



УДК 547.995.1.02 + 593.93-143.62.088

РАЗВЕТВЛЕННЫЙ ДИСИАЛОГАНГЛИОЗИД,
СОДЕРЖАЩИЙ N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИН,
ИЗ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS*

Смирнова Г. П., Глузевед И. С., Кочетков Н. Б.

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

Из липидного экстракта ткани печени морской звезды *Asterias rubens* выделен и охарактеризован главный ганглиозид. На основании данных полного и частично го кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования и тридегтерометилирования, ферментативного расщепления и окисления хромовым ангидридом для него предложена структура 8-О-метил-N-гликолилнейраминозил-(2 → 6)-[8-О-метил-N-гликолилнейраминозил-(2 → 3)]-N-ацетилгалактозаминил-(β1 → 3)-галактозил-(β1 → 4)-глюкозил-(β1 → 1)-церамида. Сфингозиновым основанием ганглиозида является смесь сфингозина и фитосфингозина в соотношении 4 : 1. Высшие жирные кислоты представлены незамещенными и α-гидроксикислотами в соотношении 9 : 1. Состав кислот установлен с помощью ГЖХ.

Ранее мы показали, что олигосахаридные цепи ганглиозидов морских звезд разнообразны по структуре и в отличие от ганглиозидов морских ежей не имеют общего типа структуры, характерного для этого класса иглокожих [1, 2]. Ганглиозиды даже близких в таксономическом отношении видов морских звезд (один отряд, одно семейство) могут различаться как моносахаридным составом, так и характером сиаловых кислот и положением их в цепи, хотя в некоторых случаях более близкие виды морских звезд обнаруживают большее сходство структур углеводов цепей ганглиозидов. Так, дисиалоганглиозиды *Evasterias retifera* и *Asterias amurensis* содержат кроме глюкозы, галактозы и сиаловых кислот N-ацетилгалактозамин, который в ганглиозидах других видов морских звезд пока не обнаружен, и имеют одинаковую структуру асиалопродукта, однако различаются типом сиаловых кислот и местом их присоединения. В состав ганглиозида *E. retifera* входят два остатка N-ацетилнейраминовой кислоты, соединенные между собой 2→9-связью, дисиалилный фрагмент присоединен к О3 аминсахара [3, 4], а ганглиозид *A. amurensis* содержит два остатка 8-О-метил-N-гликолилнейраминовой кислоты, которые присоединены к одному и тому же остатку N-ацетилгалактозаминна в положении 3 и 6 [4, 5]. Для того чтобы выяснить, насколько близки структуры ганглиозидов морских звезд более мелких таксономических групп, например внутри одного рода, мы исследовали структуру ганглиозида морской звезды *A. rubens*, относящуюся к тому же роду, что и *A. amurensis*.

Сырой препарат полярных гликолипидов получен после диализа общего липидного экстракта печени *A. rubens*, как описано ранее [6]. Этот препарат, по данным ТСХ, содержал два ганглиозида: главный и минорный, а также фосфолипиды, нейтральные гликолипиды и пигменты. Дальнейшее выделение ганглиозидов проводили ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой, элюируя кислые гликолипиды раствором ацетата аммония в метаноле [7]. Оба ганглиозида элюировались 0,025 М раствором соли, и дальнейшее их разделение проводили при помощи препаративной ТСХ на силикагеле. Выделенные ганглиозиды вели себя как индивидуальные соединения при ТСХ в нейтральной и основной системах растворителей. Поскольку минорный ганглиозид был выделен в очень малом количестве (~2 мг), далее с ним не работали и структурные

исследования проводили с главным ганглиозидом, полученным в количестве 28 мг.

Структура олигосахаридной цепи ганглиозида была изучена методами полного и частичного кислотного гидролиза, метанолиза, метилирования и тридейтерометилирования, ферментативного расщепления и окисления хромовым ангидридом. По результатам полного кислотного гидролиза, ганглиозид содержит глюкозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин в соотношении 1 : 1 : 1. При частичном кислотном гидролизе ганглиозида отщепляется сиаловая кислота в количестве 2 моль на 1 моль ганглиозида и образуется асиалогликолипид, подвижность которого при ТСХ совпадает с подвижностью тригексозилцерамида, выделенного нами ранее из ганглиозида морской звезды *A. amurensis* [5]. Сиаловая кислота, выделенная из гидролизата ионообменной хроматографией на дауэксе 2×8 , при ТСХ на силикагеле обладала подвижностью монометильного производного N-гликолилнейраминной кислоты, полученной нами ранее при мягком кислотном гидролизе ганглиозида из морской звезды *A. amurensis*.

Для определения последовательности нейтральных моносахаридов использовали частичный метанолиз. При нагревании ганглиозида в 0,3 н. HCl в смеси хлороформ — метанол (2 : 1) образуются моно-, ди- и тригексозилцерамиды, которые были разделены препаративной ТСХ на силикагеле. С помощью полного кислотного гидролиза было показано, что моногексозилцерамид содержит глюкозу, а дигексозилцерамид — глюкозу и галактозу в соотношении 1 : 1. Следовательно, непосредственно к сфингозиповому основанию присоединен остаток глюкозы и асиалогликолипид имеет структуру N-ацетилгалактозаминил-галактопиранозил-глюкопиранозил-церамида.

Места замещения моносахаридов, а также структуру и положение остатков сиаловой кислоты определяли с помощью метилирования и тридейтерометилирования. В масс-спектре тридейтерометилированного ганглиозида имеется интенсивный пик иона с m/z 424, соответствующий концевому остатку монометильного производного N-гликолилнейраминной кислоты. После метанолиза тридейтерометилированного ганглиозида и анализа полученных производных сиаловых кислот с помощью хроматомасс-спектрометрии показано, что присутствует только одно производное сиаловой кислоты, масс-спектр которого совпал с масс-спектром полностью тридейтерометилированной 8-O-метил-N-гликолилнейраминной кислоты [5]. Следовательно, в состав ганглиозида *A. rubens* входит 8-O-метил-N-гликолилнейраминная кислота, оба остатка которой являются концевыми, т. е. олигосахаридная цепь ганглиозида разветвлена.

Частично метилированные метилгликозиды, полученные при метанолизе метилированного ганглиозида, анализировали методом ГЖХ, а после дополнительного ацетилирования — методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Анализ с помощью ГЖХ показал, что в ганглиозиде глюкоза замещена в положение 4, а галактоза — в положение 3. Масс-спектр ацетата частично метилированного метилгликозида N-ацетилгалактозамина полностью совпал с масс-спектром метил-3,6-ди-O-ацетил-2-деокси-4-O-метил-2-(N-метилацетамидо)галактопиранозида [8]. В масс-спектре имеются пики ионов, указывающие на наличие двух ацетильных остатков в молекуле: m/z 274 ($M - OCH_3 - CH_2CO$), m/z 256 ($M - OCH_3 - CH_3COOH$) и m/z 242 ($M - OCH_3 - CH_3OH - CH_2CO$). Пики ионов с m/z 157 (фрагмент C2—C3) и m/z 115 ($157 - CH_2CO$) показывают, что один ацетильный остаток находится в положении 3. Наличие пика иона с m/z 169 (фрагмент C2—C4)— CH_3OH) свидетельствует, что в положении 4 находится метильный остаток. Значит, второй ацетильный остаток должен находиться в положении 6. Следовательно, олигосахаридная цепь ганглиозида имеет разветвление по остатку N-ацетилгалактозамина, и остатки сиаловых кислот присоединены к нему в положениях 3 и 6.

Для определения конфигурации гликозидных связей нейтральных сахаров использовали окисление с помощью CrO_3 [9] и ферментативный гидролиз [10]. При окислении ацетилированного асиалоганглиозида CrO_3

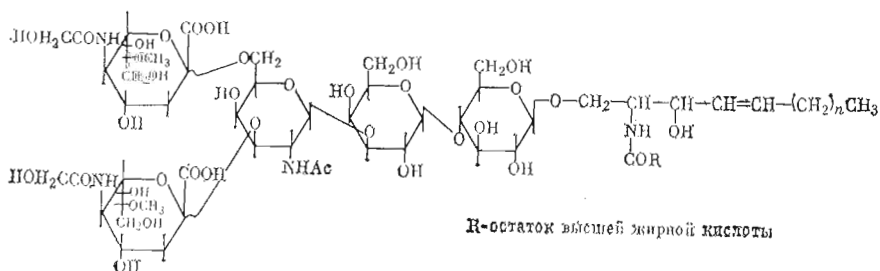
Asterius rubens

Кислоты	Незамещенные кислоты, % от суммы незамещенных кислот	α -Гидроксикислоты, % от суммы α -гидроксикислот	Кислоты	Незамещенные кислоты, % от суммы незамещенных кислот	α -Гидроксикислоты, % от суммы α -гидроксикислот
C _{14:0}	2,1	18,1	C _{18:0}	25,6	16,4
C _{15:0}	3,8	—	C _{20:0}	4,0	16,3
C _{16:0}	52,6	31,0	C _{22:0}	5,9	18,2
C _{17:0}	3,3	—	C _{24:0}	2,7	—

глюкоза и галактоза разрушились практически полностью, что свидетельствует о β -конфигурации их гликозидных связей. При обработке асиалоганглиозида β -N-ацетилглюкозаминидазой N-ацетилгалактозамин полностью отщепляется, т. е. его гликозидная связь также имеет β -конфигурацию. К сожалению, нам не удалось определить конфигурацию кетозидных связей сиаловых кислот. Ганглиозид устойчив к действию нейраминидаз из *Vibrio cholerae* [11] и *Arthrobacter ureafaciens* [12], которые расщепляют α -кетозидные связи, однако отсюда не следует β -конфигурация связи, так как наблюдаемая устойчивость, по-видимому, может быть обусловлена как наличием метильных групп в остатках сиаловых кислот, которые замедляют скорость ферментативного гидролиза [13], так и главным образом пространственным расположением сиаловых кислот в цепи. Известно, что остатки сиаловых кислот, связанные с моносахаридом, лежащим в узле разветвления, как, например, в ганглиозидах G_{M1}, G_{M2} и G_{D1a} [14] и в гликопротеинах [15], устойчивы к действию бактериальных нейраминидаз.

Для анализа липидной части ганглиозида использовали кислотный метанолиз. В продуктах метанолиза с помощью ТСХ обнаружены сфингозиновые основания и метиловые эфиры высших жирных кислот. Сфингозиновое основание ганглиозида представляет собой смесь фитосфингозина и сфингозина в соотношении 1 : 4. За недостатком материала дальнейший анализ сфингозиновых оснований не проводили. Метиловые эфиры высших жирных кислот являются смесью незамещенных и α -гидроксикислот в соотношении 9 : 1. Оба класса кислот выделяли препаративной ТСХ и анализировали методом ГЖХ. Метиловые эфиры α -гидроксикислот предварительно ацетилировали. Главным компонентом смеси незамещенных кислот является пальмитиновая кислота, а α -гидроксикислот — α -гидроксипальмитиновая кислота (таблица).

На основании полученных данных для ганглиозида морской звезды *A. rubens* предложена структура 8-О-метил-N-гликолилнейраминозил-(2→6)-[8-О-метил-N-гликолилнейраминозил-(2→3)]-N-ацетилгалактозаминил-(β 1→3)-галактозил-(β 1→4)-глюкозил-(β 1→1)-церамида



Таким образом, ганглиозид морской звезды *A. rubens* имеет такую же структуру олигосахаридной цепи, что и ганглиозид другого вида морской звезды того же рода, *A. amurensis* [5]. Это первый случай обнаружения одинаковых углеводных цепей в ганглиозидах морских звезд, что может

быть связано с таксономической близостью этих видов. Однако липидные части этих ганглиозидов различаются по составу. Ганглиозид *A. amurensis* имеет более гидроксильированный керамид, чем ганглиозид *A. rubens*. Сфингозиновым основанием ганглиозидов *A. amurensis* является фитосфингозин, а среди высших жирных кислот — 50% составляющих α -гидроксикислоты, в то время как в ганглиозиде *A. rubens* главным сфингозиновым основанием является сфингозин (~80%), а среди высших жирных кислот преобладают незамещенные кислоты (~90%).

Сходство структур углеводных цепей ганглиозидов близкородственных видов морских звезд *A. rubens* и *A. amurensis* и различие в характере их липидных частей представляется нам интересным фактом, который, возможно, связан с тем, что эти структурные элементы ганглиозидов выполняют разные функции в клетке. Углеводные цепи, находясь на внешней поверхности мембраны, являются специфическими «местами узнавания» клеток и участвуют в процессах восприятия и переработки информации клеточными мембранами. Сходство структур углеводных цепей может свидетельствовать в пользу того, что эти процессы в печени морских звезд рода *Asterias* обеспечиваются одинаковыми по структуре биоактивными соединениями, для которых ганглиозиды являются рецепторами. Липидные же части ганглиозидов, располагаясь внутри мембраны, взаимодействуют с другими липидными и белковыми компонентами мембраны и участвуют в создании таких физико-химических свойств мембраны, как «текучесть» и прочность. Поэтому структура липидной части ганглиозидов должна в значительной степени зависеть от структур других компонентов мембраны и от конкретных условий, в которых функционирует мембрана, что в свою очередь связано с условиями обитания животного. Возможно, различия в составе высших жирных кислот и сфингозиновых оснований ганглиозидов морских звезд определяются тем, что они собраны в различных районах Мирового океана (*A. rubens* — в Белом море, а *A. amurensis* — в Японском). Для того чтобы выяснить, является ли совпадение структур углеводных цепей ганглиозидов морских звезд одного рода общим правилом и существует ли связь между структурой ганглиозидов и таксономическим положением вида морской звезды, необходимы дальнейшие исследования.

Экспериментальная часть

Морские звезды *A. rubens* собраны в Белом море и в замороженном состоянии доставлены в Москву. Липидный экстракт печени и сырой препарат сиалогликолипидов получали по методике [6]. Были использованы *N*-ацетилглицероаминовая кислота (Koch-Light, Англия), *N*-глицероаминовая кислота (Sigma, ФРГ), нейраминидаза из *V. cholerae* (500 ед. акт./мл, Calbiochem) и из *A. ureafaciens* (1 ед. акт., Calbiochem), β -*N*-ацетилглюкозаминидаза из почки быка (4 ед. акт./мг, Serva).

Хлороформ перед использованием перегоняли. Аналитическую и препаративную ТСХ проводили на силикагеле 60 Н (Merck, ФРГ). Использовали системы растворителей: для ганглиозидов — хлороформ — метанол — вода (6 : 4 : 1) и хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (60 : 35 : 8), обнаружение орциновым [16] и резорциновым [17] реактивами; для нейтральных гликолипидов — хлороформ — метанол — вода (64 : 24 : 4), обнаружение орциновым реактивом; для сиаловых кислот — пропанол — вода — 2 н. NH_4OH (30 : 10 : 5) на пластинках, импрегнированных 0,2 М NaH_2PO_4 [18], обнаружение резорциновым реактивом; для сфингозиновых оснований — хлороформ — метанол — 2 н. NH_4OH (40 : 10 : 1), обнаружение 2% раствором нингдринна в ацетоне; для метиловых эфиров высших жирных кислот — дихлорэтан, обнаружение раствором бромтимолблау и конц. H_2SO_4 .

Колоночную хроматографию сиалогликолипидов на DEAE-целлюлозе (CH_3COO -) выполняли как описано ранее [7]. Главный ганглиозид элюировали 0,025 М раствором ацетата аммония в метаноле и очищали препаративной ТСХ. Из 130 мг сырого препарата было получено 28 мг главного ганглиозидов. Сиаловые кислоты количественно определяли с резорциновым реактивом [19, 20], гексозы — в виде ацетатов гекситов с помощью ГЖХ, в качестве внутреннего стандарта использовали инозит.

ГЖХ проводили на приборе Pye Unicam (Англия), скорость азота 60 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов гекситов на колонке с 3% ECNSS-M на газхроме Q при 180° С, частично метилированные метилгликолипиды — на колонке с 3% NGA на диатомите С при 160° С, метилированные и тридекаметиллированные производные метиловых эфиров метилкетозидов сиаловых кислот — на колонке с 3% OV-1 на диатомите С при 235° С и 3% OV-17 на том же носителе, метиловых эфиров высших жирных кислот незамещенных и метоксикислот — на колонке 3% OV-1 на диатомите С при 160—220 и 180—280° С (3%/мин) соответственно. Масс-спектр

тридегтерометилированного ганглиозида снимали на приборе М-80А Hitachi при ионизирующем напряжении 70 эВ. Хроматомасс-спектрометрический анализ тридегтерометилированных метилгектозидов сиаловых кислот проводили на том же приборе, снабженном колонкой с 2% OV-1 на газхроме Q. Хроматомасс-спектрометрический анализ ацетатов частично метилированных метилгликозидов проводили на приборе Varian MAT III (ФРГ), снабженном колонкой с 3% OV-1 на диатомите С, при ионизирующем напряжении 70 эВ.

Полиый кислотный гидролиз ганглиозида проводили в течение 4 ч 2 М HCl при 100° С. Реакционную смесь нейтрализовали смесью IRA-410 (HCO₃⁻), обрабатывали 4 ч KBrO₄, нейтрализовали 2 М CH₃COOH, пропускали через колонку со смесью IR-120 (H⁺) и элюировали водой. Элюат упаривали с добавлением метанола, остаток обрабатывали 16 ч смесью пиридин — уксусный ангидрид (1 : 1) при 20° С и полученные ацетаты полиолов анализировали методом ГЖХ. Для анализа аминоксахара ганглиозид гидролизовали 24 ч 4М HCl при 100° С, гидролизат упаривали и анализировали на аминокислотном анализаторе Т-339 (ЧССР).

Частичный кислотный гидролиз ганглиозида проводили в течение 2 ч в 0,05 М H₂SO₄ при 80° С. Реакционную смесь диализовали 1 сут против воды при 20° С. Недиализуемый продукт лиофилизовали и анализировали ТСХ, нейтральные гликолипиды выделяли препаративной ТСХ. Внешний водный слой упаривали до 5 мл, пропускали через колонку с дауэком 2 × 8 (CH₃COO⁻), сиаловые кислоты элюировали 0,1 М ацетатным буфером (рН, 4,6) [20], элюат депонизировали смесью IR-120 (H⁺). Сиаловые кислоты определяли количественно [19].

Частичный метанолиз ганглиозида проводили в течение 1 ч 0,3 М HCl в смеси хлороформ — метанол (2 : 1) при 60° [21]. Реакционную смесь упаривали и анализировали ТСХ. Образовавшиеся цереброзиды и дигексозацерамиды выделяли препаративной ТСХ, подвергали полиому кислотному гидролизу и полученные моносахариды анализировали методом ГЖХ.

Полиый кислотный метанолиз ганглиозида проводили 18 ч 3 М HCl в CH₃OH при 80° С. Метилвые эфиры высших жирных кислот и сфингозинвые основания выделяли как описано ранее [6] и анализировали ТСХ. Метилвые эфиры незамещенных и α-гидроксикислот разделяли препаративной ТСХ и анализировали методом ГЖХ. Метилвые эфиры α-гидроксикислот предварительно ацетилировали.

Метилирование и тридегтерометилирование ганглиозида проводили по Хакормори [22]. Полученные производные эстерагировали хлороформом, диализовали против воды и очищали препаративной ТСХ. Метилированные и тридегтерометилированный ганглиозид подвергали метанолизу в течение 16 ч 0,5 М HCl в CH₃OH при 80° С. Частично метилированные метилгликозиды и метилгалактозиды анализировали методом ГЖХ. Продукты метанолиза ацетилировали 30 мин смесью пиридин — уксусный ангидрид (1 : 1) при 100° С. Полученные производные сиаловой кислоты и N-ацетилгалактозамина анализировали методом хроматомасс-спектрометрии.

Окисление гравовым ангидридом. Нейтральные гликолипиды, полученные при частичном кислотном гидролизе ганглиозида, ацетилировали и обрабатывали 30 мин CrO₃ в смеси уксусная кислота — уксусный ангидрид (9 : 1) при 40° С [9]. Моносахариды анализировали методом ГЖХ.

Ферментативный гидролиз ганглиозида проводили нейтраминдазой из *V. cholerae* [11] и *A. ureafaciens* [12] в ацетатном буфере, рН 5,5. Ферментативный гидролиз нейтрального гликолипида, полученного при частичном кислотном гидролизе ганглиозида, проводили β-N-ацетилглюкозаминидазой из почки быка в цитратном буфере, рН 4,5 [10]. Реакционную смесь анализировали ТСХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнова Г. П. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Паука, 1985. С. 126—148.
2. Смирнова Г. П. // Биология моря. 1987. № 1. С. 3—11.
3. Смирнова Г. П., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 1. С. 102—108.
4. Kochetkov N. K., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 712. № 3. P. 650—658.
5. Смирнова Г. П., Глухoded И. С., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 7. С. 971—979.
6. Kochetkov N. K., Zhukova I. G., Smirnova G. P., Glukhoded I. S. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 326. № 1. P. 74—83.
7. Winterbourn C. C. // J. Neurochem. 1971. V. 18. № 6. P. 1153—1155.
8. Елькин Ю. П., Толшчич С. В., Зурабян С. Э. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1859—1865.
9. Laine R. A., Renkonen O. I. // J. Lipid Res. 1975. V. 16. № 2. P. 102—106.
10. Levy G. A., Conchie J. // Meth. Enzymol. 1966. V. 8. P. 571—584.
11. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H. // Biochim. et biophys. acta. 1970. V. 210. № 2. P. 299—305.
12. Saito M., Nagai Y. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 16. P. 7845—7854.
13. Смирнова Г. П., Кочетков Н. К., Садовская В. Л. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1396—1404.
14. Drzeniek R. // Histochem. J. 1973. V. 5. № 3. P. 271—290.
15. Inoue S., Iwasaki M., Matsumura G. // Glycoconjugates/Eds Yamakawa T., Osawa T., Handa S. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press, 1981. P. 271—272.

16. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P. // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1970. V. 34. № 1. P. 163—177.
17. Svennerholm L. // *Biochim. et biophys. acta.* 1957. V. 24. P. 604—611.
18. Hotta K., Hamazaki H., Kurokawa M. J. // *J. Biol. Chem.* 1970. V. 245. № 20. P. 5434—5440.
19. Svennerholm L. // *Acta chem. scand.* 1958. V. 12. № 3. P. 547—554.
20. Miittinen T., Takki-Luukkainen I. T. // *Acta chem. scand.* 1959. V. 13. № 4. P. 856—858.
21. Slomiany B. L., Slomiany A. // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 90. № 1. P. 39—49.
22. Hakomori S.-I. // *J. Biochem. (Tokyo).* 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.

Поступила в редакцию
29.X.1987

**A BRANCHED DISIALOGLANGLIOSIDE
CONTAINING N-ACETYL GALACTOSAMINE
FROM THE STARFISH *ASTERIAS RUBENS*
SMIRNOVA G. P., GLUKHOED I. S., KOCHETKOV N. K.**

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

The structure of a major ganglioside from hepatopancreas of the starfish *Asterias rubens* has been established. On the basis of total and partial acid hydrolyses, methanolysis, methylation and trideuteriomethylation, enzymatic degradation and chromium trioxide oxidation this ganglioside was identified as 8-O-methyl-N-glycolylneuraminosyl-(2 → 6)-[8-O-methyl-N-glycolylneuraminosyl-(2 → 3)]-N-acetylgalactosaminyl-(β1 → 3)-galactosyl-(β1 → 4)-glucosyl-(β1 → 1)-ceramide. The long-chain base of the ganglioside was found to be a mixture of phytosphingosine and sphingosine in the 1 : 4 ratio. The fatty acids were shown to be a mixture of unsubstituted and α-hydroxy acids, the composition being determined by GLC.