



УДК 547.455'913.3'118.057

СИНТЕЗ ДОЛИХИЛ[β - ^{33}P]ПИРОФОСФАТА И ДОЛИХИЛПИРОФОСФАТ[^{14}C]МАННОЗЫ

*Шабалин Ю. А., Наумов А. В., Вагабов В. М.,
Кулаев И. С., Данилов Л. Л.*, Шибяев В. Н.**

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР,
Пушино Московской обл.;*

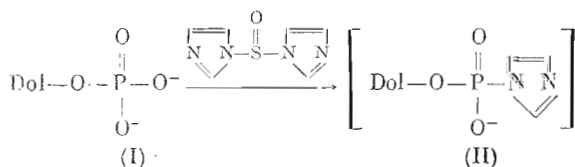
**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

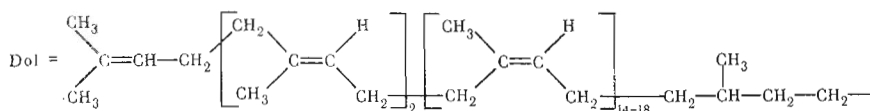
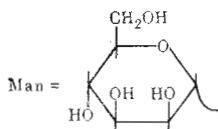
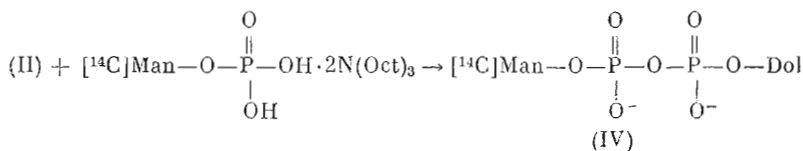
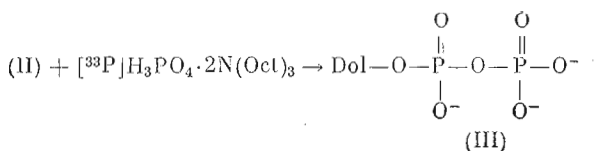
Долихил[β - ^{33}P]пирофосфат получен реакцией долихилфосфоимидазолида с бис-(три-*n*-октиламмоний) [^{33}P]фосфатом. Аналогично из долихилфосфоимидазолида и α -*D*-[^{14}C]маннопиранозилфосфата синтезирована долихилпирофосфат- α -*D*-[^{14}C]маннопираноза.

Фосфаты долихолов (длинноцепочечных полипренолов с насыщенным α -изопреновым звеном) и их гликозилированные формы являются промежуточными соединениями в биосинтезе углеводных цепей гликопротеинов эукариот [1]. Для исследования метаболизма производных долихола необходимы меченые субстраты. В последнее время интенсивно изучаются биохимические реакции долихилпирофосфата, высвобождающегося в процессе переноса олигосахаридных блоков на белок-акцептор. Было показано, что в лимфоцитах человека и клетках печени крысы имеются фосфатазы, расщепляющие пирофосфатную связь долихилпирофосфата [2-4] аналогично действию фосфатазы ундекапренилпирофосфата бактерий [5]. Имеются также данные о том, что долихилпирофосфат является донором фосфатных групп при биосинтезе конденсированных фосфатов у дрожжей [6]. В указанных работах в качестве субстрата используют долихилпирофосфат, меченный радиоактивным фосфором.

В литературе описан синтез долихил[α , β - ^{32}P]пирофосфата из долихола и бис(триэтиламмоний) [^{32}P]фосфата в присутствии трихлорацетонитрила в качестве конденсирующего агента [2]. Существенным недостатком указанной методики является крайне низкий выход меченого долихилпирофосфата в расчете на [^{32}P]фосфорную кислоту (0,1%). В настоящей работе мы предлагаем для получения меченых долихилпирофосфата и долихилпирофосфатманнозы использовать метод [7], разработанный для синтеза полипренилпирофосфатсахаров и основанный на взаимодействии полипренилфосфоимидазолида с незацищенным фосфатом сахара. Меченая долихилпирофосфатманноза может оказаться полезной при исследовании биосинтеза гликопротеинов у эукариот.

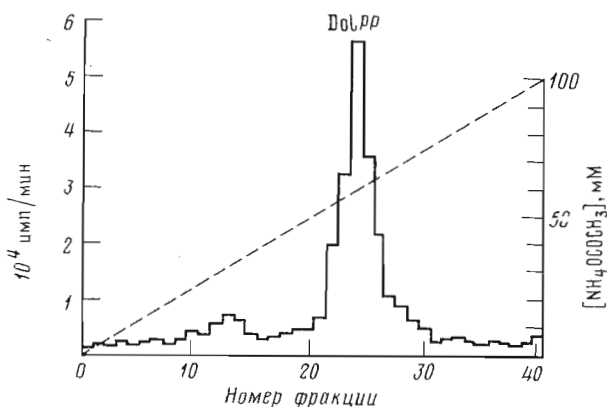
Долихилфосфат (I) превращали в фосфоимидазолид (II) действием сульфинилдидимидзола [8]. При обработке соединения (II) бис(три-*n*-октиламмоний) [^{33}P]фосфатом получали долихил[β - ^{33}P]пирофосфат (III), а при действии в аналогичных условиях бис(три-*n*-октиламмониевой) соли α -*D*-[^{14}C]маннопиранозилфосфата — долихилпирофосфат- α -*D*-[^{14}C]маннопиранозу (IV).





Реакцию проводили в смеси тетрагидрофурана и диметилсульфоксида и после удаления водорастворимых соединений экстракцией долихилпирофосфатные производные выделяли ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой DE-52 (OAc⁻) в линейном градиенте ацетата аммония в смеси хлороформ — метанол, 1 : 1. Разделение контролировали, определяя радиоактивность во фракциях (профиль элюции долихил[β-³³P]-пирофосфата приведен на рисунке). В этих условиях долихилпирофосфат элюируется при 50—60 мМ концентрации соли. Аналогично была выделена и долихилпирофосфатманноза. Индивидуальность полученных соединений была продемонстрирована их хроматографией в тонком слое. Строение соединений было подтверждено данными их кислотного гидролиза. Так, при нагревании в запаянной ампуле в смеси хлороформ — метанол — 7,7 н. HCl (10 : 10 : 3) при 100° С в течение 5 мин продуктами гидролиза долихил[β-³³P]пирофосфата были долихилфосфат и неорганический [³³P]фосфат, причем 100% исходной радиоактивности приходилось на последний. Это соответствует литературным данным [2].

При гидролизе долихилпирофосфат[¹⁴C]маннозы смесью хлороформ — метанол — 0,08 н. HCl, 10 : 10 : 3 (5 мин, 80° С) [9] полностью отщеплялась радиоактивная манноза в виде [¹⁴C]маннозы и метил[¹⁴C]маннозида и образовывался долихилпирофосфат. Полученная долихилпирофосфат-α-D-



Выделение долихил[β-³³P]пирофосфата ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе

[¹⁴C]маннопираноза идентична синтезированной методом [9] и выделенной из природного источника [6].

Предложенный метод позволяет с хорошим выходом получать меченые пирофосфатные производные долихола, которые могут быть использованы в качестве субстратов при изучении биосинтеза гликопротеинов у эукариот.

Экспериментальная часть

Долихилфосфат получали фосфорилированием долихола хлорокисью фосфора [10]. α -D-[¹⁴C]Маннопиранозилфосфат синтезировали методом [11]. Бис(три-*n*-октиламмоний) [³³P]фосфат получали прибавлением к водному раствору [³³P]H₃PO₄ (8 мкмоль, 3 мКи) три-*n*-октиламина (16 мкмоль, Sigma, США) и 1 мл тетрагидрофурана, перемешиванием и упариванием досуха на роторном испарителе с последующей отгонкой толуола для удаления следов воды. ТСХ осуществляли на пластинках Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системах хлороформ — метанол — вода — конц. NH₄OH, 65:35:4:4 (А) и хлороформ — метанол — вода, 60:25:4 (Б), обнаруживая радиоактивные вещества автордиографией. Гель-хроматографию проводили на колонке (3,5×100 см) с сефадексом LH-20 (Pharmacia, Швеция) в смеси хлороформ — метанол, 1:1. Ионообменную хроматографию проводили на колонке (1×10 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (OAc⁻) в линейном градиенте концентрации ацетата аммония (0→100 мМ, общий объем 300 мл) в той же системе растворителей.

Выделение долихола. Долихол получали кипячением печени свиньи в спиртовом растворе щелочи в атмосфере азота в присутствии пирогаллола в качестве антиоксиданта [12] с последующим охлаждением и экстракцией неомыляемых липидов гексаном. Экстракт охлаждали до 0°С и выпавшие стерины отфильтровывали. Долихол выделяли из фильтрата на колонке с сефадексом LH-20. Выход 5,2 г из 6 кг печени.

Долихил[β -³³P]пирофосфат (III). Активирующий реагент получали растворением имидазола (19 мг, 280 мкмоль) в 200 мкл абс. тетрагидрофурана и прибавлением 100 мкл абс. тетрагидрофурана, содержащего хлористый тионил (5 мкл, 68 мкмоль). Через 20 мин при 20°С отбирали 100 мкл надосадочной жидкости, содержащей 23 мкмоль сульфинилдимидазола, и прибавляли к 4 мкмоль долихилфосфата (I), высушенного отгонкой толуола и лиофилизацией из бензола. Смесь выдерживали 2 ч при 20°С, прибавляли 10 мкл метанола для разложения избытка сульфинилдимидазола, упаривали досуха на роторном испарителе и сушили 30 мин в вакууме масляного насоса. Остаток растворяли в 200 мкл смеси тетрагидрофуран — диметилсульфоксид (1:1) и прибавляли к сухому бис(три-*n*-октиламмоний) [³³P]фосфату (8 мкмоль, 10 мКи). Смесь выдерживали 16 ч при 37°С, добавляли 6 мл смеси хлороформ — метанол — вода, 3:2:1, перемешивали и после расслоения фаз верхнюю удаляли, а к нижней добавляли 4 мл метанола и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. После элюции фракции, содержащие меченый долихилпирофосфат, объединяли. Ацетат аммония удаляли экстракцией по Фолчу [13]. Выход соединения (III) 0,72 мкмоль (520·10⁶ имп/мин, 18% в расчете на долихилфосфат, 9% — на [³³P]H₃PO₄), R_f 0,31 (А), отношение общего [10] и кислотолабильного [7] фосфата 2:0,94 (теор. 2:1).

Долихилпирофосфат- α -D-[¹⁴C]маннопиранозу (IV) получали аналогичным образом реакцией долихилфосфоимидазолида (II) (из 4 мкмоль долихилфосфата) и бис(три-*n*-октиламмониевой) соли α -D-[¹⁴C]маннопиранозилфосфата (8 мкмоль, 10 мКи). Выход соединения (IV) 0,88 мкмоль (1,2·10⁶ имп/мин, 22% в расчете на долихилфосфат, 11% — на α -D-[¹⁴C]маннопиранозилфосфат), R_f 0,18 (Б).

ЛИТЕРАТУРА

1. Struck D. K., Lennarz W. J. In: The Biochemistry of glycoproteins and proteoglycans/Ed. Lennarz W. J. N. Y.—L.: Plenum Press, 1980, p. 35–83.
2. Wedgwood J. F., Strominger J. L. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 3, p. 1120–1123.

3. Belocopitow E., Boscoboinik D. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 1, p. 167-173.
4. Appelkvist E. L., Chojnacki T., Dallner G. Bioscience Reports, 1981, v. 1, № 8, p. 619-625.
5. Willoughby E., Highasi Y., Strominger J. L. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 16, p. 5113-5115.
6. Шабалин Ю. А., Вагабов В. М., Кулаев Н. С. Докл. АН СССР, 1979, т. 249, № 1, с. 243-245.
7. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 88, № 2, p. 203-211.
8. Staab H. A., Wendel K. Justus Liebigs Ann. Chem., 1966, v. 694, № 1, p. 86-90.
9. Warren C. D., Jeanloz R. W. Biochemistry, 1975, v. 14, № 2, p. 412-419.
10. Danilov L. L., Chojnacki T. FEBS Letters, 1981, v. 131, № 2, p. 310-312.
11. MacDonald D. L. Methods in Enzymol., 1966, v. 8, p. 121-125.
12. Burgos J., Hemming F. W., Pennock J. F., Morton F. A. Biochem. J., 1963, v. 88, № 3, p. 470-482.
13. Folch J., Less M., Sloane Stanley G. H. J. Biol. Chem., 1957, v. 226, № 1, p. 497-509.

Поступила в редакцию
11.XII.1984

SYNTHESIS OF DOLICHYL[β - ^{33}P]PYROPHOSPHATE AND DOLICHYL PYROPHOSPHATE[^{14}C]MANNOSE

SHABALIN Yu. A., NAUMOV A. V., VAGABOV V. M., KULAEV I. S.,
DANILOV L. L.*, SHIBAEV V. N.*

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Academy
of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region;*

** N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Dolichyl[β - ^{33}P]pyrophosphate and dolichyl pyrophosphate α -D-[^{14}C]mannopyranose were obtained by the reaction of dolichyl phosphoimidazolide with bis(tri-*n*-octylammonium) salts of [^{33}P]orthophosphoric acid and α -D-[^{14}C]mannopyranosyl phosphate, respectively.