



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 13 * № 3 * 1987

УДК 577.175.328'13:577.114.5

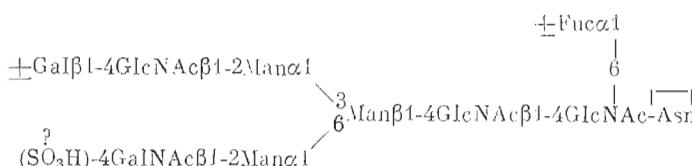
СТРУКТУРА УГЛЕВОДНОЙ ЧАСТИ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО СВИНОГО ПРОЛАКТИНА

Бутнев В. Ю., Арбатский Н. П., Деревицкая В. А.*,
Панков Ю. А.*

*Институт экспериментальной эндокринологии и химии гормонов
Академии медицинских наук СССР, Москва;*

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

Установлено, что моносахаридный состав гликозилированного свиного пролактина (1–199), его бромщавлового фрагмента (1–36) и химотрипсинового гликопептида (29–36) одинаков и соответствует GlcNAc₃, GalNAc₁, Man₃, Fuc_{0,6}, Gal_{0,3}. С помощью ферментативного гидролиза гликопептида (29–36) смесью гликозидаз, выделения и анализа продуктов реакции с последующей деградацией их по Смиту было показано, что углеводная цепь этого гликопротеина относится к «сложному» типу N-связанных олигосахаридов и имеет следующее строение:



Одним из важнейших белковых гормонов передней доли гипофиза является пролактин. К настоящему времени полностью установлена первичная структура пролактина человека и многих видов животных. В отличие от группы классических гипофизарных гликопротеидных гормонов пролактин содержит одну полипептидную цепь, состоящую из 199 аминокислотных остатков, и считается простым белком [1].

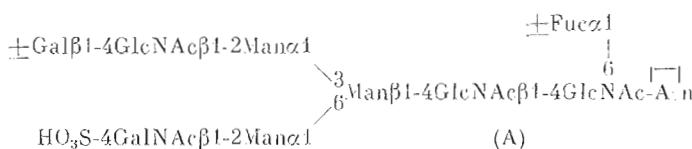
Чрезвычайно широкий спектр биологических эффектов позволяет рассматривать пролактин как один из самых полифункциональных белковых гормонов в организме. В последние годы значительно возрос интерес к исследованию природной гетерогенности этого гормона. Анализ накопленных в литературе данных свидетельствует о том, что в гипофизе и кровяном русле присутствует несколько молекулярных форм пролактина, различающихся по своим физико-химическим, иммунологическим и биологическим характеристикам [2–4]. Образование таких изоформ, вероятно, связано с природными посттрансляционными модификациями, которые способны изменять физиологические и иммунохимические свойства гормона.

Почти одновременно в нашей стране [5] и за рубежом [6] было показано, что в гипофизе у млекопитающих присутствует ранее неизвестная гликозилированная форма пролактина, в которой единственная в молекуле углеводная цепь присоединена к аспартатину в 31-м положении. Несколько позже аналогичный гликозилированный вариант пролактина был выделен из гипофизов людей [7]. Установлено, что гликозилированный свиной пролактин обладает повышенной лактогенной активностью [8, 9]. Вместе с тем аналогичные формы пролактина овцы [6] и человека [7] проявляют сниженную иммунореактивность. Присутствие гликозилированного гормона в плазме людей [4, 10, 11] дает основание думать о недостаточной информативности традиционных методов иммуноанализа, применяемых для оценки содержания биологически активного пролактина в циркуляции.

Изучение взаимосвязи между гликозилированием пролактина и изменением его биологических и иммунохимических свойств ставит важную задачу по расшифровке структуры его N-связанного углеводного компонента.

Для определения моносахаридного состава гликозилированного свиного пролактина использовали три препарата: интактный гормон (1–199), его бромциановый фрагмент (1–36) и химотрипсиновый гликопептид (29–36). Выделение и очистка этих препаратов описаны ранее [5]. Сравнение углеводного состава гликозилированного пролактина и его фрагментов (таблица) показало, что соотношение моносахаридов сохраняется постоянным и, следовательно, углеводная цепь не претерпевает каких-либо изменений при фрагментации гормона. Анализ показал, что на 3 моль маниозы приходится ~3 моль N-ацетилглюкозамина, ~1 моль N-ацетилгалактозамина, менее 1 моль фукозы и небольшое количество (~0,3 моль) галактозы.

Как оказалось, углеводный состав гликозилированного пролактина полностью соответствует известной структуре олигосахаридных цепей лютеинизирующего гормона овцы [12]. Эта структура имеет обычный для N-гликопротеинов цептасахаридный кор и необычное замещение остатка Man α 1-6 сульфатированным остатком N-ацетилгалактозамина (структуре А).



Принимая в качестве рабочей гипотезы, что углеводная цепь пролактина имеет структуру А, мы поставили своей целью подтвердить ее главные, названные выше особенности.

Для этого был избран вариант, заключающийся в ферментативном отщеплении остатков галактозы, N-ацетилглюкозамина и маниозы, находящихся в 1–3-ветви углеводной цепи, с последующей деградацией полученного фрагмента по Смиту. С этой целью гликопептид (29–36) был обработан β -галактозидазой, β -N-ацетилглюкозаминидазой и α -маннозидазой, и образующиеся продукты разделены на колонке с гелем TSK-40. Как видно из рис. 1б, в результате ферментативного гидролиза образуются продукты меньшего молекулярного веса, чем исходный гликопептид (рис. 1а). Эти углеводные фрагменты были выделены препартивно в виде фракций I и II (рис. 1б) и далее очищены с помощью жидкостной хроматографии на колонке с DEAE-TSK (3 SW) в 0,5 М борат-фосфатном буфере. Главные углеводсодержащие компоненты фракций I и II (рис. 2) были выделены препартивно. Анализ их с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов показал, что они различаются по-

Относительное содержание моносахаридов в гликозилированном свином пролактине и его фрагментах

Препараты	GlcNAc	GalNAc	Man	Fuc	Gal
Пролактин (1–199)	4,3 *		3	0,7	0,4
Бромциановый фрагмент (1–36)	3,0	1,2	3	0,4	0,2
Химотрипсиновый гликопептид (29–36)	2,9	1,1	3	0,6	0,3
Продукты ферментативного гидролиза и деградации по Смиту					
I	1,7	0,9	3	0,6	0,4
II	2,2	1,2	2	0,7	0
I-1	2,2	0	1	0	0
II-1	2,0 *		0,3	0	0

* Суммарные гексозамины при определении на анализаторе углеводов.

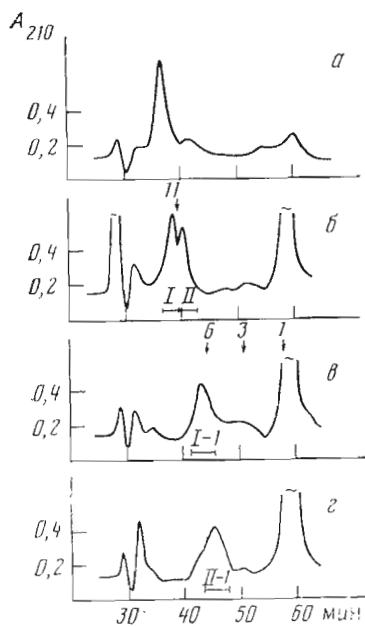


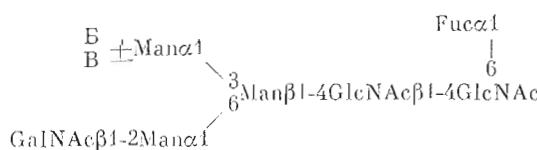
Рис. 1

Рис. 1. Гель-хроматография на колонке ($1500 \times 1,6$ мм) с TSK-40 исходного гликонентида (а), гликонентида после обработки гликозидазами (б), продукта деградации по Смиту фракции I (в), продукта деградации по Смиту фракции II (г). Элюент — вода, скорость $0,05$ мл/мин. 11, 6, 3 и 1 — маркеры молекулярной массы (упдекасахарид, гексасахарид, трисахарид известного строения и N-ацетилглюказамина соответственно)

Рис. 2. Хроматография фракций I и II рис. 1б на колонке ($150 \times 7,5$ мм) с DEAE-TSK (3SW). Элюент — $0,5$ М Na-борат, pH 6,5, +1% (по объему) 1 М NaH_2PO_4 ; скорость $1,2$ мл/мин

мимо молекулярной массы (рис. 1б) лишь содержанием маннозы (таблица) при очень близком соотношении глюказамина, галактозамина и фукозы.

Полученные результаты обработки гликонентида гликозидазами можно интерпретировать следующим образом: в то время как галактоза и остаток глюказамина отщепились практически полностью, остаток маннозы в 1-3-ветви отщепился в небольшой степени (\sim на 30%) и углеводные цепи во фрагментах I и II соответствуют структурам Б (+Man) и В (-Man):



Следует подчеркнуть, что фукоза сохраняется в обоих фрагментах, что исключает возможность ее присоединения к остаткам галактозы или N-ацетилглюказамина в 1-3-ветви углеводной цепи. Таким образом, наиболее вероятно, что фукоза (как и в случае многих других гликопротеинов) замещает остаток N-ацетилглюказамина, связанный с аспарагином.

Далее фрагменты I и II (рис. 2) были подвергнуты деградации по Смиту, при этом главными продуктами расщепления были несколько различающиеся по размеру фрагменты I-1 и II-1 (рис. 1в, г). Анализ этих фрагментов показал (таблица), что на 2 моль глюказамина в них приходится ~ 1 и $<0,3$ моль маннозы соответственно и, следовательно, углеводная цепь фрагментов I-1 и II-1 представляет собой три- и дисахарид (Г и Д):

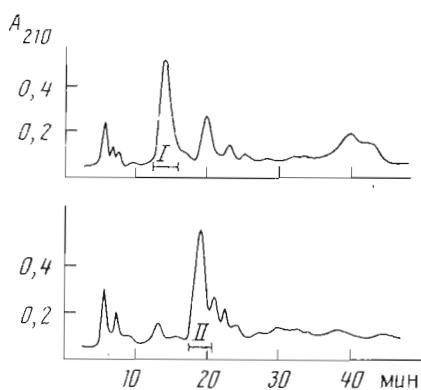
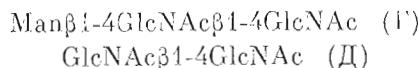


Рис. 2

С учетом того факта, что остаток β -маннозы, находящийся в узле разветвления к β рового пентасахарида, во всех известных случаях замещен по С3 и С6, из результатов деградации по Смиту следует, что ветвь GalNAc β 1-2Man во фрагментах I и II (структуры Б и В) замещает этот остаток маннозы в положении С6 и не препятствует окислению последнего во фрагменте II. В отличие от этого при окислении фрагмента I остаток β -маннозы сохраняется, поскольку он был дополнительно замещен остатком α -маннозы в положении С3.

Таким образом, в результате проведенного исследования нам удалось установить главные особенности структуры углеводной цепи гликозилированного свиного пролактина: наличие обычного пентасахаридного к β ра, присутствие N-ацетилгалактозамина в 1-б-ветви углеводной цепи и остатка фукозы при N-ацетилглюкозамине, связанном с аспарагином. Специального исследования относительно присутствия сульфатной группы в терминальном остатке N-ацетилгалактозамина не проводилось, однако ряд данных (ИК-спектры гликопептида 29–36, поведение при ионообменной хроматографии и диск-электрофорезе в ПААГ бромцианового фрагмента 1–36) указывает на такую возможность.

На основании полученных результатов мы считаем, что гликозилированный свиной пролактин имеет углеводную цепь, идентичную структуре А.

Углеводный состав гликозилированного пролактина овцы (GlcNAc₂, Man₁, Fuc₁) [6] соответствует фрагменту к β рового пентасахарида, типичного для N-связанных гликопротеинов, и является частью структуры А, установленной нами для свиного пролактина. При изучении в бесклеточной системе микросомального биосинтеза гликозилированного овечьего пролактина [13] было сделано предположение, что углеводная цепь этого гликопротеина является олигоманнозидной. Однако результаты, представленные нами, свидетельствуют о том, что углеводная цепь природной гликозилированной формы свиного пролактина относится к «сложному» типу N-связанных олигосахаридов.

Экспериментальная часть

В работе использовались β -галактозидаза из *Culvularia inaequalis*, β -N-ацетилглюказамиnidаза из почки быка (Serva) и α -маннозидаза из *Canavalia ensiformis* (Boehringer Mannheim GmbH).

Продукты деградации гликопептида разделяли на колонке (1500×1,6 мм) с гелем TSK-40 (superfine, Toyo Soda Comp.) при 50° С, используя в качестве элюента воду, и на колонке (150×7,5 мм) с DEAE-TSK (3SW) в 0,5 М Na-боратном буфере, pH 6,4, содержащем 1% (по объему) 1 М NaH₂PO₄; детекция при 210 нм.

Моносахаридный состав продуктов определяли с помощью анализатора углеводов (Biotronik LC 2000, ФРГ) на колонке (100×4 мм) с DA×8 (Difco, США) в 0,4 М Na-боратном буфере, pH 8,0, и аминокислотного анализатора (Biotronik LC 4020, ФРГ) на колонке (230×9 мм) с Aminech A-5 в 0,35 М Na-цитратном буфере, pH 5,3, после гидролиза при 100° С в течение 6 ч 3 М CF₃COOH и 4 М HCl соответственно.

Обработка гликопептида смесью гликозидаз. Сухой образец гликопептида (~150 нмоль) растворяли в 50 мкл 0,05 М Na-цитрат-ацетатного буфера, pH 4,6, содержащего 0,3 мМ ZnCl₂, прибавляли 50 мкл того же буфера, содержащего 20 мкг β -галактозидазы, 0,1 МЕ β -N-ацетилглюказамиnidазы и 20 мкг α -маннозидазы, смесь инкубировали 2 сут при 37° С, разделяли (в несколько приемов) на колонке с TSK-40 (рис. 1), фракции I и II далее хроматографировали на колонке с DEAE-TSK (3SW) и в полученных фракциях (I и II, рис. 2) определяли содержание моносахаридов (таблица).

Деградация фракций I и II по Смиту. К 25 мкл раствора фракций I или II (~40 нмоль) в воде приливали 25 мкл 0,05 М NaIO₄, смесь выдерживали в темноте 24 ч при 20° С, прибавляли ~2–3 мг NaBH₄, через 3 ч избыток NaBH₄ разрушали, добавляя CH₃COOH, и раствор упаривали несколько раз с метанолом. Остаток растворяли в 0,1 мл воды, раствор деионизовали на колонке (10 мл) с биогелем P-2 (элюент – вода) и фракцию (2–5 мл), содержащую фрагменты гликопептидов, упаривали. По-

лученный продукт гидролизовали 16 ч при 20° С 50 мкл 0,1 н. CF₃COOH, высушивали в вакуумном экскаторе, остаток растворяли в воде, хроматографировали на колонке с TSK-40, собирали фракции (I-1 и II-1, рис. 1) и после гидролиза определяли содержание в них моносахаридов (таблица).

ЛИТЕРАТУРА

1. Li C. H., Dixon J. S., Lo T. B., Schmidt K. D., Pankov Yu. A. Arch. Biochem. and Biophys., 1970, v. 141, № 2, p. 705–737.
2. Farkouh N. H., Packer M. G., Frantz A. G. J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1979, v. 84, № 6, p. 1029–1032.
3. Von Werder K., Clemm C. FEBS Lett., 1974, v. 47, № 2, p. 181–184.
4. Shoupe D., Montz F. J., Kletzky O. A., de Zerega G. S. Amer. J. Obstet. Gynecol., 1983, v. 147, № 5, p. 482–487.
5. Бутнев В. Ю., Панков Ю. А. Биохимия, 1984, т. 49, вып. 11, с. 1828–1839.
6. Lewis U. J., Singh R. N. P., Lewis L. J., Seavey B. K., Sinha Y. N. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984, v. 81, № 2, p. 385–389.
7. Lewis U. J., Singh R. N. P., Sinha Y. N., VanderLaan W. P. Endocrinology, 1985, v. 116, № 1, p. 359–363.
8. Pankov Yu. A., Butnev V. Yu. Int. J. Peptide and Protein Res., 1986, v. 28, № 2, p. 113–123.
9. Бутнев В. Ю., Панков Ю. А. Тез. докл. на симпозиуме «Химия и биохимия пептидно-белковых гормонов», 19–21 ноября 1985 г. Сузdalь, 1985, с. 8–9.
10. Sinha Y. N., Gilligan T. A., Lee D. W. J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1984, v. 58, № 4, p. 752–754.
11. Sinha Y. N., Gilligan T. A., Lee D. W., Hollingsworth D., Markoff E. J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1985, v. 60, № 2, p. 239–243.
12. Bedi G. S., French W. C., Buhl O. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 8, p. 4345–4355.
13. Strickland T. W., Pierce J. G. Endocrinology, 1985, v. 116, № 4, p. 1295–1298.

Поступила в редакцию
6.VI.1986

THE STRUCTURE OF THE CARBOHYDRATE CHAIN OF GLYCOSYLATED PORCINE PROLACTIN

BUTNEV V. Yu., ARBATSKY N. P.*; DEREVITSKAYA V. A.*; PANKOV Yu. A.

Institute of Experimental Endocrinology and Hormone Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;
*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

Cyanogen bromide and chymotryptic fragments both containing a carbohydrate chain were obtained from the glycosylated form of porcine prolactin. By means of the glycosidase hydrolysis and the Smith degradation the carbohydrate chain of the glycoprotein was shown to be of the «complex» type of N-bound oligosaccharides and identical to the chain of the luteinizing hormone.