

УДК 542.91:547.455

ХИМИЯ

В. А. ДЕРЕВИЦКАЯ, О. С. НОВИКОВА,
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

ДЕГРАДАЦИЯ МЕТИЛАМИДА О-(2-АЦЕТАМИДО-3-О-(2-АЦЕТАМИДО-2-ДЕЗОКСИ- β -D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)-2-ДЕЗОКСИ- β -D-ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)-N-КАРБОБЕНЗОКСИ-L-СЕРИНА

Углеводные цепи гликопротеинов, содержащие О-гликозидную углевод-пептидную связь, легко отщепляются от пептидного скелета под действием щелочи (¹). В тех случаях, когда в углеводных цепях имеются 1→3-связи, они деградируют далее (²), что делает невозможным выделение недеструктурированных углеводных цепей. Для того чтобы ограничить распад углеводных цепей, было предложено (^{3, 4}) проводить щелочную деструкцию в присутствии NaBH₄, который, восстанавливая концевой моносахарид, препятствует углеводной цепи.

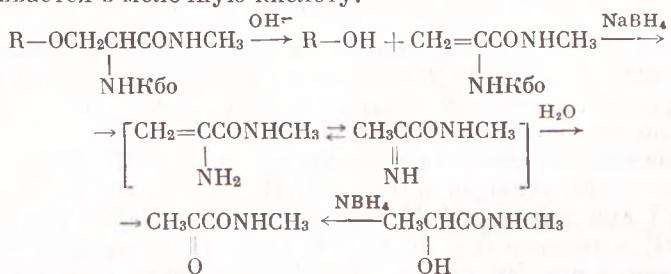
Авторами (³) использовалась 0,2 N NaOH+0,1 M NaBH₄, однако было показано, что скорость деградации и в этом случае значительно выше скорости восстановления углеводных цепей. Позднее Карлсон с сотр. предложили понизить концентрацию щелочи до 0,05 N, повысив одновременно концентрацию NaBH₄ до 1 M. В результате изучения распада гликопротеинов в этих условиях авторы (^{5, 6}) считают, что в этом случае деградация углеводных цепей протекает в незначительной степени. Однако количественные данные об интенсивности деструкции углеводных цепей при деградации гликопротеинов в этих условиях в литературе отсутствуют.

В качестве модельных соединений использовались только дисахарида, содержащие 3-замещенный N-ацетилгексозамин, и данные по их распаду неоднозначны и противоречивы (^{6, 7}).

Нами исследован процесс щелочной деградации биозида серина, содержащего два остатка глюказамина, соединенных 1→3-связью — метиламид-O-[2-ацетамидо-3-O-(2-ацетамидо-2-дезокси- β -D-глюкопиранозил)-2-дезокси- β -D-глюкопиранозил]-N-карбобензоксил-*L*-серина (I) (⁸), близко моделирующий узел связи гликопротеинов типа ГВК.

Распад I изучался в двух вариантах — под действием 1 M NaBH₄ в 0,05 N растворе NaOH и в 1 M растворе NaBH₄ без добавления щелочи. К 0,5 мл водного раствора вещества с концентрацией 0,7 мг/мл добавляли 38 мг NaBH₄ и 0,5 мл 0,1 N раствора NaOH. Во втором варианте щелочь не добавлялась. Раствор выдерживался при 50° в течение 6 и 16 час. Охлажденный раствор нейтрализовали 4 N HCl, упаривали досуха, добавляли 2 мл 4 N HCl и гидролизовали 16 час. при 100°. В гидролизате определяли количество глюказамина, глюказаминита и серина. При обработке ГВК в обоих вариантах гладко проходил разрыв О-глюказидной связи углевод — аминокислота, который полностью заканчивался за 4 часа. Исследование реакционной смеси показало, что серин при этом полностью исчезает, превращаясь в молочную кислоту с количественным выходом, при этом не наблюдалось образования даже следов аланина. Молочная кислота определялась по методу (⁹). Как известно, при деградации ГВК и подчелюстных муцинов щелочью с небольшой добавкой NaBH₄, образующиеся остатки аминоакриловой кислоты восстанавливаются в остатки

аланина (10). В нашем случае даже после гидропрования реакционной смеси над Pd/BaSO_4 (раствор 1 мг/мл вещества в 50% спирте, содержащем 1 мг Pd/BaSO_4 , гидрировали 4 час.) не обнаружилось и следов производных аланина, хотя в контролльном опыте при гидрировании метиламида N-карбобензоксиаминоакриловой кислоты он превращался в соответствующее производное аланина с количественным выходом. Контрольный опыт с метиламидом N-карбобензокси-L-серина показал, что при обработке этого соединения в условиях деградации соединения I в течение 6 час. карбобензокси-группа отщепляется. Очевидно, при деградации I в присутствии большого количества NaBH_4 карбобензокси-группа также отщепляется, а образующийся метиламид аминоакриловой кислоты распадается с образованием пировиноградной кислоты, которая далее восстанавливается в молочную кислоту:



Следует также отметить, что при обработке соединения I элиминирование производного серина, по-видимому, предшествует отщеплению карбобензокси-группы, так как в противном случае возникновение свободной аминогруппы на остатке серина препятствовало бы процессу элиминирования (11).

Для определения характера и степени распада углеводной части I реакционная смесь исследовалась хроматографией на бумаге (система n-бутиanol — пиридин — вода 6 : 4 : 3) и после кислотного гидролиза (4 N HCl, 100°, 16 час.) с помощью анализатора аминокислот типа 6020А (ЧССР). Хроматография на бумаге реакционной смеси показала, что при этом образуются два вещества, одно из которых — N-ацетилглюкозаминит (II), а второе — 2-ацетамидо-3-O-(2-ацетамидо-2-дезокси-β-D-глюкопиранозил)-2-дезокси-D-глюкозаминит (III). Вещество III было выделено preparativной хроматографией на бумаге — гидролиз дал соотношение глюкозамина : глюкозаминита 1,0 : 1,08. Соединение III является продуктом восстановления дисахарида, образующегося при элиминировании его с остатка производного серина, в то время как II может образоваться в результате деградации дисахарида, содержащего 1→3-связь за счет восстановления NaBH_4 концевого незамещенного N-ацетилглюкозамина. Это подтверждается тем, что при обработке в описанных выше условиях метиламида хитобиозида N-карбобензокси-L-серина (12), который содержит 1→4-связанные остатки N-ацетилгексозамина, свободный N-ацетилглюкозаминит не образуется, а дисахарид полностью восстанавливается. Таким образом, образование свободного N-ацетилглюкозаминита может служить признаком и мерой деградации дисахаридной цепи в I. Для оценки степени деградации I, реакционная смесь после обработки подвергалась кислотному гидролизу; при этом III распадался на эквимолекулярные количества глюкозамина и глюкозаминита. Количество глюкозамина при этом должно соответствовать количеству восстановленного дисахарида III. Соотношение глюкозаминита / глюкозамин указывало на избыточное количество глюкозаминита, образующегося за счет деградации, и служило непосредственной мерой деградации дисахарида. Полученные данные приведены в табл. 1, из которой видно, что при обработке I в условиях (3) (0,05 N NaOH + 1 M NaBH_4), общий выход продуктов реакции составляет 78—82%, причем соотношение глюкозаминита/глюкозамин и выход глюкозами-

Таблица 1

Распад I при обработке $0,05\text{ N NaOH} + 1\text{ M NaBH}_4$ и 1 M NaBH_4 при 50°
(мкмоль. веществ из ммоль. I после кислотного гидролиза)

Условия	Время, час	Серия	Глюкозамин А	Глюкозаминит Б	Б/А	Распад, %	А + Б (%)
$1\text{ M NaBH}_4 + 0,05\text{ N NaOH}$	0	0,1035	0,206	0		0	
	6	0	0,071	0,098	1,38	31	0,169(82)
	0	0,093	0,185	0			
	16	0	0,062	0,083	1,34	33	0,145(78)
	0	0,1008	0,21	0		0	
	6	0	0,094	0,105	1,13	10	0,199(94,8)
1 M NaBH_4	16	0	0,09	0,104	1,16	15	0,194(92,5)

на указывают на то, что деградация достигает 31–33%. Таким образом, вопреки данным (5), в этих условиях не происходит избирательного расщепления углевод-пептидной связи, и углеводные цепи, содержащие 1→3-связи, подвергаются значительной деструкции.

Для исследования строения углеводных цепей ГВК крайне желательно свести их деградацию до минимума. В связи с этим мы исследовали деградацию I при действии 1 M водного раствора NaBH_4 без добавки щелочи при 50° в течение 6 и 16 час. Водные 1 M растворы NaBH_4 через 1 час нагревания при 50° имеют $\text{pH}\ 10,85$, а к концу реакции, т. е. через 16 час., 11,45. Результаты распада в этих условиях приведены в табл. 1. Как видно, при этом общий выход продуктов реакции составляет 94%, а соотношение глюкозаминит/глюкозамин указывает на то, что деградация дисахарида составляет 10–15%. Хотя условия деструкции О-гликозидной связи гликопептидов еще неидеальны, уменьшение степени деструкции до 10–15% делают их гораздо удобнее, чем существующие методы.

Предварительные опыты, проведенные на ГВК из слизистой свиных желудков, подтверждают сказанное. При обработке ГВК раствором $0,05\text{ N NaOH} + 1\text{ M NaBH}_4$ при 50° в течение 16 час. распад углеводных цепей составляет ~30%, тогда как при обработке ГВК 1 M раствором NaBH_4 без добавки щелочи в тех же условиях распад составляет ~10%. Следует иметь в виду, что элиминирование углеводных цепей с пептидного скелета протекает в этом случае с меньшей скоростью. Выделенные в результате этого олигосахариды исследуются нами в настоящее время.

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

Поступило
27 XII 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya, S. G. Kara-Murza, Carbohydr. Res., v. 3, 403 (1967). ² R. L. Whistler, Y. N. Be Muller, Advances Carbohydr. Chem., v. 13, 289 (1958). ³ K. O. Lloyd, E. A. Kabat, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 16, 385 (1964).
- ⁴ K. Tanaka, W. Pigman, J. Biol. Chem., v. 240, 1487 (1965). ⁵ R. N. Iyer, D. M. Carlson, Arch. Biochem. and Biophys., v. 142, 101 (1971). ⁶ B. Anderson, L. Rovis, E. A. Kabat, Arch. Biochem. and Biophys., v. 148, 304 (1972). ⁷ D. M. Carlson, R. M. Iyer, J. Mayo, In: Blood and Tissue Antigens, N. Y., 1970, p. 229. ⁸ H. K. Кошетков, В. А. Деревицкая, О. С. Новикова, Изв. АН СССР, сер. хим., 1974, 179. ⁹ B. C. Acatianni, Новые методы биохимической фотометрии, М., 1965, стр. 332. ¹⁰ K. Tanaka, M. Bertalini, W. Pigman, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 16, 404 (1964). ¹¹ V. A. Derevitskaya, M. G. Vafina, N. K. Kochetkov, Carbohydr. Res., v. 3, 377 (1967). ¹² B. A. Деревицкая, Л. М. Лихошерстов и др., Изв. АН СССР, сер. хим., 1971, 2246.