–5 раз превышать нормальные показатели [1, 2]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что при развитии патологического процесса происходит не только количественное возрастание уровня АГП в крови, но и изменение структуры углеводных цепей этого гликопротеина и, как следствие, характера его биологической активности [2–5]. Показано, что конъюгаты углеводных цепей АГП с полиакриламидом (псевдо-АГП, пАГП) сохраняют иммуномодулирующую способность природного АГП [5, 6]. Это доказывает, что им-

муномодулирующие способности АГП определяются его углеводной частью.

В α_1 -кислом гликопротеине пять сайтов гликозилирования [7]. Углеводный компонент представлен Asn-связанными цепями лактозаминового типа с разной степенью ветвления (четырёх-, трёх- и двухантенными, рис. 1). Терминальными группами являются сиаловые кислоты (Sia), присоединённые к остатку Gal в положении 3 или 6. Однако только двухантенные гликаны в составе АГП полностью сиалированы. В четырёх- и трёхантенных цепях степень сиалирования не превышает 50%. Каждый сайт гликозилирования содержит определённый набор гликанов [8, 9]: для сайта I характерны двух- и трёхантенные цепи, последние могут содержать или не содержать фукозу; сайт II кроме перечисленных может содержать нефукозилированные четырёхантенные цепи; к сайтам III–V присоединяются преимущественно трёхантенные и фукозилированные или нефукозилированные четырёхантенные цепи (рис. 1). Варибельность гликанов по каждому сайту определяет существование в плазме крови ряда гликоформ АГП, различающихся соотношением углеводных цепей разной антенности (табл. 1) [3, 7]. Известно, что гликоформы АГП имеют разную иммуномодулирующую активность [5, 10–14].

Сокращения: КР – комбинационное рассеяние, ГКР – гигантское КР, Sia – сиаловая кислота, Neu5Ac α Me – α -метилгликозид N-ацетилнейраминовой кислоты, АГП – α_1 -кислый гликопротеин, пАГП – псевдо-АГП: конъюгаты полиакриламида с углеводными цепями АГП в виде гликозиламинов (пАГП-1) и аминокальдитолов (пАГП-2), ПК – полиакриловая кислота.

[#]Автор для переписки (тел./факс: (095) 336-17-66, e-mail: raman@siobc.ras.ru).

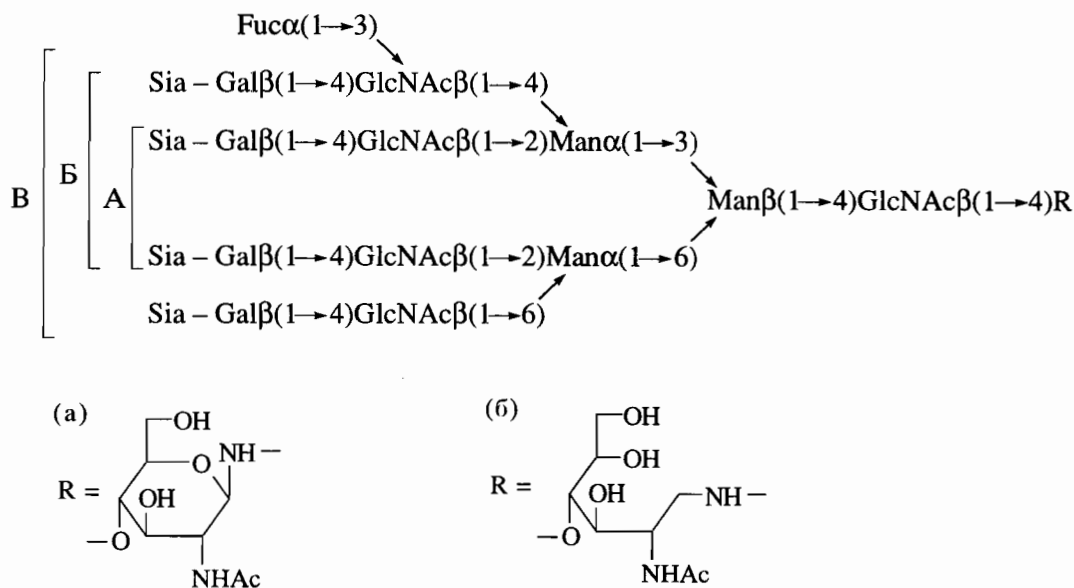


Рис. 1. Углеводные цепи α_1 -кислого гликопротеина (АГП) различной антенности и способы их присоединения к полимерной матрице: (а) – через жесткое циклическое пиранозное звено, псевдогликопротеины типа пАГП-1-*N*; (б) – через гибкое ациклическое звено, псевдогликопротеины типа пАГП-2-*N* (*N* – среднее число гликанов на одной молекуле пАГП). А, Б, В – двух-, трех- и четырехантенные цепи соответственно.

На основании данных, полученных методами рентгеновского рассеяния, малоуглового рассеяния нейтронов и оценки гидродинамических свойств гликоформ АГП [15], установлено, что пространственная упаковка углеводного компонента этого гликопротеина меняется в зависимости от степени разветвленности (антенности) его углеводных цепей. Преимущественное содержание четырех- и трехантенных цепей обуславливает компактную конформацию, при которой гликаны развернуты по касательной к поверхности белковой глобулы, и поэтому молекула АГП имеет малый диаметр. При этом гликаны покрывают до 40-60% поверхности белковой глобулы. У гликоформы с более высоким содержанием двухантенных цепей гликаны ориентированы от белковой глобулы в направлении водной фазы и их контакт с поверхностью белковой части молекулы ограничен сайтом гликозилирования. Диаметр таких молекул АГП значительно больше, чем у гликоформ АГП с компактной конформацией гликанов [15]. Авторы работы [15] предположили, что компактность углеводных цепей поддерживается связями между белковой и углеводной частями молекул. Эти связи более характерны для гликоформ АГП с четырех- и трехантенными цепями и отсутствуют в молекулах с менее разветвленными гликанами.

Несмотря на прогресс, достигнутый в понимании роли углеводов в биологической активности АГП [5], остается неясным ряд вопросов о влия-

нии первичной структуры гликанов и их пространственной организации на процессы специфического взаимодействия АГП с клеточной поверхностью, а также о роли конкретных участков углеводных цепей в этих процессах.

В данной работе особенности структурной организации гликанов в составе АГП, его гликоформ, а также в псевдогликопротеинах на основе углеводных цепей АГП исследованы методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) света. Метод ГКР обеспечивает высокую чувствительность (до 10^{-5} М) и селективность регистрации колебательных спектров остатков сиаловых кислот в составе гликозидов,

Таблица 1. Содержание углеводных цепей различной антенности в АГП и его гликоформах, выделенных хроматографией на Соп-А-сефарозе

Гликоформы	Содержание сиалированных углеводных цепей, %			Содержание Sia, %
	Антенность			
	ди-	три-	тетра-	
АГП	10	40	50	9.8
АГП-А	–	50	50	10.0
АГП-В	20	40	40	9.5
АГП-С	40	30	30	9.0
АГП-Д	60	20	20	8.5

сиалоолигосахаридов, гликопротеинов, неогликоконъюгатов и клеточных мембран [16–20]. Сиаловая кислота является определяющим терминальным звеном, обеспечивающим распознавание и связывание гликанов во многих биологических процессах [21]. Показано, что интенсивность спектра ГКР характеризует доступность Sia для взаимодействия со стороны водной фазы и конформационную свободу Sia, т.е. способность подстраиваться за счет гибкости углеводных цепей и/или полимерной (полипептидной) цепи носителя для эффективного взаимодействия с поверхностью [19, 20]. Спектроскопия ГКР – один из немногих методов, позволяющих исследовать структурные особенности сиалированных углеводных цепей в составе сложных биологических молекул и биополимеров.

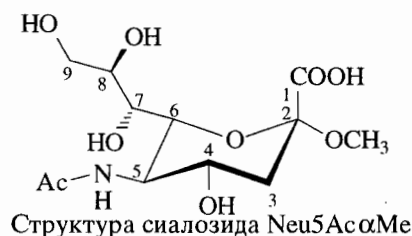
В данной работе проведено сравнительное изучение АГП, его гликоформ и псевдогликопротеинов, в которых углеводные цепи АГП перенесены на полиакриламид [5, 6]. Замена полипептидной цепи на полиакриламид позволила оценить влияние белкового кодра на пространственную организацию углеводных цепей. Роль взаимодействий соседних гликанов изучали, варьируя расстояния между ними (используя неогликоконъюгаты с различной плотностью расположения гликанов на полимерном носителе). Исследовались два типа псевдо-АГП: с присоединением гликанов в их нативном состоянии, т.е. с концевым остатком GlcNAc в форме гликозиламина (пАГП-1-*N*, рис. 1а), и в виде аминокислот, в которых восстанавливающее звено GlcNAc имеет ациклическую (раскрытую) форму (пАГП-2-*N*, рис. 1б), здесь *N* – среднее число гликанов, приходящееся на одну молекулу полимера. Такая вариация способа присоединения гликанов к полимерному носителю позволила оценить роль гибкости внутренних фрагментов в пространственной организации углеводных цепей.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА ГКР И ЕГО ОСОБЕННОСТЕЙ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ИССЛЕДОВАНИЮ СИАЛИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛ

Эффект ГКР реализуется при адсорбции молекул на специальным образом подготовленной серебряной поверхности [22]. Поверхность серебра обеспечивает усиление сигнала КР молекул в миллион и более раз по сравнению с интенсивностью КР в растворе. В случае сложных биологических молекул, не содержащих в своем составе хромофоров, эффект ГКР наблюдается только для молекулярных группировок, непосредственно адсорбированных или находящихся на расстоянии не более 10 Å от ГКР-активной поверхности [23]. Удаленные от поверхности и заглублен-

ные внутрь высокомолекулярного соединения группировки дают только фоновый неусиленный сигнал КР.

Обнаружено, что использование в качестве ГКР-активной системы цитратного гидрозоля серебра позволяет селективно регистрировать ГКР-спектры Sia в составе биологических молекул и биополимеров [16–20]. Для ряда сиалозидов и сиалированных гликоконъюгатов показано, что Sia экспонированы в раствор и обладают достаточной конформационной свободой, чтобы обеспечить одинаковые для этих сиалированных молекул ориентацию Sia и тип взаимодействия с ГКР-активной поверхностью [19, 20]. При этом плоскость, в которой лежит карбоксильная группа, ориентирована по нормали (или под небольшим углом к нормали) к поверхности золевой частицы. Гидроксильные группы триольного фрагмента C7–C9 принимают участие в адсорбции на ГКР-активной поверхности, определяя как ее эффективность, так и специфическую ориентацию молекулы сиалозида, при которой ацетамидная группа оказывается сближенной с поверхностью и ОСNH-фрагмент фиксируется либо в *транс*- (70–90%), либо в *цис*-конформации (30–10%).



Агликон удален от поверхности и слабо влияет на адсорбционные свойства сиалозида. Сиаловые кислоты, находящиеся в описанной выше конформации, имеют характерный спектр ГКР, в котором доминируют линии колебаний ацетамидной и карбоксильной групп, а также пиранозного цикла (рис. 2б, в; табл. 2).

ГКР-спектры АГП (рис. 2а) и его гликоформ в значительной степени отличаются от спектров ГКР сиалозидов, исследованных ранее [16–20] (рис. 2б, в). Может быть несколько причин этих отличий, включая экранированность Sia, усиление в спектрах колебаний молекулярных групп, принадлежащих белковой части молекулы, иную пространственную организацию углеводной части АГП, определяемую структурой гликанов или взаимодействиями углеводных цепей между собой и/или с белковой частью. Для выяснения этих причин проведен детальный сравнительный анализ спектров ГКР и сделано отнесение линий, усиливающихся в спектрах.

Высокая интенсивность ГКР-сигнала АГП (рис. 2а) указывает на эффективность адсорбции этого гликопротеина на ГКР-активной поверхно-

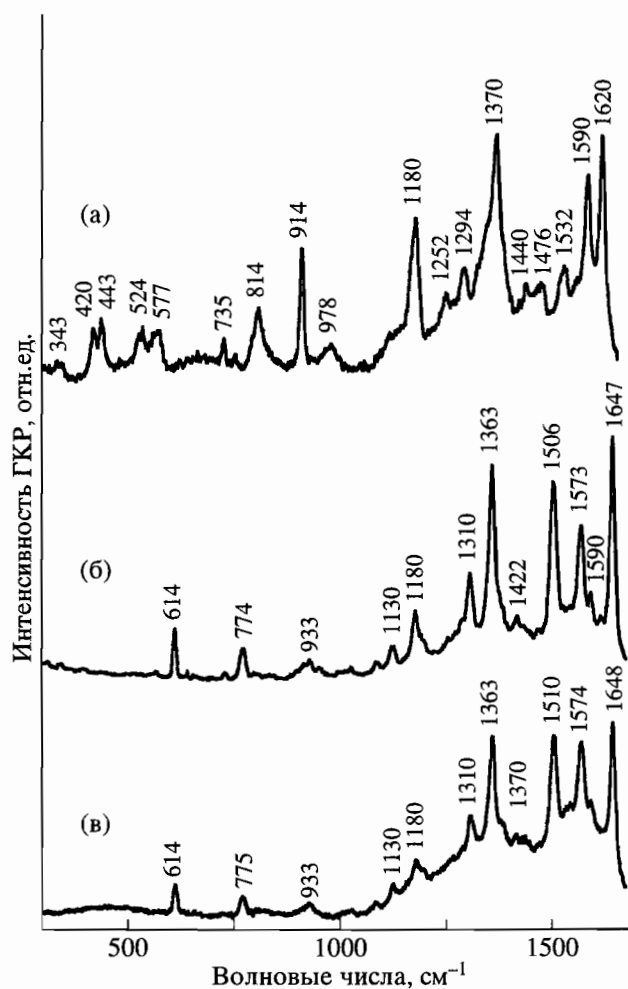


Рис. 2. Спектры ГКР: (а) – α_1 -кислого гликопротеина (концентрация 2 мг/мл); (б) – α -метилгликозида N-ацетилнейраминовой кислоты (концентрация 1 мМ); (в) – синтетического полимерного гликоконъюгата с боковыми цепями Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-, присоединенными к полиакриловой кислоте; содержание сиалированных углеводных цепей – 25 моль%, концентрация по Sia – 1 мМ.

сти. Ранее было показано, что десилированный АГП интенсивного спектра ГКР не дает [17]. Это означает, что связывание АГП с поверхностью гидрозоля серебра происходит при участии Sia. Однако набор линий, усиливающихся в спектре АГП, иной по сравнению, например, со спектром α -метилгликозида N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac α Me; рис. 2б). Для того чтобы выяснить природу колебаний, усиливающихся в спектре АГП, были записаны спектры ГКР псевдогликопротеинов типа пАГП-1 с различным содержанием (плотностью) гликанов на полиакриламиде (рис. 3а, б).

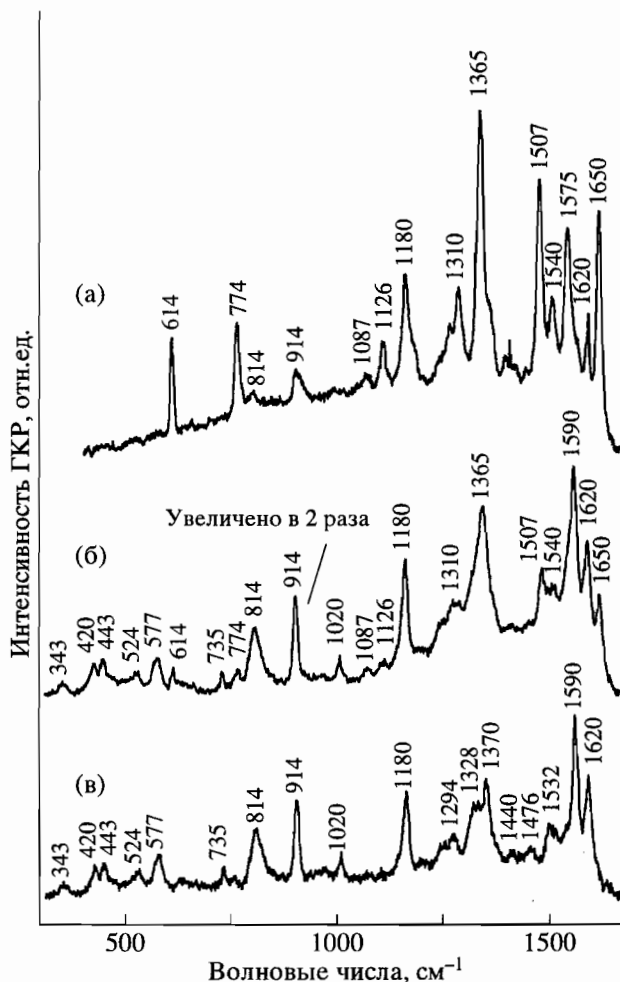


Рис. 3. Спектры ГКР: (а) – псевдогликопротеина пАГП-1-1, содержащего одну углеводную цепь; (б) – пАГП-1-5 с пятью углеводными цепями (увеличен в 2 раза); (в) – разностный спектр пАГП-1-5 с пАГП-1-2. Концентрация конъюгата 1 мг/мл.

СПЕКТРЫ ГКР ПСЕВДОГЛИКОПРОТЕИНОВ пАГП-1. ОЦЕНКА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ пАГП-1

В ГКР-спектрах пАГП-1-1, содержащего в среднем одну углеводную цепь (рис. 3а), присутствует набор интенсивных линий (1650, 1575, 1507, 1365, 1310, 1180, 1126, 774 и 614 см^{-1}), характерный для Sia в составе моносиалозидов (рис. 2б) или неогликоконъюгатов с неразветвленными боковыми углеводными цепями на полиакриловой кислоте (рис. 2в). Увеличение содержания углеводных цепей до 3-5 на молекулу в пАГП-1-3 и пАГП-1-5 приводит к значительному (в 8-10 раз) снижению интенсивностей линий этой группы и появлению нового набора линий преимущественно в низкочастотной (200-1000 см^{-1}) области ГКР-

Таблица 2. Интерпретация колебаний в спектрах ГКР и КР*

АГП	Спектры ГКР		α-Метил-гликозид N-ацетилнейраминовой кислоты [19]	КР-спектр α-D-глюкозы [27]	Соотнесение линий в спектрах ГКР (по данным работы [19])
	пАГП-1-5	пАГП-2-5			
	1650m	1650vs	1647vs		<i>ц</i> -Амид I
1620vs	1620m	1620w	1625w		<i>т</i> -Амид I
1590s	1590s	1590sh	1596w		$\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$
		1575vs	1573s		<i>т</i> -Амид II
1532m	1540vw	1540w			$\delta(\text{CONH}), \delta(\text{CCH})$
	1507m	1507vs	1506vs		<i>ц</i> -Амид II
1476m				1461s	
1440m			1422w		$\delta(\text{CONH}), \delta(\text{CCH}), \delta(\text{OCH})$
1370vs	1365s	1365vs	1363vs	1373s	$\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$
1328sh	1310sh	1310s	1310m		<i>т</i> -Амид III
1294m				1278m	
1180s	1180s	1180s	1180m	1180s	$\delta(\text{OCH}), \delta(\text{CCH})$
	1126vw	1126m	1130m	1130vs	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{OC})$
				1071vs	
	1020w		1028w		$\nu(\text{OC}), \nu(\text{CC})$
978w					$\delta(\text{CCO}), \delta(\text{CCH}), \delta(\text{OCH})$
		933m	933w		$\nu(\text{ClO}_4^-)$
914s	914s	914w		913s	
				898s	
				847s	
814m	814s	814w			$\delta(\text{CCO}), \delta(\text{CCH}), \delta(\text{OCH})$
	774w	774m	774m	771m	$\delta(\text{CCO}), \delta(\text{CCH}), \delta(\text{OCH})$
735w	735m				
	614w	614m	614m		$\delta(\text{COO}^-)$
577m	577m				
524m	524w			514vs	
443m	443m			443s	
420m	420m			423s	
343w	343w			341m	

* Интенсивности линий: vw – очень слабая, w – слабая, m – средняя, s – сильная, vs – очень сильная, sh – плечо; *ц* и *т* – *цис*- и *транс*-конформации ацетамидной группы.

спектра (рис. 3б). При этом разностный спектр, полученный вычитанием спектра пАГП-1-1 из спектра пАГП-1-5 при нормировке по линии 1650 см^{-1} (рис. 3в), воспроизводит основные особенности спектра природного АГП (рис. 2а).

Таким образом, вид ГКР-спектра пАГП-1-*N* изменяется с изменением плотности гликанов на полиакриламиде. При низкой плотности углеводов псевдогликопротеин взаимодействует с поверхностью золевых частиц через Sia, а все другие углеводные фрагменты, кроме терминальных

Sia, удалены от ГКР-активной поверхности. Ориентация Sia в составе пАГП-1-1 и характер ее взаимодействия с ГКР-активной поверхностью очень сходны с описанными выше для Neu5Ac α Me, конъюгата Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc- с полиакриловой кислотой (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-ПК) и некоторых других сиалозидов и неогликоконъюгатов, что следует из сходства спектров ГКР (рис. 2б, в; рис. 3а).

В составе пАГП-1 с более высоким содержанием углеводов (3–5 на молекулу) гликаны имеют

два типа пространственной организации. Часть гликанов сохраняет пространственную организацию, характерную для пАГП-1-1. Другая часть организуется в ансамбль, присущий углеводным цепям в составе природного АГП. Снижение в 8–10 раз интенсивностей линий 1650, 1575, 1507, 774, 614 см^{-1} и др. указывает на то, что пространственное расположение, характерное для углеводных цепей в составе АГП, принимает большая часть гликанов пАГП-1-5. Таким образом, природа носителя (полипептидная цепь или полиакриламид) не оказывает принципиального влияния на пространственную организацию углеводных цепей АГП. Структурная организация углеводов в значительной степени зависит от плотности их расположения на носителе, что позволяет предположить взаимное влияние гликанов друг на друга и доминирующую роль углевод-углеводных взаимодействий. Среди факторов, определяющих формирование пространственной структуры гликанов в составе АГП или пАГП-1-*N*, могут быть также длина углеводных цепей и их антенность. В случае “одноантенных” цепей трисахаридов ни для одного из исследованных нами неогликоконъюгатов пространственная организация, присутствующая гликанам в составе АГП или в составе пАГП-1-5, не наблюдалась [20].

ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ АГП С ГКР-АКТИВНОЙ ПОВЕРХНОСТЬЮ

Анализ ГКР-спектров позволяет определить, какие именно молекулярные группы экспонированы в раствор и сближены с ГКР-активной поверхностью, и, таким образом, охарактеризовать пространственную организацию углеводных цепей в составе АГП. Из сравнения ГКР-спектра АГП (рис. 2а) и разностного спектра, полученного вычитанием спектра пАГП-1-1 из спектра пАГП-1-5 (рис. 3в), следует, что колебания, усиливающиеся в спектре АГП, относятся к его углеводной, а не белковой части.

Ранее нами было показано, что линии 1590, 1370 и 614 см^{-1} относятся к колебаниям $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$, $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$ и $\delta(\text{COO}^-)$ карбоксильной группы Sia соответственно [19]. Положение линии 1370 см^{-1} колебания $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$ свидетельствует о непосредственном взаимодействии карбоксильной группы Sia с ГКР-активной поверхностью [19]. Значительное уменьшение отношения интенсивностей линий $\nu_{\text{sym}}(\text{COO}^-)$ и $\nu_{\text{asym}}(\text{COO}^-)$ в спектре АГП по сравнению со спектром Neu5Ac α Me (рис. 2б), а также исчезновение линии $\delta(\text{COO}^-)$ указывают на изменение ориентации карбоксильной группы. В АГП и пАГП-1-5 карбоксильная группа ориентирована под большим углом к нормали к ГКР-активной поверхности (моносиалозиды адсорбируются на поверхности серебря-

ной частицы так, что карбоксильная группа ориентирована практически по нормали к поверхности [19]).

По сравнению со спектром Neu5Ac α Me (рис. 2б) в спектре АГП отсутствуют линии 1647, 1507 и 1310 см^{-1} , соответствующие колебаниям ацетамидной группы Sia в *цис*-конформации (табл. 2), но усиливается линия 1620 см^{-1} , которая была отнесена к колебанию т-Амид I ацетамидной группы в *транс*-конформации [19]. Следовательно, в составе углеводных цепей АГП ацетамидная группа Sia находится в *транс*-конформации, которая характерна для *N*-метилацетамида [24] и Neu5Ac α Me [25] в растворе. Интенсивность линии 1573 см^{-1} колебания т-Амид II в спектре АГП резко ослабляется. Это указывает на изменение ориентации ацетамидной группы Sia по отношению к ГКР-активной поверхности, а следовательно, и к водной фазе. Обычно для спектров КР вторичных амидов характерна слабая линия Амид II [26].

Для линий, усиливающихся в низкочастотной части спектров АГП и пАГП-1-5 300-1000 см^{-1} , наблюдается значительное сходство с КР-спектром глюкозы [27], и их следует отнести к колебаниям пиранозного цикла (табл. 2). Эти колебания не проявляются в спектре Neu5Ac α Me и пАГП-1-1. Появление линий колебаний пиранозного цикла может быть обусловлено как изменением ориентации цикла Sia, так и сближенностью пиранозных циклов других моносахаридов с ГКР-активной поверхностью.

Таким образом, ориентация Sia в составе АГП, пАГП-1-3 и пАГП-1-5 иная, чем в пАГП-1-1, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-ПК и ряде других конъюгатов [20]. Эта ориентация обеспечивается углеводными цепями АГП и поддерживается за счет взаимного влияния соседних гликанов. В составе АГП и пАГП-1-5 реализуется жесткая структурная организация гликанов, которая не позволяет Sia менять свою ориентацию и подстраиваться для более эффективного взаимодействия с ГКР-активной поверхностью, как это происходит в случаях Neu5Ac α Me в растворе, конъюгата Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-ПК и ряда других неогликоконъюгатов, включая пАГП-1-1.

Необходимо также отметить, что сами по себе углеводные цепи, отделенные от пептидного кодра АГП, содержащие четырех-, трех- и двухантенные цепи в соотношении, эквивалентном их содержанию в нативном АГП, дают интенсивный спектр ГКР (рис. 4в), существенно отличающийся как от ГКР-спектров полиакриламидных конъюгатов, так и от спектра собственно АГП. Таким образом, эти олигосахариды эффективно адсорбируются на поверхности гидрозоля, однако геометрия адсорбции иная по сравнению с адсорбцией других сиалозидов. В отличие от углеводных

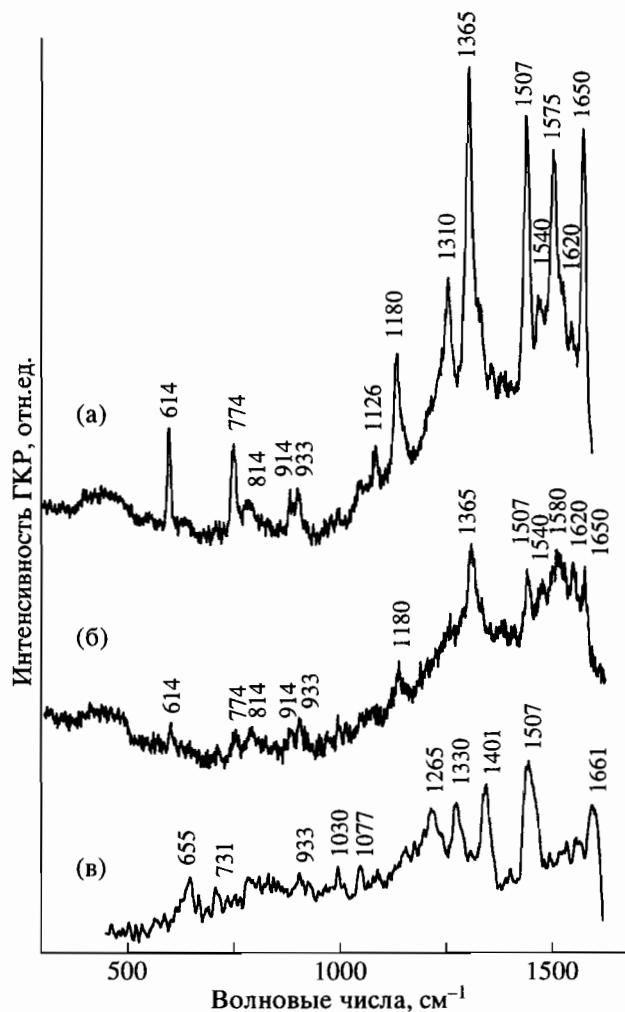


Рис. 4. Спектры ГКР: (а) – псевдогликопротеина пАГП-2-5; (б) – пАГП-2-2; (в) – свободных углеводных цепей АГП. Концентрация 1 мг/мл.

цепей АГП исследованные нами ранее [19] неразветвленные олигосахариды Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc и Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4Glc адсорбируются на ГКР-активной поверхности только через Sia и дают спектр, идентичный (за исключением интенсивности) спектру Neu5AcMe и конъюгатам этих олигосахаридов на полиакриловой кислоте (рис. 2б, в). Вероятно, разветвленность углеводных цепей АГП обуславливает влияние на Sia других моносахаридных остатков, которые и дают доминирующий вклад в спектр ГКР.

ВЛИЯНИЕ ГИБКОСТИ СОЕДИНЕНИЯ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ С ПОЛИМЕРНЫМ НОСИТЕЛЕМ В ПАГП НА ИХ ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ

Мы исследовали два типа псевдогликопротеинов: с присоединением углеводных цепей к поли-

меру через звенья GlcNAc в их природной пиранозной форме (пАГП-1, рис. 1а) и в форме аминокальдитолов (пАГП-2, рис. 1б). Ранее было показано, что эти два типа конъюгатов различаются по иммуномодулирующей активности [5, 6]. При этом следует подчеркнуть, что звено, соединяющее углеводные цепи с полимером-носителем (единственное отличие конъюгатов), находится далеко от периферии молекулы и недоступно для прямого контакта с поверхностью.

Зависимость ГКР-спектров псевдогликопротеинов типа пАГП-2 от содержания гликанов на полимере иная, чем для пАГП-1. В ГКР-спектре пАГП-2-2 присутствуют линии 1650 и 1620 cm^{-1} (рис. 4б), что указывает на два разных способа адсорбции Sia в составе пАГП-2-2 в зависимости от пространственной организации гликанов. Часть гликанов имеет пространственную организацию, при которой Sia экспонированы в раствор и могут принимать конформацию, характерную для Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc-ПК и пАГП-1-1. Другая часть гликанов имеет конформацию, присущую углеводным цепям в составе АГП.

По мере увеличения количества углеводных цепей в пАГП-2 доля гликанов, имеющих пространственную организацию природного АГП, резко уменьшается, на что указывает усиление линий 1650 и 1507 cm^{-1} относительно линии 1620 cm^{-1} (рис. 4а), т.е. имеет место эффект, противоположный наблюдаемому для АГП-1. Псевдогликопротеины типа пАГП-1-5 и пАГП-2-5, содержащие по 5 углеводных цепей, имеют молекулярную массу, близкую к АГП, и характеризуются тем же соотношением гликанов разной структуры, что и сам АГП [5, 6]. Однако, как следует из данных спектроскопии ГКР, пространственная организация углеводов в составе этих конъюгатов различается. Только для пАГП-1-5 реализуется структурная организация гликанов, сходная с АГП. По-видимому, жесткая циклическая (пАГП-1) или гибкая ациклическая (пАГП-2) форма Asp-связанного остатка GlcNAc оказывает значительное влияние на структурную организацию углеводных цепей и, как результат, на их взаимодействие между собой. Это согласуется с данными теоретического конформационного анализа [28], согласно которым Asp-связанный остаток GlcNAc влияет на величину угла между моносахаридными остатками остатками “маннозной вилки”, а следовательно, и на расстояние между антеннами.

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ В СОСТАВЕ АГП

Как было отмечено выше, АГП представлен в крови набором гликоформ, различающихся соотношением углеводных цепей разной антенности (табл. 1).

Для гликоформы АГП-А, содержащей только четырех- и трехантенные цепи, наблюдается слабый спектр ГКР, линии которого соответствуют колебаниям Sia (рис. 5А). В спектре присутствуют линии 1618 и 1575 см^{-1} , характерные для *транс*-конформации ацетамидной группы Sia, а также линии 1587 и 1364 см^{-1} карбоксильной группы Sia. В низкочастотной области наблюдаются слабые линии 440, 534 и 912 см^{-1} , относящиеся к колебаниям пиранозных циклов.

Сигнал ГКР гликоформ АГП-В и АГП-С практически отсутствует (рис. 5С и В), несмотря на то что их углеводные цепи сиалированы почти в той же степени, что в гликоформе АГП-А (табл. 1). По-видимому, остатки Sia в этих фракциях недоступны для взаимодействия с ГКР-активной поверхностью, что предполагает их экранированность по отношению к водной фазе.

Неожиданно интенсивный спектр ГКР, практически идентичный спектру природного АГП, наблюдается лишь для гликоформы АГП-Д (рис. 5D), содержащей кроме одной четырех- и одной трехантенной три двухантенные углеводные цепи (табл. 1). По-видимому, именно этот факт определяет вид ГКР-спектров АГП-Д и самого АГП. Таким образом, доминирующий вклад в спектр АГП дает фракция АГП-Д, несмотря на ее невысокое содержание (1-2%) в гликопротеине.

Исследования гликоформ АГП методами рентгеновского рассеяния и малоуглового рассеяния нейтронов [15] показали, что гликаны АГП с большим содержанием четырех- и трехантенных углеводных цепей организованы более компактно, чем гликаны с высоким содержанием двухантенных цепей, где они развернуты в направлении водной фазы. Резкое усиление спектра ГКР гликоформы АГП-Д с наибольшим содержанием двухантенных цепей и его отличие от спектров гликоформ АГП-А, АГП-В и АГП-С позволяют считать, что углеводные цепи гликоформы АГП-Д экспонированы в раствор, в то время как у гликоформ АГП-А, АГП-В и АГП-С реализуется компактная структура гликанов на поверхности белковой глобулы.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ АГП КАК ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ

Интенсивность и вид спектров ГКР позволяют оценить доступность терминальных остатков Sia для взаимодействия со стороны водной фазы и их конформационную свободу, т.е. способность подстраиваться за счет гибкости молекулы для эффективного взаимодействия с поверхностью. Из четырех гликоформ, исследованных в данной работе, только АГП-Д характеризуется интенсив-

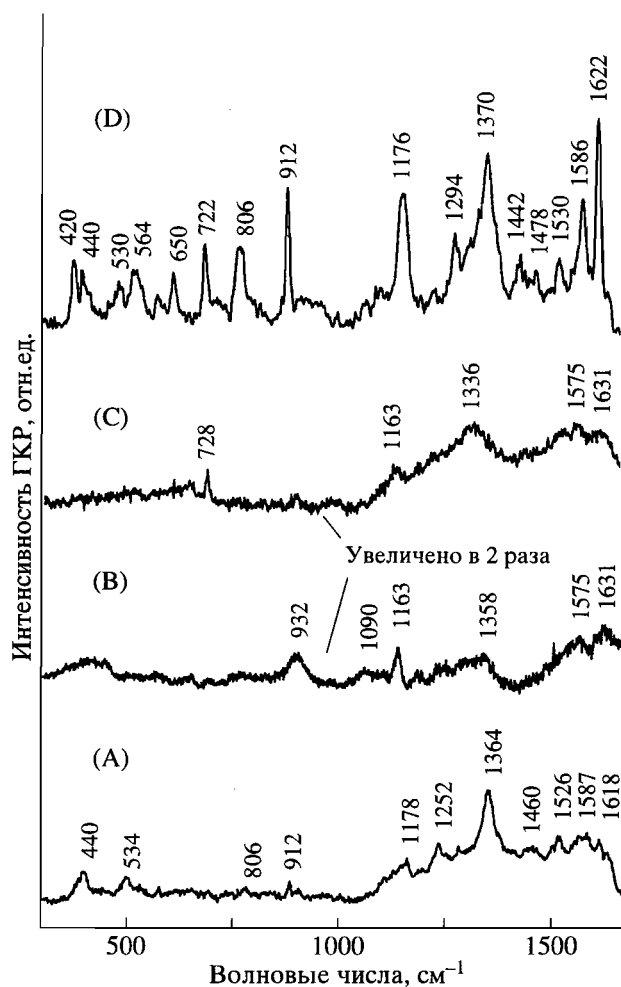


Рис. 5. Спектры ГКР гликоформ α_1 -кислого гликопротеина: (А) – АГП-А, (В) – АГП-В; (С) – АГП-С; (D) – АГП-Д. Концентрация 2 мг/мл.

ным спектром ГКР, практически идентичным спектру природного АГП, и именно эта форма проявляет наибольшую иммуномодулирующую активность [5]. Эти факты находят объяснение с точки зрения пространственной организации гликанов гликоформ АГП.

Гликоформа АГП-Д содержит наибольшее количество двухантенных цепей. По данным работы [15], углеводные цепи гликоформы, содержащей преимущественно двухантенные цепи, должны быть экспонированы в раствор, и это подтверждается интенсивным ГКР-спектром со значительным вкладом сигнала Sia. Для гликоформ, содержащих преимущественно четырех- и трехантенные цепи, гликаны покрывают поверхность белковой глобулы [15]. Отсутствие интенсивного спектра ГКР позволяет предположить, что помимо АГП-А, не содержащего двухантенных цепей, АГП-В и АГП-С также характеризуются сближенностью гликанов с поверхностью

белка, что приводит к значительной экранированности остатков Sia и исключает их эффективную адсорбцию на ГКР-активной поверхности. Три гликоформы из четырех содержат двухантенные цепи (табл. 1). Однако только для АГП-D спектроскопия ГКР показывает изменение пространственной организации углеводного компонента, что может быть важным фактором, определяющим активность этой гликоформы.

Из анализа спектров ГКР следует, что характерную для АГП-D организацию углеводных цепей удастся воспроизвести у псевдогликопротеинов пАГП-1-3 и пАГП-1-5. Ранее было показано, что пАГП-1-5 обладает большей иммуномодулирующей активностью по сравнению с псевдогликопротеинами типа пАГП-2 [6]. По данным спектроскопии ГКР, у псевдогликопротеинов типа пАГП-2 терминальные остатки Sia также экспонированы и доступны для взаимодействия со стороны водной фазы, но их структурная организация иная, чем в составе АГП-D. Это подтверждает вывод, что специфическая пространственная организация гликанов может быть одним из необходимых условий для проявления высокой иммуномодулирующей активности псевдогликопротеинов.

Из полученных данных следует, что природа носителя (полипептидная цепь или полиакриламид) не оказывает принципиального влияния на пространственную организацию углеводных цепей. В то же время структурная организация гликанов в значительной степени зависит от плотности их расположения на носителе, что позволяет предположить существенность взаимодействия соседних гликанов друг с другом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

α -1-Кислый гликопротеин и его гликоформы А, В, С и D выделяли из крови здоровых доноров как описано в работах [6, 12]. Псевдо-АГП с углеводными цепями в виде гликозиламинов (пАГП-1) и аминокислот (пАГП-2) и с различным содержанием углеводных цепей синтезировали как описано в работе [6].

Спектры ГКР регистрировали как описано в [19]. Запись проводили на КР-спектрометре (Jobin-Yvon Ramanog HG-2S, Франция). Для возбуждения использовали линию 514.5 нм аргонового лазера Spectra-Physics 164-03. Мощность излучения на образце составляла 25 мВт.

ГКР-активную систему – коллоид серебра готовили путем восстановления азотнокислого серебра цитратом натрия по методике, приведенной в работе [19]. Перед экспериментом 20 мкл разбавленного в 2 раза водой гидрозоля агрегировали добавлением 2 мкл 0.6 М NaClO₄ и смешивали с 20 мкл раствора исследуемого соединения в воде.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 96-04-48764). Е.Ю.Крюков благодарит фирму "ВКС International House" за индивидуальную финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmid K. // The Plasma Proteins. V. 1 / Ed. F.W. Putman. N.Y.: Acad. Press, 1975. P. 183–228.
2. Van Dijk W., Turner G.A., Mackiewicz A. // Glycosyl. Dis. 1994. V. 1. P. 5–14.
3. Fujii M., Takahashi N., Hayashi H., Furusho T., Matsunaga K., Yoshikumi C. // Anticancer Res. 1988. V. 8. P. 303–306.
4. Shiyan S.D., Nasonov V.V., Bovin N.V., Medvedev A. // Exp. Oncol. 1993. V. 15. P. 45–51.
5. Shiyan S.D., Bovin N.V. // Glycocon. J. 1997. V. 14. P. 631–639.
6. Шиян С. Д., Пухальский А. Л., Топтыгина А. П., Насонов В. В., Бовин Н. В. // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. С. 994–1000.
7. Schmid K., Kaufmann H., Isemura S., Bauer F., Emura J., Motoyama T., Ishiguro M., Nanno S. // Biochemistry. 1973. V. 12. P. 2711–2724.
8. Schmid K., Binette J.P., Dorland L., Vliegthart J.F.G., Fournet B., Montreuil J. // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 581. P. 356–359.
9. Fournet B., Montreuil J., Stecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegthart J.F.G., Binette J.P., Schmid K. // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 5206–5214.
10. Fujii M., Takahashi N., Hayashi H., Matsunaga K., Yoshimi C. // Clin. Biochem. 1987. V. 20. P. 183–189.
11. Pos O., Oostendorp R.A.J., Van der Stelt M.E., Schepeler R.J. // Inflammation. 1990. V. 14. P. 133–141.
12. Шиян С.Д., Насонов В.В., Бовин Н.В., Новикова Л.И., Алешкин В.А. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. С. 663–670.
13. Пухальский А.Л., Топтыгина А.П., Калашикова Е.А., Шиян С.Д., Насонов В.В., Бовин Н.В., Лютов А.Г., Байрушин Ф.Л. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1994. Т. 118. С. 71–73.
14. Пухальский А.Л., Калашикова Е.А., Шиян С.Д., Бовин Н.В. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1998. Т. 125. С. 79–83.
15. Perkins S.J., Kerckaert J.-P., Loucheux-Lefebvre M.H. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 147. P. 525–531.
16. Nabiev I.R., Sokolov K.V., Manfait M. // Biomolecular Spectroscopy. Part A. V. 20 / Eds R.J.H. Clark, R.E. Hester. Chichester; New York; Brisbane; Toronto; Singapore: Wiley, 1993. P. 267–338.
17. Sokolov K. V., Byramova N. E., Mochalova L. V., Tuzikov A. B., Shiyan S. D., Bovin N. V., Nabiev I. R. // Appl. Spectrosc. 1993. V. 47. P. 535–538.
18. Nabiev I.R., Sokolov K.V., Oleinikov V.A., Yanul A.I., Feofanov A.V., Shiyan S.D., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // Int. Conf. "Biology and Chemistry of Sialic Acids". Abstracts. M., 1994. P. 16–18.

19. Феофанов А.В., Олейников В.А., Тузиков А.Б., Януль А.И., Крюков Е.Ю., Соколов К.В., Бовин Н.В., Набиев И.Р. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 706–716.
20. Феофанов А.В., Олейников В.А., Тузиков А.Б., Януль А.И., Крюков Е.Ю., Бовин Н.В., Набиев И.Р. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 910–918.
21. Reutter W., Kottgen E., Bauer Ch., Gerok W. // Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function / Ed. R. Schauer. Wien; New York: Springer-Verlag, 1982.
22. Набиев И.Р., Ефремов Р.Г., Чуманов Г.Д. // Успехи физ. наук. 1988. Т. 154. С. 459–496.
23. Hildebrandt P., Stockburger M. // J. Phys. Chem. 1994. V. 88. P. 5935–5944.
24. Song S., Asher S.A., Krimm S., Shaw K.D. // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 1155–1163.
25. Vliegthart J.F.G., Dorland L., Van Halbeek H., Haverkamp J. // Cell Biology Monographs. V. 10 / Ed. R. Schauer. Wien; New York: Springer-Verlag, 1982. P. 127–172.
26. Dollish F.R., Fateley W.G., Bentley F.F. // Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds. New York; London; Sydney; Toronto: Wiley, 1974.
27. Кениг Д.Л. // Успехи химии. 1975. Т. 44. С. 1475–1516.
28. Липкинд Г.М. Конформационный анализ углеводных цепей: Дис. д-ра хим. наук: М.: Ин-т орган. химии, 1991.

Surface-enhanced Raman Scattering Spectroscopy Study of Carbohydrate Chains in α_1 -Acid Glycoprotein and Pseudoglycoproteins

V. A. Oleinikov[#], A. V. Feofanov, S. D. Shiyan, A. B. Tuzikov, E. Yu. Kryukov, A. I. Yanul, N. V. Bovin, and I. R. Nabiev

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy was used to study the structure of carbohydrate chains in glycosylated forms of α_1 -acid glycoprotein (AGP) and in pseudoglycoproteins obtained by transferring the carbohydrate chains of AGP to a polyacrylamide carrier. It was found that AGP-D glycoform and pseudoglycoproteins containing three or more glycans per molecule, which possess high immunomodulating activity, have a specific spatial organization of carbohydrate chains. This organization is maintained by the interaction of neighboring glycans with each other and does not depend on the nature of the carrier (whether it is polypeptide or polyacrylamide).

Key words: sialic acids, neoglycoconjugates, pseudoglycoproteins, surface-enhanced Raman scattering spectroscopy, SERS

[#] To whom correspondence should be addressed; phone/fax: +7 (095) 336-1766; e-mail: raman@siobc.ras.ru.