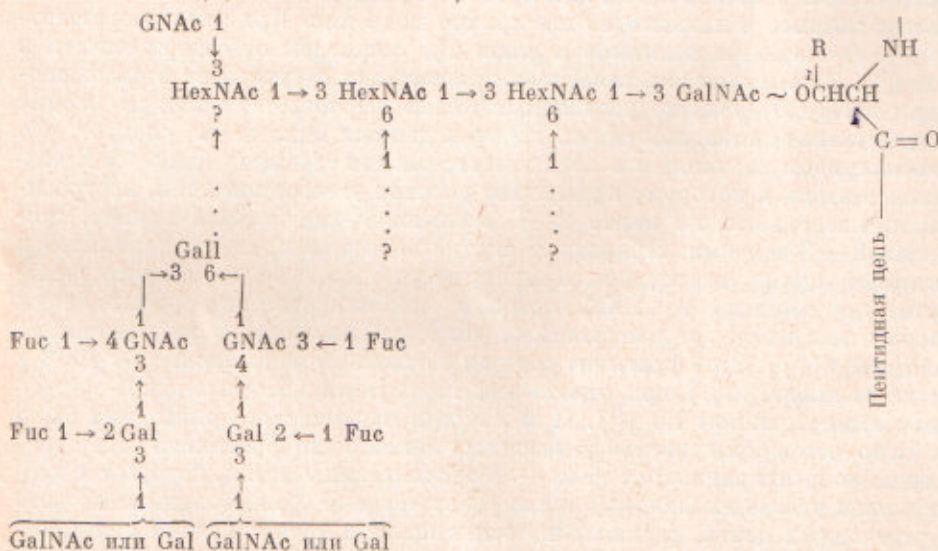


Член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ, В. А. ДЕРЕВИЦКАЯ,
Л. М. ЛИХОШЕРСТОВ, М. Д. МАРТЫНОВА, С. Н. СЕНЧЕНКОВА,
Г. С. КИКОТЬ, Л. С. БОГДАШОВА

О СТРУКТУРЕ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ ГРУППОВЫХ ВЕЩЕСТВ
КРОВИ

Как известно, биологическая специфичность групповых веществ крови (ГВК) определяется структурой их углеводных цепей (¹), присоединенных О-гликозидной связью через остатки серина и треонина к центральному пептидному скелету (²). Иммунохимическими методами, а также путем частичной деструкции ГВК удалось выяснить природу терминальных невосстанавливающих моносахаридов и структуру прилегающих к ним участков углеводных цепей (¹). Сведения о строении углеводных цепей в целом, и в особенности в зоне, примыкающей к пептидному скелету ГВК, отсутствуют. Лишь Ллойдом, Кабатом и Лисерио (³) недавно предложена схема построения, касающаяся в основном фрагмента невосстанавливающего конца углеводных цепей ГВК.

Проводимые нами исследования структуры ГВК (А + Н), выделенного из слизистой свиных желудков по схеме (⁴), а также информация о структуре выделенных ранее олигосахаридов (¹, ³, ⁵, ⁶) позволяют нам предложить общую схему построения углеводных цепей ГВК. Основными методами исследования структуры углеводных цепей ГВК были: ступенчатый распад по Смитту, метилирование, комбинированное химическое и ферментативное расщепление ГВК и изучение щелочной деградации ГВК с измерением скорости выделения продуктов распада — остатков N-ацетилгексозаминов (3-ацетидамо-5-(1,2-диоксиэтил)-фурана и других соединений, обычно называемых хромогенами) и остатков галактозы (сахариновые кислоты и 2-замещенная гексо-2-еноза).



Общая характеристика структуры углеводных цепей ГВК вытекает из данных периодатного окисления и метилирования. При ступенчатом рас-

паде ГВК по Смитту первое и второе окисление периодатом заканчивается за 5 час. с поглощением соответственно 2,5 и 1,3 мол. периодата на 1000 г ГВК. Продукты распада содержат высокомолекулярную часть, представляющую собой пептидную цепь с прикрепленными к ней фрагментами углеводных цепей, и низкомолекулярную часть. Среди низкомолекулярных продуктов распада по Смитту обнаружены лишь следы остатков галактозы и N-ацетилгексозаминов. Это свидетельствует о том, что окисление протекает только с невосстанавливающих концов углеводных цепей. Вместе с тем, в результате двух распадов по Смитту окисляется ~70% галактозы и ~50% N-ацетилгексозаминов⁽⁷⁾. По литературным данным⁽⁸⁻¹⁰⁾, количество цепей в ГВК, с учетом разветвления, несущего две детерминанты, равно примерно 60. Следовательно, высокий процент окисления галактозы и гексозаминов может быть обусловлен только высокой степенью разветвления цепей. Сложность построения и разветвленность углеводных цепей ГВК подтверждается также данными, полученными методом метилирования. В продуктах гидролиза полностью метилированного ГВК (A + H) методами газо-жидкостной хроматографии, ионообменной хроматографии (автоматический анализатор аминокислот) и масс-спектрометрии был идентифицирован ряд метилпроизводных галактозы (2, 3, 4, 6-тетра-, 3, 4, 6-три-, 2,4,6-три-, 2,3,6-три-, 2,3,4-три-, 4,6-ди-, 2,6-ди-, 3,6-ди-О-метилгалактозы), гексозаминов (3,4,6-три-, 3,6-ди-, 3-моно-, 6-моно-О-метилглюкозамин, 3,4,6-три-О-метилгалактозамин*) и фукозы (2,3,4-три-О-метилфукоза), что демонстрирует большое разнообразие межмономерных связей^(11, 12). Фукоза и часть галактозы, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина занимают концевое положение, часть галактозы и часть N-ацетилглюкозамина являются местами разветвления. Нахождение галактозы, замещенной по С-4 с разветвлением по С-3 или С-2, подтверждено также выделением трейта из продуктов второго распада ГВК по Смитту⁽⁷⁾.

Для определения природы моносахаридного остатка, непосредственно включенного в узел углевод-пептидной связи, а также построения прилегающего к нему участка углеводных цепей был использован новый подход — изучение кинетики выделения продуктов щелочного распада моносахаридных звеньев. При щелочной деградации ГВК (A + H) (0,05M Na₂CO₃; 70°; 4 часа) N-ацетилгексозамины быстро разрушаются с образованием хромогена, в то время как продукты распада галактозы появляются заметно позднее и накапливаются крайне медленно. При этом разрушается 30% N-ацетилгексозаминов и лишь 4% галактозы от содержащихся в ГВК⁽¹³⁾. Таким образом, галактоза практически отсутствует в распадающемся в Na₂CO₃ участке углеводных цепей и, соответственно, не входит в узел углевод-пептидной связи. Из этих данных однозначно следует, что моносахаридом, связанным с остатком серина или треонина, является N-ацетилгексозамин, к которому примыкает участок углеводной цепи, построенный из нескольких, не менее 3—4, остатков N-ацетилгексозаминов, связанных 1→3-связями. Природа N-ацетилгексозамина, присоединенного к пептидной цепи, установлена при изучении высокомолекулярного фрагмента, полученного из ГВК методом комбинированного расщепления (распад по Смитту, ферментативный гидролиз препаратом из *Clostridium perfringens*⁽¹⁴⁾). Этот фрагмент состоит в основном из аминокислот (60%) и гексозаминов (34%), при отношении N-ацетилгалактозамина к N-ацетилглюкозамину, равном 7,5⁽¹⁵⁾. При помощи периодатного окисления было показано, что в большинстве углеводных цепей этого фрагмента содержится один моносахаридный остаток — N-ацетилгалактозамин, который и входит в узел углевод-пептидной связи. Для выяснения разветвленности участка углеводных цепей, распадающегося в щелочи, существенной оказалась характеристика образующихся хромогенов. Удалось показать, что при

* Идентификация других метилпроизводных галактозамина продолжается нами в настоящее время.

щелочном распаде ГВК образуются замещенный и незамещенный хромогены. Известно, что незамещенный хромоген образуется из незамещенного или замещенного у C_3 N-ацетилгексозамина, а замещенный хромоген образуется из замещенных у C_6 или дизамещенных у C_5 и C_6 N-ацетилгексозаминов. Образование замещенного и незамещенного хромогенов как из ГВК, так и из ГВК, предварительно окисленного периодатом и восстановленного $NaBH_4$ (ГВК 1), указывает на то, что некоторые из остатков N-ацетилгексозаминов, связанных 1 → 3-связями, имеют разветвление у C_6 . При помощи разработанного нами метода анализа ⁽¹³⁾ была изучена кинетика выделения замещенного и незамещенно-

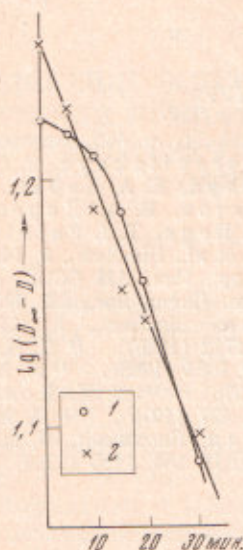


Рис. 1. Кинетика образования замещенного (1) и незамещенного (2) хромогенов из ГВК, обработанного 0,05 M Na_2CO_3 при 70°

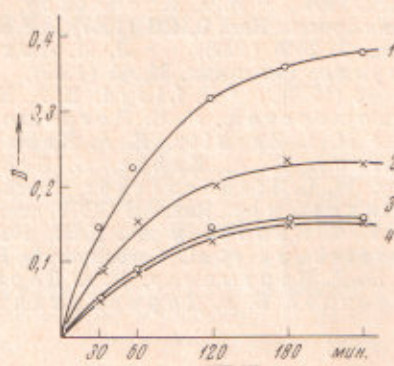


Рис. 2. Количество замещенного и незамещенного хромогенов, образующихся из ГВК и ГВК 1 при обработке 0,05 M Na_2CO_3 при 70°. 1 — сумма замещенного и незамещенного хромогенов из ГВК, 2 — то же из ГВК 1, 3 — замещенный хромоген из ГВК, 4 — то же из ГВК 1

го хромогенов. Было найдено, что образование замещенного хромогена, в отличие от незамещенного, протекает с характерным инкубационным периодом (рис. 1). Следовательно, в узле O-гликозидной углевод-фептидной связи находится N-ацетилгалактозамин, не несущий разветвления и замещенный только у C_2 и C_4 . Дополнительные данные о структуре участка углеводных цепей, распадающегося в щелочи, были получены при сравнении количеств замещенных и незамещенных хромогенов, выделяющихся из ГВК и ГВК 1. Количество замещенного хромогена, образующегося из ГВК и ГВК 1, практически одинаково, а количество незамещенного хромогена из ГВК 1 примерно в два раза меньше, чем из ГВК (рис. 2). Это может быть обусловлено только окислением концевого невосстанавливающего N-ацетилгексозамина, находящегося в участке цепи, распадающемся в щелочи. Хорошо известная большая устойчивость незамещенного у C_3 N-ацетилгексозамина по сравнению с замещенным у C_3 N-ацетилгексозамином позволила определить природу гексозамина, окисляющегося периодатом. В результате кратковременной обработки ГВК 0,05 M раствором Na_2CO_3 (30 мин., 70°) и последующего фракционирования на биогелях продуктов распада была выделена низкомолекулярная фракция, содержащая из гексозаминов практически только N-ацетилгексозамин. Этот N-ацетилглюкозамин и является тем N-ацетилгексозамином, который распадается в щелочи и окисляется при периодатном окислении ГВК.

Предложенная схема построения углеводных цепей ГВК будет, вероятно, дополняться, видоизменяться и уточняться, в частности в отношении расположения в цепи фрагмента, несущего детерминанты серологической специфичности. Однако нам кажется важным подчеркнуть две принципиальные особенности этой схемы — высокую степень разветвленности углеводных цепей и наличие участка, присоединенного к пептидному скелету молекулы, построенного только из N-ацетилгексозаминов.

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

Поступило
17 IV 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. M. Watkins, in: *Glikoproteins* (Ed. A. Gottschalk), p. 462, Amsterdam, London, New York, 1966. ² N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya, S. G. Karamura, *Carbohydrate Res.*, **3**, 403 (1967). ³ K. O. Lloyd, E. A. Kabat, E. Licario, *Biochem.*, **7**, 2976 (1968). ⁴ Л. М. Лихошерстов, В. А. Деревицкая, В. И. Федорова, *Биохимия*, **34**, 45 (1969). ⁵ V. P. Rege, T. J. Painter et al., *Nature*, **200**, 532 (1963). ⁶ K. Lloyd, E. A. Kabat et al., *Biochem.*, **5**, 1489 (1966). ⁷ Л. М. Лихошерстов, Л. С. Богдашова и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1970**, № 2. ⁸ M. L. Zarnitz, E. A. Kabat, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3953 (1960). ⁹ D. M. Marcus, E. A. Kabat, G. Schiffman, *Biochem.*, **3**, 437 (1964). ¹⁰ H. Turry, W. L. Standenlaher, *Biochem.*, **5**, 1742 (1966). ¹¹ Н. К. Кочетков, Г. С. Кикоть и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **9**, 2085 (1968). ¹² Л. М. Лихошерстов, Г. С. Кикоть и др., *ДАН*, **192**, 94 (1970). ¹³ N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya et al., *Carbohydrate Res.*, **12**, 437 (1970). ¹⁴ Л. М. Лихошерстов, М. Д. Мартынова, В. А. Деревицкая, *Биохимия*, **33**, 1135 (1968). ¹⁵ Н. К. Кочетков, В. А. Деревицкая и др., *ДАН*, **186**, 1195 (1969).