



УДК 577.175.328'13:577.114.5

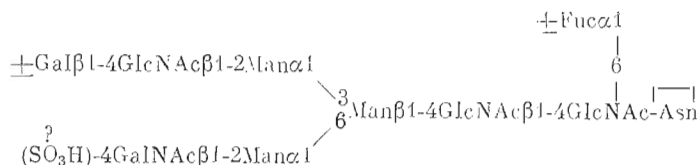
СТРУКТУРА УГЛЕВОДНОЙ ЧАСТИ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО СВИНОГО ПРОЛАКТИНА

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 бромцианового 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 Смитсу 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 аспарагину 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.

С учетом того факта, что остаток β -маннозы, находящийся в узле разветвления α -маннозного пентасакхаридного остатка, во всех известных случаях замещен по С3 и С6, из результатов деградации по Смитту 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 пентасакхаридного α -маннозного остатка, присутствие N-ацетилгалактозамина в 1-6-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, Man₃, Fuc₁) [6] соответствует фрагменту α -маннозного пентасакхаридного остатка 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 олигоманинозидной. 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-ацетилглюкозаминидаза 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 Corp.) 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, рН 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 (Durrum, США) в 0,4 М Na-боратном буфере, рН 8,0, и амниокислотного анализатора (Biotronik LC 4020, ФРГ) на колонке (230×9 мм) с Aminex A-5 в 0,35 М Na-цитратном буфере, рН 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 имоль) растворяли в 50 мкл 0,05 М Na-цитрат-ацетатного буфера, рН 4,6, содержащего 0,3 мМ ZnCl₂, прибавляли 50 мкл того же буфера, содержащего 20 мкг β -галактозидазы, 0,1 МЕ β -N-ацетилглюкозаминидазы 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 Смитту. К 25 мкл раствора фракций I или II (~40 имоль) 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 Р-2 (элюент — вода) и фракцию (2–5 мл), содержащую фрагменты гликопептидов, упаривали. По-

лученный продукт гидролизovali 16 ч при 20° С 50 мкл 0,1 н. CF₃COOH, высушвали в вакуумном эксикаторе, остаток растворяли в воде, хромотографировали на колонке с TSK-40, собирали фракции (I-1 и II-1, рпс. 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. 48, № 6, p. 1029-1032.
3. *Von Werder K., Clemm C.* FEBS Lett., 1974, v. 47, № 2, p. 181-184.
4. *Shoupe D., Moniz 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., Scavey 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, № 4, 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 пептидо-белковых гормонов», 19-21 ноября 1985 г. Суздаль, 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., Ruhl 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.