



УДК 577.152.274\*8'112.5

**НУКЛЕОЗИДДИФОСФАТКИНАЗА СЕТЧАТКИ БЫКА  
ЯВЛЯЕТСЯ ГЛИКОПРОТЕИНОМ**© 1996 г. Г. Н. Карашук, Д. Л. Какуев, А. В. Яхъяев<sup>#</sup>, Н. Г. АбдулаевИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступило в редакцию 04.03.96 г.

Обнаружено присутствие углеводных остатков в нуклеозиддифосфаткиназе (NDP-киназе) сетчатки быка. Субъединицы NDP-киназы, разделенные с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, переносили на мембрану Immobilon<sup>TM</sup>-P и исследовали их углеводный состав. Показано, что обе субъединицы содержат одинаковые количества галактозы, маннозы, фукозы, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилглюкозамина. Общее содержание углеводов в NDP-киназе составляет 2–3% от веса белка.

*Ключевые слова:* сетчатка глаз быка; нуклеозиддифосфаткиназа, гликопротеин.

Нуклеозиддифосфаткиназа (NDP-киназа; АТР:NDP-фосфотрансфераза, КФ 2.7.4.6) катализирует перенос терминального фосфата с нуклеозидтрифосфатов, главным образом с АТР, на нуклеозиддифосфаты с низкой специфичностью к субстрату. Долгое время считалось, что основной функцией этого фермента является создание запаса нуклеозидтрифосфатов, необходимых для различных функций клетки [1]. Наш интерес к этому ферменту обусловлен исключительной ролью GTP в процессах превращения в клетках сетчатки энергии света в зрительный сигнал. Являясь субстратом трансдуцина и гуанилатциклазы, ключевых ферментов фоторецепторов, GTP контролирует процесс возбуждения и десенситизации зрительных клеток [2].

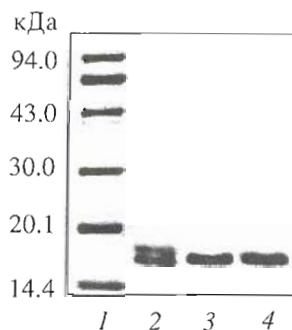
Интерес к изучению NDP-киназы значительно возрос за последние годы в связи с участием этого фермента в целом ряде функций клеток, таких, как пролиферация, рост и развитие, онкогенез и регуляция транскрипции, подавление образования метастазов [3]. В настоящее время известны аминокислотные последовательности NDP-киназ бактериальных и животных клеток [4]. Нами недавно была определена структура NDP-киназы сетчатки быка [5]. Этот фермент имеет высокую гомологию с NDP-киназами из других источников, в том числе с NDP-киназой эритроцитов человека [6].

Для всех NDP-киназ характерна олигомерная структура, преимущественно гексамерная. Интересно, что в отличие от других NDP-киназ эукариотов NDP-киназа сетчатки быка образует в растворе тетрамер.

NDP-киназа сетчатки быка, так же как и NDP-киназы печени крысы [7], мозга быка [8], эритроцитов человека [9], состоит из двух субъединиц. Несмотря на то что субъединицы между собой

высокоомологичны и содержат одинаковое количество аминокислот, при анализе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-ПААГ) NDP-киназа образует две полипептидные полосы с молекулярной массой 17.5 и 18.5 кДа (рисунок). Такое различие молекулярных масс можно было бы объяснить возможными посттрансляционными модификациями, но до сих пор в литературе отсутствовали данные об этом. В настоящей работе мы впервые показываем, что NDP-киназа сетчатки быка содержит углеводные остатки и является, таким образом, гликопротеином.

Для углеводного анализа полипептидные цепи NDP-киназы разделяли с помощью SDS-ПААГ по Лэммли [10] и переносили на мембрану Immobilon<sup>TM</sup>-P (Millipore). Мембрану окрашивали Ронсеан S (Sigma) и вырезали полосы, соответствующие субъединицам NDP-киназы. Затем полосы обесцвечивали, тщательно промывали водой и высушивали. Кислотный гидролиз олигосахаридов проводили смесью 4 М трифторуксусной и 4 М соляной кислот (1 : 1) [11]. Гидролизат обрабатывали



Электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ [10] NDP-киназы сетчатки быка (2) и продуцируемых в *E. coli* двух субъединиц NDP-киназы (3), (4). 1 – стандарты молекулярных масс.

<sup>#</sup> Автор для переписки. E-mail: yakh@ibch.siobc.ras.ru.

Анализ углеводного состава субъединиц NDP-киназы сетчатки быка\*

Моносахариды	Содержание углеводов		
	%**	мкг	ммоль/моль субъединиц
Gal	30.6	0.11	736
Man	25.0	0.09	602
GlcNAc	33.3	0.12	653
Fuc	2.8	0.01	73
GalNAc	8.3	0.03	163

\* Для анализа использовали по 15 мкг каждой субъединицы NDP-киназы. Данные анализа одинаковы для обеих субъединиц. Количественное определение углеводов проводили в виде 7-амино-4-метилкумариновых производных методом ВЭЖХ.

\*\* Процентное содержание в углеводной фракции.

специфичной для углеводов флуоресцентной меткой – 7-амино-4-метилкумарином [12]. Качественный и количественный моносахаридный состав определяли ВЭЖХ на колонке Ultrasphere ODS (Beckman) [12] с водной мобильной фазой, содержащей 6.8% 2-изопропанола, 3.5% ацетонитрила и 0.01% трифторуксусной кислоты.

Согласно результатам углеводного анализа, обе субъединицы содержат галактозу, маннозу, фукозу, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин (таблица). Общее содержание углеводов составляет 2–3% от веса белка. Следовательно, NDP-киназа является гликопротеином с низким содержанием углеводов. Проведенный нами анализ первичных структур NDP-киназ из различных источников показывает, что они не содержат характерных для N-гликозилирования последовательностей [13]. Это позволяет предположить, что олигосахаридные цепи присоединяются к NDP-киназе сетчатки быка посредством O-гликозидной связи. Следует отметить, что субъединицы NDP-киназ сетчатки быка, продуцированные в *E. coli* [5], при SDS-ПААГ-электрофорезе показывают одинаковую электрофоретическую подвижность (рисунок). Возможно, NDP-киназы эукариотических клеток подвергаются посттрансляционным модификациям, которые влияют на их электрофоретическое поведение.

Недавно было показано, что NDP-киназа эритроцитов человека является фактором транскрип-

ции онкогена *c-myc* [14]. Фермент, продуцированный в бактериальных клетках, обладает значительно меньшей способностью активировать транскрипцию. Вопрос о том, связана ли способность NDP-киназы эритроцитов человека функционировать в качестве фактора транскрипции с наличием в ней олигосахаридных цепей, остается на сегодня открытым. Обнаруженное нами впервые гликозилирование NDP-киназы может пролить свет на механизм ее функционирования.

Авторы приносят благодарность О.М. Ходовой и Н.В. Бовину за помощь в проведении углеводного анализа.

Данная работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 94-04-13118а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agarwal R.P., Robison B., Parks R.E., Jr. // *Methods Enzym.* 1978. V. 51. P. 376–386.
2. Lagnado L., Baylor D. // *Neuron.* 1992. V. 8. P. 995–1002.
3. De La Rosa A., Williams R.L., Steeg P.S. // *BioEssays.* 1995. V. 17. P. 53–62.
4. Izumiya H., Yamamoto M. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 27859–27864.
5. Abdulaev N.G., Karashchuk G.N., Gaidarov I.O., Kakuev D.L., Solov'eva O.V. // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 1995. V. 36. P. S268.
6. Stahl J.A., Leone A., Rosengard A.M., Porter L., King C.R., Steeg P.S. // *Cancer Res.* 1991. V. 51. P. 445–449.
7. Kimura N., Shimada N. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 4647–4653.
8. Nickerson J.A., Wells W.W. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 11297–11304.
9. Presecan E., Vonica A., Lascu I. // *FEBS Lett.* 1989. V. 250. P. 629–632.
10. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
11. Takemoto H., Hase S., Ikenaka T. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 145. P. 245–250.
12. Хорлин А.Я., Шиян С.Д., Маркин В.А., Насонов В.В., Мирзаянова М.Н. // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. С. 1203–1212.
13. Gooley A.A., Packer N.H., Pisano A., Redmond J.W., Williams K.L., Jones A., Loughnan M., Alewood P.F. // *Techniques in Protein Chemistry.* V. 6. Acad. Press Inc., 1995. P. 83–90.
14. Postel E.H., Berberich S.J., Flint S.J., Ferrone C.A. // *Science.* 1993. V. 261. P. 478–480.

## Nucleoside Diphosphate Kinase from Bovine Retina is a Glycoprotein

G. N. Karashchuk, D. L. Kakuev, A. V. Yakhyaev, and N. G. Abdulaev

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

**Abstract**—Nucleoside diphosphate (NDP) kinase from bovine retina was found to contain carbohydrates. The subunits of NDP kinase were separated by SDS-PAGE, blotted onto an Immobilon™-P membrane, and their carbohydrate content was determined. Both subunits contained equal amounts of Gal, Man, Fuc, Gal-NAc, and Glc-NAc. The total carbohydrate content was 2 to 3% of the protein weight.

**Key words:** bovine retina, nucleoside diphosphate kinase, glycoprotein.