

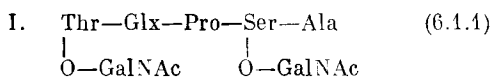
Член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ,
В. А. ДЕРЕВИЦКАЯ, Л. М. ЛИХОШЕРСТОВ, С. А. МЕДВЕДЕВ

**ГЛИКОПЕПТИДЫ ИЗ ГРУППОВОГО ВЕЩЕСТВА КРОВИ.
ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОПЕПТИДА С ДВУМЯ
УГЛЕВОД-ПЕПТИДНЫМИ СВЯЗЯМИ**

Ранее ⁽¹⁾ нами была разработана процедура деградации группового вещества крови (г.в.к.), которая, после отщепления 95% углеводов приводила к смеси низкомолекулярных гликопептидов, содержащих моносахаридные остатки. Расщепление г.в.к. (А+Н) (из слизистых желудков свиней) осуществлялось сочетанием химических (дегидратация по Смитцу) и ферментативных методов (препарат суммарной гликозидазы из *Clostridium perfringens* ⁽²⁾, проназа). Полученная смесь гликопептидов разделялась на катионите Аминекс АС-50Х2 на 19 фракций ^(3, 4). Из ряда фракций были выделены пять гликопептидов ^(1, 3-5).

Данная работа посвящена выделению и установлению структуры восьми новых гликопептидов, выделенных из той же смеси. Наиболее интересный из выделенных гликопептидов — гликопептид с двумя узлами углевод-пептидных связей.

Для выделенных новых индивидуальных гликопептидов использовались фракции 6, 7, 9—13, полученные после ионообменной хроматографии на Аминексе АС-50Х2 ^(3, 4). Эти фракции подвергались высоковольтному электрофорезу при разных рН (Ватман 3 мм; 60 в/см; 1,5 часа; HCOOH—CH₃COOH—H₂O, 5 : 5 : 80, рН 1,9; C₅H₅N—CH₃COOH—H₂O, 1 : 10 : 289, рН 3,7; прибор L24 «Shandon Southern») и хроматографии на бумаге (Ватман 3 мм; C₅H₅OH—C₅H₅N—CH₃COOH—H₂O, 45 : 30 : 9 : 36; восходящая, 4 раза по 20 час). После каждой стадии очистки контролировался состав полученных гликопептидов. В гидролизатах гликопептидов (4 N HCl, 105°, 20 час.) определялось одновременно содержание аминокислот и гексозаминов на анализаторе аминокислот (LC 4010 «Biotronik»). Последовательность аминокислот в гликопептидах определялась ступенчатой деградацией по Эдману с определением состава остающихся аминокислот. Распад по Эдману проводился по методике ⁽⁶⁾, с тем отличием, что для реакции с фенилизотиоцианатом гликопептид растворялся в 0,5% растворе триэтиламина в 60% пиридине. В некоторых случаях С-концевые аминокислоты определялись с помощью гидролиза ^(7, 8). Структура гликопептидов подтверждалась результатами периодатного окисления (0,015 M NaJO₄, 2 часа, 20°). Периодат разлагался 100-кратным избытком этиленгликоля (30 мин.), продукты окисления восстанавливались NaBH₄ (1,5% раствор NaBH₄, 2 часа, 20°), гидролизовались 4 N HCl (20 час., 105°) и содержание аминокислот и гексозаминов в гидролизате определялось на анализаторе аминокислот. Таким образом, были выделены следующие гликопептиды *:



*При нумерации гликопептидов первая цифра обозначает номер фракции при хроматографии на Аминексе АС-50Х2, а последующие — номера зон при последовательных электрофоретических и хроматографических разделениях, считая от зоны с меньшей подвижностью.

II. Thr—Thr O- α -GalNAc	(13.3.2)	III. Ser—Ser O—GalNAc	(13.3.1)
IV. Ser—Ala—(Thr, Pro) O—GalNAc	(7.2.1)		
V. Ser—Pro—Ala O—GalNAc	(12.2.2)	VI. Thr—Pro—Thr O—GalNAc	(11.2.2)
VII. Ser—Thr—Pro O—GalNAc	(9.3.3)	VIII. Thr—Ser—Pro O—GalNAc	(10.2.3)

[O-(N-ацетилгалактозаминил)-треонил] - [(глутамил или глутаминил)-пролил] - [O-(N-ацетилгалактозаминил)-серил]-аланин (I, гликопептид 6.1.1) выделен электрофорезом при pH 1,9 (элюция зоны 1 состава Thr:Ser:Glu:Pro:Ala:GalN 1,16:1,36:0,84:0,92:0,90:2,0) с последующей хроматографией на бумаге (элюция зоны 1) и имел состав Thr:Ser:Glu:Pro:Ala:GalN 0,96:1,04:0,92:0,96:0,98:2,0. Последовательность аминокислот в гликопептиде определялась из результатов четырех ступеней деградации по Эдману, а С-концевая аминокислота также и гидразинолизом (0,25 мл безводного NH_2NH_2 ; 0,5 мг $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ 10 час., 100°). Так как гидразинолиз гликопептидов очень мало изучен, параллельно с гидразинолизом гликопептида I проводилась обработка гидразином гликопептида [O-(N-ацетилгалактозаминил)-серил]-серина (III). При анализе продуктов гидразинолиза гликопептида I на анализаторе аминокислот наблюдался единственный пик, соответствующий аланину, а для гликопептида III — также один пик, соответствующий серину.

При периодатном окислении гликопептида I полностью разрушались два моля N-ацетилгалактозамина, а N-концевой треонин не затрагивался. После трех ступеней деградации по Эдману в оставшемся гликопептиде N-концевой серин также не окислялся периодатом. Это служит доказательством того, что каждая из входящих в гликопептид I оксаминнокислот связана O-гликозидной связью с остатком N-ацетилгалактозамина.

[O-(α -N-ацетилгалактозаминил)-треонил]-треонин (II, гликопептид 13.3.2), имеющий состав Thr:GalN 2,05:1,0, выделяли электрофорезом при pH 1,9 (элюция зоны 3 состава Thr:Ser:Ala:GalN 1,1:1,4:0,5:1,0) и хроматографией на бумаге (элюция зоны 2). Последовательность аминокислот определялась двумя ступенями деградации по Эдману. При периодатном окислении гликопептида полностью разрушался N-ацетилгалактозамин, а треонин не затрагивался, что подтверждает структуру, в которой гексозамин связан с N-концевым треонином. Высокое положительное вращение $[\alpha]_D^{20} + 75^\circ$ ($C=0,01$ в воде, рассчитана по данным определения треонина на анализаторе аминокислот) указывает на α -конфигурацию O-галактозаминидной связи с остатком треонина в исследуемом г.в.к. Наличие N-ацетильной группы в остатке гексозамина в этом и других гликопептидах принята по аналогии с гликопептидами выделенными ранее (^{3, 4}).

[O-(N-ацетилгалактозаминил)-серил]-серин (III, гликопептид 13.3.1), имеющий состав Ser:GalN 1,98:1,0, выделен электрофорезом при pH 1,9 (элюция зоны 3 состава Thr:Ser:Ala:GalN, 1,1:1,4:0,5:1,0) с последующей хроматографией на бумаге (элюция зоны 1). Строение III определялось аналогично гликопептиду II.

[O-(N-ацетилгалактозаминил)-серил]-аланил-(треонин, пролин) (IV, гликопептид 7.2.1), имеющий состав Thr:Ser:Pro:Ala:GalN 1,1:0,98:0,95:1,04:1,0, выделяли электрофорезом при pH 1,9 (элюция зоны 2 состава Thr:Ser:Pro:Ala:Gly:GalN 1,4:1,2:1,5:0,97:0,6:1,0) и хроматографией на бумаге (элюция зоны 1). Строение IV определялось аналогично гликопептиду II. Вследствие малого ко-

личества вещества последовательность двух последних аминокислот не удалось установить.

[O-(N-ацетилгалактозаминил)-серил]пролил-аланин (V, гликопептид 12.2.2), имеющий состав Ser : Ala : Pro : GalN 0,95 : 1,05 : : 1,0 : 1,0, выделяли электрофорезом при pH 1,9 (элюция зоны 2 состава Thr : Ser : Ala : Pro : GalN 0,5 : 0,98 : 1,2 : 1,1 : 1,0) и при pH 3,7 (элюция зоны 2). Последовательность аминокислот в гликопептиде определялась тремя ступенями деградации по Эдману. Место присоединения N-ацетилгалактозамина следует из устойчивости к периодатному окислению N-концевого серина, тогда как гексозамин полностью разрушается.

[O-(N-ацетилгалактозаминил)-треонил]-пролил-треонин (VI, гликопептид 11.2.2) имеющий состав Thr : Pro : GalN 1,94 : 1,03 : : 1,0, выделен электрофорезом при pH 1,9 (элюция зоны 2 состава Thr : Ser : Pro : Ala : GalN 2,4 : 0,8 : 1,1 : 0,6 : 1,0) и хроматографией на бумаге (элюция зоны 2). Доказательство строения VI проводилось аналогично гликопептиду V.

[O-(N-ацетилгалактозаминил)-серил]-треонил-пролин (VII гликопептид 9.3.3), имеющий состав Thr : Ser : Pro : GalN 0,94 : 1,02 : : 1,03 : 1,0, выделен электрофорезом при pH 1,9 (элюция зоны 3 состава Thr : Ser : Pro : Ala : GalN 1,9 : 0,78 : 0,79 : 0,57 : 1,0) с последующей хроматографией на бумаге (элюция зоны 3). Строение определялось аналогично гликопептиду V.

Треонил-[O-(N-ацетилгалактозаминил)-серил]-пролин (VIII, гликопептид 10.2.3), имеющий состав Thr : Ser : Pro : GalN 0,98 : : 0,96 : 1,05 : 1,0, выделен электрофорезом при pH 1,9 (элюция зоны 2 состава Thr : Ser : Pro : Ala : Gly : GalN 1,3 : 1,1 : 1,2 : 0,5 : 0,6 : 1,0) и хроматографией на бумаге (элюция зоны 3). Проводилась трехступенчатая деградация по Эдману. При периодатном окислении гликопептида полностью разрушался треонин и N-ацетилгалактозамин, тогда как при окислении гликопептида, оставшегося после первой ступени распада по Эдману, серин практически не затрагивался. Это является доказательством того, что остаток N-ацетилгалактозамина присоединен к остатку серина.

На основании полученных сведений о структуре гликопептидов, выделенных из продуктов деградации г.в.к. (A+H), можно сделать некоторые выводы о строении пептидной цепи вблизи участков углеводов — пептидных связей.

Выделение гликопептида I, несущего два моносахаридных остатка, дает первые представления о последовательности аминокислот между двумя углевод — пептидными связями. Обращает на себя внимание малое расстояние между узлами углеводов — пептидных связей в этом гликопептиде. На основании анализа олигосахаридов, выделенных продуктов расщепления г.в.к. N щелочным боргидридом, было высказано предположение, что молекула г.в.к. содержит большее число углеводных цепей, чем считалось ранее (⁹, ¹⁰). Данные, полученные в результате установления структуры гликопептида I находятся в соответствии с этим предположением.

Из аминокислотной последовательности гликопептидов, выделенных ранее (³) и рассмотренных здесь (I—VIII), следует, что обязательным ближайшим соседом оксаминокислоты, несущей углеводную цепь, является, по-видимому, неполярная аминокислота — пролин или аланин (для гликопептида I — обе эти аминокислоты), а вторым, часто встречающимся соседом является полярная аминокислота — треонин или серин. Ранее была показана α -конфигурация гликозидной связи N-ацетилгалактозамина с серином (⁴). Выделение гликопептида II, непосредственно подтверждает α -конфигурацию O-гликозидной углевод-пептидной связи с треонином.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 52, 748 (1973). ² Л. М. Лихошерстов, М. Д. Маргынова, В. А. Деревецкая, *Биохимия*, т. 33, 1135 (1968). ³ В. А. Деревецкая, Л. М. Лихошерстов и др., *ДАН*, т. 213, 220 (1973). ⁴ N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 56, 311 (1974). ⁵ В. А. Деревецкая, Л. М. Лихошерстов и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, 1974, 461. ⁶ P. H. Morgan, H. G. Jacobs et al., *J. Biol. Chem.*, v. 245, 5042 (1970). ⁷ W. R. Gray, *Methods in Enzymology*, v. 11, N. Y., 1967, p. 151. ⁸ В. А. Дмитриев, Ю. А. Книрел, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.*, v. 29, 451 (1973). ⁹ D. M. Marcus, E. A. Kabat, G. Schiffman, *Biochemistry*, v. 3, 437 (1964). ¹⁰ N. K. Kochetkov, V. A. Derevitskaya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 39, 583 (1970).