

В. А. ДЕРЕВИЦКАЯ, Л. М. ЛИХОШЕРСТОВ, М. Д. МАРТЫНОВА,
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

РАСЩЕПЛЕНИЕ ПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ГРУППОВОГО ВЕЩЕСТВА КРОВИ (А + Н) ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Нами с помощью химических методов и ферментативного гидролиза суммарной гликозидазой из *Clostridium perfringens* от группового вещества крови (ГВК) (А + Н), выделенного из слизистых оболочек желудков свиней, было отщеплено примерно 80% углеводов. Полученный высокомолекулярный фрагмент (ВФ4) с практически нерасщепленной пептидной цепью состоял из остатков аминокислот (~60%), N-ацетилгексозаминов (~34%) и незначительного количества галактозы, причем отношение N-ацетилгалактозамина к N-ацетилглюкозамину составляло ~7,5^(1, 2). Настоящая работа посвящена использованию этого фрагмента для изучения подходов к установлению структуры пептидной цепи ГВК.

Как известно, нативные ГВК достаточно устойчивы к действию протеолитических ферментов. Например, при действии на ГВК (А + Н) протелином* не наблюдается сколько-нибудь заметных изменений в молекулярном весе ГВК. Фрагмент ГВК ВФ4 равно как и препарат, полученный из этого фрагмента, после дополнительного гидролиза (рН 1,5; 3 часа; 100°) и последующего действия ферментного препарата из *Cl. perfringens* (ВФ5) уже заметно расщепляются протелином, однако при этом образуется набор гликопептидов с достаточно высоким молекулярным весом⁽¹⁾. Предполагая, что препятствием к более глубокому протеолитическому гидролизу

Таблица 1

Молярные отношения аминокислот^(АК) к N-ацетилгексозаминам (HexNAc) и галактозамина к глюкозамину в ВФ4, ВФ6 и во фракциях, полученных после ферментативного гидролиза*

Аминокислоты	ВФ4	ВФ6	Фракции (рис. 1)				Фракция Б (рис. 2)	Фракция В (рис. 3б)	Фракция А (рис. 4)
			22 — 23	29 — 30	37 — 38	42			
Σ АК/ Σ HexNAc	3,1	15,6	5,8	8,5	37,4		6,7		6,8
GalNAc/ GlnAc	7,3	3,0	1,5	3,1	13,3	0	0,18	0	1,7

* Здесь и в табл. 2 анализ проведен на анализаторе аминокислот после гидролиза 4N HCl, 24 часа, 100° для аминокислот и 4N HCl 6 час., 100° для гексозаминов. Сумма аминокислот приведена без учета аминокислот основного характера.

пептидной цепи в ВФ4 являются углеводные остатки, мы провели окисление ВФ4 периодатом (0,05 M NaJO₄, 20 час., 5°) и восстановление боргидридом калия образующегося полиальдегида. Полученный фрагмент (ВФ6) при гельфильтрации на сефадексе Г-50 выходит с фронтом растворителя и содержит, наряду с полиолами, 58% аминокислот и 5,3% N-ацетилгексозаминов при соотношении N-ацетилгалактозамина к N-ацетилглюкозамину, равном примерно 3 : 1. Предварительные опыты показали, что протеолитический гидролиз ВФ6 проходит более интенсивно, чем с ВФ4, и, таким образом, неотщепленные остатки полиолов, по-видимому,

* Протелин является препаратом с широким набором протеолитических активностей⁽³⁾, близким к препарату проназа⁽⁴⁾.

не оказывают серьезных препятствий действию ферментов. В этой связи мы исследовали продукты гидролиза ВФ6 протелином и папаином.

Действие на ВФ6 протелина (³). Протеолиз ВФ6 проводился последовательно сначала при pH 6,4, а затем при pH 8. Протеолиз при pH 6,4 (3% протелина от веса ВФ6; 0,0125 M трис-буфер + 0,005 M

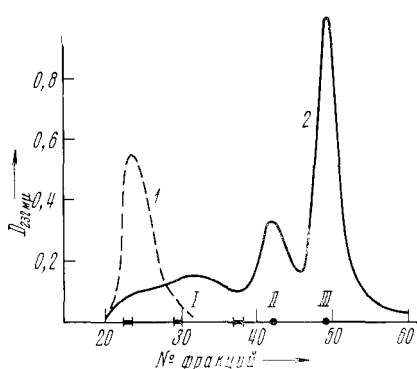


Рис. 1

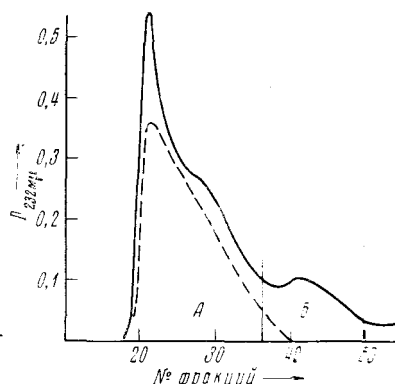


Рис. 2

Рис. 1. Гельфильтрация на сефадексе Г-25 (колонка $43 \times 0,9$ см, фракции по 0,55 мл) в 0,1 N уксусной кислоте продуктов гидролиза ВФ6 (5 мг) протелином при pH 6,4. Оптическая плотность при 232 мμ фракций, разбавленных до 2,5 мл: 1 — до обработки, 2 — после обработки. I, II, III — фракции

Рис. 2. Гельфильтрация на биогеле Р-2 (колонка $43 \times 0,9$ см) продуктов гидролиза ВФ7 протелином при pH 8. А, Б — фракции

$\text{Ca}(\text{OAc})_2$; 96 час.; 37°) приводит к интенсивному распаду ВФ6, и большая часть продуктов протеолиза ВФ6 не выходит с фронтом растворителя уже при гельфильтрации на сефадексе Г-25. Анализ продуктов расщепления, фракционированных на сефадексе Г-25 (рис. 1) *, показал, что во фракциях, соответствующих пику I, которые еще имеют достаточно высокий молекулярный вес (фракции 22—23, 29—30, 37—38), содержатся гликопептиды, а во фракциях, соответствующих пику II (фракция 42), содержатся главным образом свободные аминокислоты (треонин, серин и аланин) и небольшое количество низкомолекулярных пептидов (табл. 1, 2) **. Учитывая относительное содержание аминокислот в исходном ВФ6, следует отметить более интенсивное высщепление в виде самых низкомолекулярных продуктов остатков треонина, аланина, валина, лейцина и наименьшее высщепление остатков пролина, причем, последний входит практически только в состав мелких пептидов. Характерно распределение N-ацетилгексозаминов и некоторых аминокислот в образующихся гликопептидах. Более высокомолекулярные гликопептиды (фракция 22—23) примерно в 2,5 раза обогащены N-ацетилгексозаминами (на 1 моль гексозамина около 6 мол. аминокислот по сравнению с фракцией 16 в ВФ6), а относительное содержание остатков N-ацетилглюкозамина, аспарагиновой кислоты, пролина и глицина заметно возрастает. Самые низкомолекулярные гликопептиды (фракции 37—38) содержат из N-ацетилгексозаминов практически только N-ацетилгалактозамин. Однако в этих фракциях на 37 мол. аминокислот приходится всего один моль N-ацетилгексозамина, что указывает на

* Кривые гельфильтрации снимались по поглощению фракций при 232 мμ, которое близко соответствует реальным количествам вещества, согласно данным анализа фракций на аминокислоты и гексозамины.

** Соотношение свободных аминокислот и низкомолекулярных пептидов определено с помощью анализатора аминокислот после гидролиза соляной кислотой и без гидролиза. Контрольными опытами показано, что протелин полностью подвергается автолизу, продукты которого выходят в области пика II, а пик III (рис. 1) образуется за счет буфера.

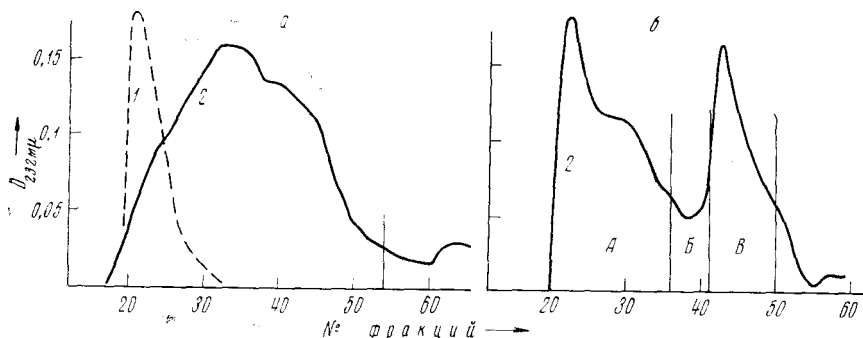


Рис. 3. Гельфильтрация (колонка $43 \times 0,9$ см) продуктов гидролиза ВФ6 (5 мг) папаином. Оптическая плотность при 232 мμ: 1 — до обработки, 2 — после обработки. а — на сефадексе Г-25, б — на биогеле Р-2

присутствие большого количества пептидов или пептидов, содержащих полиолы окисленных ранее углеводных остатков.

Для дальнейшего расщепления фракции, содержащей более высокомолекулярные гликопептиды (фракции 20—34, рис. 1, ВФ7), мы попытались использовать действие протелина при pH 8, при котором среди других

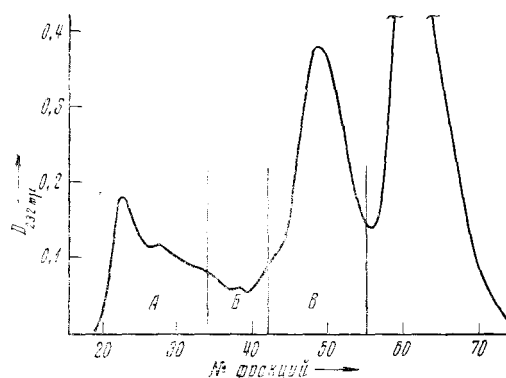


Рис. 4. Гельфильтрация на биогеле Р-2 (колонка $43 \times 0,9$ см) продуктов гидролиза фракции А (рис. 3б) протелином при pH 6,4. Оптическая плотность при 232 мμ. А, Б, В — фракции

проявляется, например, коллагеназная активность^(5, 6). ВФ7 инкубировали с протелином в трис-буфере pH 8 (3% протелина от веса ВФ7; 48 час.; 37°) и затем в боратном буфере pH 8 (3% протелина от веса ВФ7; 48 час.; 37°). Продукты протеолиза разделяли на биогеле Р-2 (рис. 2). Несмотря на то, что дополнительное действие протелина при pH 8 кажется незначительным, так как высокомолекулярный пик мало изменяется, а количество низкомолекулярной фракции невелико, наблюдается другое характерное распределение по фракциям N-ацетилгексозаминов и некоторых аминокислот. В высокомолеку-

лярной фракции А (рис. 2) превалирует N-ацетилгалактозамин (состав ее близок к фракции 29—30, рис. 1, табл. 1, 2), а в низкомолекулярной фракции Б, наоборот, приблизительно в 5,5 раз больше N-ацетилглюкозамина. Кроме того, во фракции Б отмечено необычно повышенное (примерно в 3 раза) содержание аспарагиновой, глутаминовой кислот и глицина. Это позволяет предположить, что N-ацетилглюкозамин связан с участком пептидной цепи, содержащим данные аминокислоты, и что возможно присутствие в ГВК, наряду с основным О-гликозидным типом углевод-пептидной связи^(7, 8), небольших количеств гликозиламидных связей остатков N-ацетилглюкозамина с аспарагиновой кислотой, обнаруженных во многих гликопротеинах.

Фракция Б (рис. 2) в настоящее время детально исследуется.

Действие на ВФ6 папаина. Интересно было исследовать возможность расщепления ВФ6 папаином. Пуштаи и Морган⁽⁹⁾ при действии папаина и фицина наблюдали расщепление на крупные фрагменты нативных ГВК системы АВО, выделенных из жидкости кисты яичника.

Таблица 2

Состав аминокислот в ВФ4, ВФ6 и во фракциях, полученных после ферментативного гидролиза. Содержание аминокислот выражено в мол. % относительно суммы аминокислот

Аминокислоты	ВФ4	ВФ6	Фракции (рис. 1)				Фракция Б (рис. 2)	Фракция В (рис. 3б)	Фракция А (рис. 4)
			22 — 23	29 — 30	37 — 38	42			
Аспарагиновая к-та	1,7	1,7	3,7	1,7	1,1	1,8	7,5	4,4	1,6
Треонин	31,4	31,5	24,8	27,7	29,4	35,5	14,9	28,6	24,8
Серин	16,1	15,2	16,0	15,5	15,0	13,5	10,4	20,5	16,4
Глутаминовая к-та	4,5	4,5	4,5	3,7	4,3	4,5	9,3	9,7	3,4
Пролин	23,2	23,1	25,9	31,1	30,8	9,6	15,7	7,9	35,6
Глицин	3,9	4,0	7,0	4,5	3,5	4,5	15,1	13,1	3,5
Аланин	8,9	9,1	7,3	7,9	8,3	11,8	11,9	8,1	7,5
Валин	5,5	5,9	5,7	5,2	4,6	9,0	6,7	3,4	4,4
Изолейцин	1,1	1,1	1,4	0,7	1,0	1,8	2,9	0,4	1,0
Лейцин	3,7	3,9	2,6	2,0	2,0	8,1	4,5	3,9	1,8

Мы провели ферментативный гидролиз ВФ6 папаином (7% папаина от веса ВФ6; 0,1 М ацетатный буфер + 0,01 М цистеина + 0,002 М ЭДТА, рН 5,4; 72 часа; 37°) и наблюдали достаточно интенсивное расщепление. Основная часть продуктов гидролиза при гельфилтрации на сефадексе Г-25 отстает от фронта растворителя (рис. 3а), а на геле Р-2 выходит в основном с фронтом растворителя (рис. 3б). N-ацетилглюкозаминны, так же как и при расщеплении протелином, содержатся в более высокомолекулярных фракциях, а в самых низкомолекулярных фракциях (фракция В, рис. 3б) содержится смесь аминокислот и мелких пептидов. Действие папаина приводит к иному, чем в случае протелина, высвобождению остатков аминокислот. Относительно более интенсивно высвобождаются папаином остатки аспарагиновой, глутаминовой кислот и глицина (табл. 2).

Последующее действие на более высокомолекулярные гликопептиды (фракция А, рис. 3б) протелина (3% протелина от веса фракции А, 0,0125 М трис-буфер + 0,005 М Са(ОАс)₂; рН 6,4; 72 часа; 37°) приводит к дополнительному интенсивному отщеплению аминокислот и мелких пептидов (фракция В, рис. 4). После фракционирования на биогеде Р-2 продуктов протеолиза в высокомолекулярной фракции гликопептидов (фракция А, рис. 4) содержится несколько иное, чем в случае действия на ВФ6 протелина, соотношение аминокислот (табл. 2), и, в частности, следует отметить очень высокое содержание пролина.

Приведенные в настоящей статье данные показывают, что расщепление фрагментов ГВК, содержащих лишь незначительное количество углеводов (типа ВФ6), протеолитическими ферментами впервые открывает реальный подход к изучению структуры пептидной части ГВК. С другой стороны, полученные предварительные данные указывают на существование в пептидной цепи ГВК участков с характерным составом и, вероятно, последовательностью аминокислот.

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

Поступило
13 VII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. К. Кочетков, В. А. Деревицкая и др., ДАН, 186, 1195 (1969). ² N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya et al., Carbohydrate Res., 12, 437 (1970). ³ Ю. А. Рассулин, Е. Д. Каверзнева, Биохимия, 33, 857 (1968). ⁴ M. Nomoto, Y. Narahashi, M. Murakami, J. Biochem., 48, 593 (1960). ⁵ Г. А. Нестерова, Е. Д. Каверзнева, Прикл. биохимия и микробиол., 6, 62 (1970). ⁶ Ю. А. Рассулин, В. А. Шибнев, Изв. АН СССР, сер. хим., 1970, 2372. ⁷ В. А. Деревицкая, С. Г. Кара-Мурза, Н. К. Кочетков, ДАН, 163, 650 (1965). ⁸ E. A. Kabat, E. W. Bassett et al., Biochemistry, 4, 1632 (1965). ⁹ A. Pusztai, W. T. J. Morgan, Biochem. J., 81, 639 (1961); 81, 648 (1961).