



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

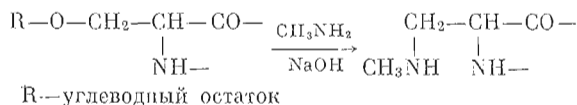
УДК 577.150.4

## ОБНАРУЖЕНИЕ О-ГЛИКОЗИДНОЙ СВЯЗИ В НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЕ ИЗ ДРОЖЖЕЙ РЕАКЦИЕЙ С МЕТИЛАМИНОМ

Лебедева З. И., Аваева С. М.

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Одним из основных типов углевод-пептидных связей в гликопротеинах являются О-гликозидные связи с остатком серина и треонина. Известно, что под действием щелочи происходит расщепление таких связей по механизму β-элиминирования с образованием α,β-ненасыщенных аминокислот, которые могут быть идентифицированы различным образом [1—9]. Ранее было показано, что взаимодействие белков с метиламином и щелочью может быть использовано для определения содержания в них фосфосерина и цистина [10]. Было установлено, что реакция протекает через стадию β-элиминирования с последующим присоединением метиламина по двойной связи. На основании этих данных было сделано предположение, что взаимодействие гликопротеинов, содержащих β-гликозидные связи, с метиламином и щелочью будет идти по тому же пути и приводить к тем же продуктам, как и в случае белков, содержащих фосфосерин и цистин.



Превращение щелочно-лабильных производных серина в β-N-метилдиаминопропионовую кислоту (СН<sub>3</sub>ДАП) означает получение в конечном гидролизате устойчивой, неприродной аминокислоты, для количественного определения которой предложено использование аминокислотного анализатора [11].

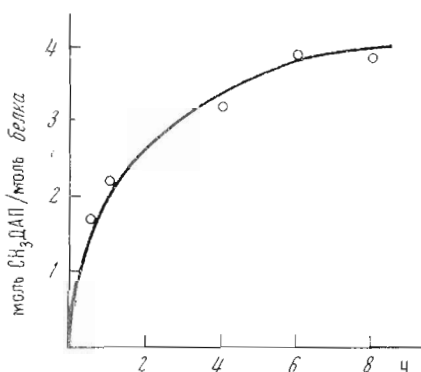
В работе было изучено взаимодействие неорганической пирофосфатазы из дрожжей с метиламином и щелочью. До настоящего исследования не было никаких данных относительно присутствия в ферменте О-гликозидных связей. Поскольку пирофосфатаза не содержит в своем составе ни фосфосерина, ни цистина [12], появление в кислотном гидролизате белка, обработанного метиламином и щелочью, СН<sub>3</sub>ДАП должно было свидетельствовать о том, что пирофосфатаза — гликопротеин, имеющий углеводный остаток, соединенный О-гликозидной связью с гидроксильной группой остатка серина.

Реакционную смесь, содержащую  $1,75 \cdot 10^{-4}$  М фермента с удельной активностью 1400 ед/мг белка и гомогенного при электрофорезе на полиакриламидном геле, 1 М  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  и 0,25 М NaOH, термостатировали при  $37^\circ$ . За ходом реакции следили по образованию  $\text{CH}_3\text{ДАП}$ . Для этого из реакционной смеси через определенные промежутки времени отбирали аликвоты для проведения полного кислотного гидролиза. Гидролизат анализировали на аминокислотном анализаторе в 0,35 н. цитратном буфере (рН  $6,03 \pm 0,02$ ), высота колонки 50 см, температура  $27-28^\circ$ , скорость 60 мл/ч [11]. Результаты образования  $\text{CH}_3\text{ДАП}$  во времени представлены на рисунке. Полученные данные свидетельствуют о том, что в молекуле пиррофосфатазы имеются 4 углеводных остатка, связанных с помощью О-гликозидных связей с гидроксильными группами серина. Так как фермент состоит из двух одинаковых субъединиц [13—16], то на одну субъединицу приходится 2 углеводных остатка. Из рисунка также следует, что реакция фермента с метиламином и щелочью заканчивается за 6 ч. Ранее было установлено, что остатки фосфосерина независимо от природы белка превращаются в  $\text{CH}_3\text{ДАП}$  в течение 8 ч, а остатки цистина — в течение 2 ч. Таким образом, при наличии в белке фосфосерина, цистина и О-гликозилсерина возможно раздельное определение остатков цистина и суммарное определение фосфосерина и О-гликозилсерина.

Доказательство присутствия в пиррофосфатазе углеводных остатков, кроме описанного факта образования  $\text{CH}_3\text{ДАП}$ , было основано на исследовании гидролизатов белка. При обработке белка 4н. HCl при  $105^\circ$  в реакционной смеси обнаруживают глюкозамин и галактозамин. Наиболее удобными условиями анализа этих аминокислот с помощью аминокислотного анализатора являются использование 50 см колонки и элюция буфером рН 6,0, т. е. условий, используемых для количественного определения  $\text{CH}_3\text{ДАП}$ . В этих условиях аминокислота выходят с колонки вскоре после начала элюции в виде острых симметричных пиков после нейтральных аминокислот и до основных аминокислот. Необходимо отметить, что кислотный гидролиз гликопротеинов сопровождается неизбежным разрушением аминокислот, что затрудняет определение их количественного состава. В то же время определение числа О-гликозидных связей в белке по образованию  $\text{CH}_3\text{ДАП}$  лишено этого недостатка, так как  $\text{CH}_3\text{ДАП}$  устойчива при кислотном гидролизе.

В работе была показана возможность использования в реакции меченого метиламина. Реакционную смесь, содержащую  $0,72 \cdot 10^{-4}$  М пиррофосфатазы, 1 М  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  и 0,25 М NaOH, выдерживали при  $37^\circ$  в течение 1 ч. Белок отделяли от меченого метиламина гель-фильтрацией на сефадексе G-25, и количество включаемого метиламина определяли, просчитывая аликвоты в сцинтилляционном счетчике. В условиях опыта происходит включение 1,9 молей метиламина на моль белка, что хорошо согласуется с данными аминокислотного анализа.

Таким образом, показано, что реакция метиламина с белками может быть использована для обнаружения О-гликозидной связи в белках. Использование меченого метиламина позволяет, во-первых, увеличить чувствительность метода, во-вторых, облегчает идентификацию присоединения углеводного остатка к белку.



Образование  $\text{CH}_3\text{ДАП}$  в неорганической пиррофосфатазе под действием 1 М  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  и 0,25 М NaOH

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson B., Seno N., Sampson P., Riley J. G., Hoffman P., Meyer K. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, PC 2716.
2. Tanaka K., Bertolini M., Pigman W. (1964) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **16**, 404—409.
3. Harbon S., Herman G., Rossignol B., Jolles P., Clauser H. (1964) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **17**, 57—61.
4. Carubelli R., Bhavanandan V. P., Gottschalk A. (1965) *Biochim. et biophys. acta.*, **101**, 67—82.
5. Carlson D. M. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 616—626.
6. Weber P. and Winzler R. J. (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **129**, 534—538.
7. Simpson D. L., Hranisavljevic J., Davidson E. A. (1972) *Biochemistry*, **11**, 1849—1856.
8. McLean C., Werner D. A., Aminoff D. (1973) *Anal. Biochem.*, **55**, 72—81.
9. Downs F., Herp A., Moschera J., Pigman W. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **328**, 182—192.
10. Колесникова В. Ю., Склянкина В. А., Баратова Л. А., Назарова Т. И., Аваева С. М. (1974) *Биохимия*, **39**, 287—293.
11. Baratova L. A., Sklyankina V. A., Kolesnikova V. Yu., Avaeva S. M. (1972) *J. Chromatogr.*, **70**, 162—163.
12. Ковальчук О. В., Аваева С. М. (1974) *Химия природных соединений*, **3**, 389—395.
13. Butler L. G. (1971) in *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.) 3rd Ed., vol. 4, pp. 529—541, Academic Press, N. Y.
14. Hansen G., Eiller R., Heitmann P. (1972) *Acta Biol. Med. Cern.*, **28**, 977—987.
15. Henrikson R. L., Sterner R., Noyes C., Cooperman B. S., Bruckmann R. H. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2521—2528.
16. Baratova L. A., Lebedeva Z. I., Belyanova L. P., Avaeva S. M. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **59**, 653—657.

Поступила в редакцию  
31.X.1974