



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Tom 17 * № 5 * 1991

УДК 593.161.13.088 : 577.414.5

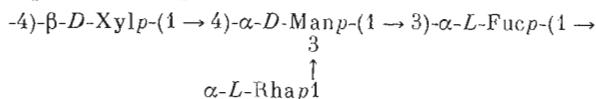
© 1991 г.

*Н. П. Арбатский, Д. В. Юртов, А. С. Шашков,
Н. Н. Сухарева*, Т. С. Титова*, В. А. Деревицкая,
Н. К. Бочетков*

СТРУКТУРА ГЛИКАНА ПРОСТЕЙШЕГО *CRITHIDIA ONCOPELTI*

* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Из простейшего *Crithidia oncopelti*, относящегося к семейству Trypanosomatidae, выделен главный углеводный полимер — регулярно построенный гликан, состоящий из тетрасахаридных повторяющихся звеньев. Химическими и спектральными методами установлено строение повторяющегося звена гликана:



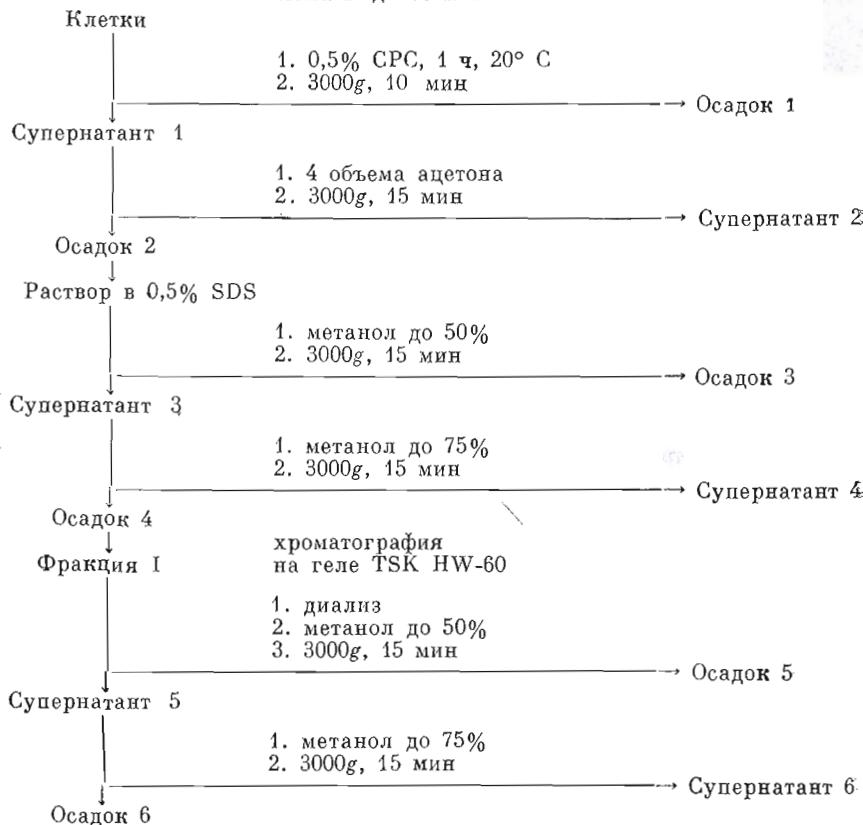
Кроме углеводов в полученном образце гликана обнаружены жирные кислоты, ино-
зит, этаноламин и фосфат, которые являются, по-видимому, компонентами гидрофоб-
ного «якоря» гликана (фосфатидилинозита), часто встречающегося в гликопротеинах
и гликофосфолипидах простейших.

В последние годы все большее внимание уделяется изучению структуры и функции гликоконъюгатов простейших, вызывающих такие заболевания, как трипаносомоз, лейшманиоз, малярия и др. [1—4]. Кроме важного значения для диагностики и иммунопрофилактики эти исследования интересны также с химической точки зрения, поскольку расширяют представления о разнообразии типов углеводсодержащих биополимеров. Так, установление строения вариантного поверхностного гликопroteина из *Trypanosoma brucei* [4—6] явилось одним из первых примеров открытия нового типа «якоря» (гликозилфосфатидилинозита), удерживающего гликопroteин в клеточной мембране. Другой тип гликоконъюгата — гликофосфолипид, содержащий углеводный компонент в виде олиго- или полисахарида и «якорную» часть, представленную фосфатидилинозитом, выделен недавно из простейших *Leishmania major* [7] и *L. donovani* [8].

Одним из представителей семейства Тгурапосоматидей является *Cri-thidia oncopelti*. Важнейшие физиолого-биологические особенности этого вида простейших описаны ранее [3]. Данная работа посвящена выделению главного углеводсодержащего полимера *C. oncopelti* и установлению строения его полисахаридной цепи.

Выделение гликана мы проводили методами осаждения и эксклюзионной хроматографии (схема), анализируя получаемые фракции на содержание аминокислот и углеводов (табл. 1). Клетки отмывали 3 раза водой, осаждая их центрифугированием, при этом каждый раз в супернатанте обнаруживали не более 2—3% белка и углеводов от содержащихся в исходном материале. Для солюбилизации клеточных гликоconjюгатов использовали катионный детергент, цетилпиридинийхлорид (CPC). Как видно из табл. 1, при обработке биомассы 1% CPC солюбилизируется около 30% белков и углеводов, которые почти полностью осаждаются ацетоном. Полученный продукт (осадок 2) растворяли в 0,5% растворе SDS и фракционировали осаждением метанолом. Большая часть белка и небольшое количество углеводов осаждается в 50% метаноле, тогда как углеводсо-

Схема выделения гликана



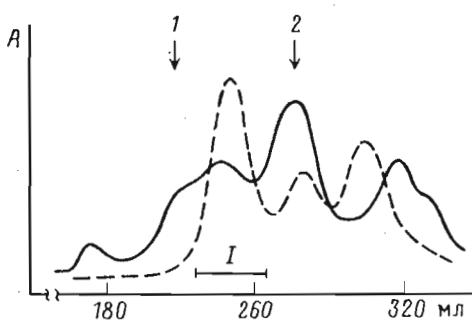
держащие компоненты осаждаются в основном в 75 % метаноле. Мольное соотношение аминокислот и углеводов во фракциях, осаждающихся в 50 и 75 % метаноле, и фракции, растворимой в 75 % метаноле, составляет $\sim 52 : 1$, $1 : 1$ и $26 : 1$ соответственно.

Обогащенную углеводами фракцию (осадок 4), содержащую соответственно около 1 и 14 % исходного количества белка и углеводов, далее хроматографировали на колонке с TSK HW-60 в 0,3% растворе SDS с детекцией по поглощению при 280 нм и по цветной реакции на углеводы (рис. 1). Как оказалось, эта фракция представляет собой гетерогенную смесь белков и углеводсодержащих полимеров, причем основное количество углеводов содержалось во фракции I, соответствующей по размеру бел-

Таблица 1
Содержание аминокислот и углеводов во фракциях

Фракция	Аминокислоты		Углеводы	
	мкмоль	%	мкмоль	%
Клетки	21 700	100	1230	100
Супернатант 1	6 100	28	420	34
Осадок 1	14 100	65	750	61
Супернатант 2	440	2	15	1
Осадок 2	5 200	24	360	29
Супернатант 3	1 240	6	270	22
Осадок 3	3 650	17	70	6
Супернатант 4	1 030	5	40	3
Осадок 4	180	1	168	14
Фракция I, рис. 1 (после диализа)	26	0,1	76	6
Осадок 5	12	0,05	9	0,7
Супернатант 6	5	0,02	4	0,3
Осадок 6	2	0,01	22	2

Рис. 1. Очистка гликана на колонке ($2,6 \times 86$ см) с гелем TSK HW-60. Элюент — 0,01 н. $\text{NaCl} + 0,3\%$ SDS. Детекция при 280 нм (сплошная кривая) и по реакции с орцином и серной кислотой (штриховая кривая). 1 и 2 — место элюции белков с $M \sim 40$ и 5 кДа (электрофорез в геле). Показаны границы выделения фракции I — гликана



ку с $M \sim 15$ кДа (электрофорез в геле). Для дальнейшей очистки фракции I проводилось (после диализа) повторное осаждение белка и полисахаридов метанолом (схема). Полученный в результате этого продукт (осадок б) практически не содержал белка; мольное соотношение углеводов и аминокислот составляло $>10 : 1$, причем среди аминокислот не было преобладающей. Моносахаридный анализ показал, что в состав полимера входят рамноза, манноза, фукоза и ксилоза в соотношении, близком к эквимолярному ($1,2 : 1,0 : 0,8 : 0,9$). Эти моносахариды вместе с небольшим количеством глюкозы, глюказамина и рибозы составляют не менее 70% от веса фракции. Кроме того, в полученном образце содержатся аминокислоты (~5%), жирные кислоты (1–2%) и фосфат (0,7%); идентифицированы также этаноламин и инозит. Таким образом, судя по составу неуглеводных компонентов, выделенный гликан является, вероятно, гликофосфолипидом, состоящим из полисахаридной цепи и гидрофобного «якорного» участка типа фосфатидилинозита.

Спектр ^{13}C -ЯМР гликана оказался типичным для регулярно построенного полисахарида, за исключением того, что имеется группа сигналов небольшой интенсивности с $\delta \sim 24, 31$ – 32 и $41,5$ м. д., а также сигналы с $\delta 69,053$ и $70,888$ м. д. (рис. 2), которые, очевидно, связаны с наличием неуглеводного компонента. В области резонанса аномерных атомов углерода имеется четыре сигнала ($\delta 97,66; 97,92; 103,14; 104,30$ м. д.), а в области резонанса С₆-атомов 6-дезоксисахаров — два сигнала ($16,38$ и $17,71$ м. д.). АРТ * [9] показал две — OCH_2 -группы с химическими сдвигами $63,7$ и $61,4$ м. д. Общее число сигналов (с учетом кратной интенсивности одного из них) составляет 23. Следовательно, полисахаридная цепь полимера состоит из повторяющихся звеньев, включающих в себя четыре моносахаридных остатка, два из которых являются 6-дезоксисахарами (рамноза и фукоза), один — гексозой (манноза) с незамещенной CH_2OH -группой ($61,4$ м. д.) и один — пентозой (ксилоза). Отсутствие сигналов в области 80 – 85 м. д. показывает, что все сахара находятся в пиранозной форме [10].

В ^1H -ЯМР-спектре гликана в сильном поле имеются два трехпротонных дублета с КССВ $\sim 6,5$ Гц и химическими сдвигами $1,21$ м. д. (H_6 рамнопиранозы) и $1,13$ м. д. (H_6 фукопиранозы), а в области резонанса аномерных протонов видны три сигнала: уширенные синглеты при $5,05$ и $4,89$ м. д. и дублет с $J_{1,2} \sim 3,5$ Гц и $\delta 4,94$ м. д. Первые два сигнала, очевидно, принадлежат сахарам с маннопиранозной конфигурацией (малая КССВ $J_{1,2} < 2$ Гц), имеющим, судя по величине химических сдвигов, α -конфигурацию гликозидного центра. Последний сигнал с $J_{1,2} 3,5$ Гц принадлежит пиранозе с α -глюко- или α -галакто-конфигурацией. С помощью гомоядерного двойного резонанса (разностный вариант) были найдены положения сигналов H5 6-дезоксисахаров: $4,1$ м. д. для H5 рамнопиранозы и $3,87$ м. д. для H5 фукопиранозы; они оказались типичными для моносахаридных остатков с α -конфигурацией гликозидных центров [11, 12]. Таким образом, фукопираноза имеет α -конфигурацию и сигнал при $4,94$ м. д. принадлежит H1 именно этого остатка. Сигнал четвертого ано-

* АРТ — тест на присоединенные протоны.

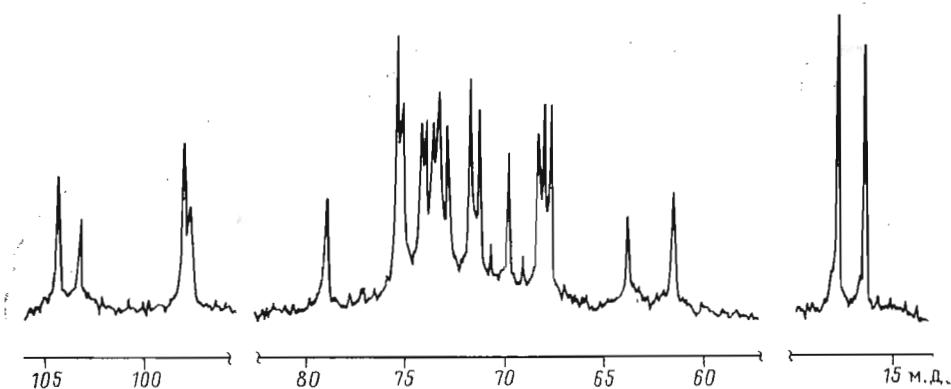


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр гликана

мерного протона (H_1 ксилозы), по-видимому, скрыт под пиком HDO (4,5 м. д.). Поскольку область 4,90—4,50 м. д. свободна от сигналов, H_1 ксилопиранозы имеет $\delta < 4,5$ м. д., что характерно для β -конфигурации аномерного центра.

Таким образом, данные ЯМР-спектроскопии подтвердили моносахаридный состав гликана, показали регулярность его полисахаридной цепи и позволили установить размеры циклов (все пиранозы) и относительную конфигурацию моносахаридных остатков: α -конфигурацию для маннозы, рамнозы и фукозы и β -конфигурацию для ксилозы.

Строение гликана изучали далее с помощью метилирования, частичного гидролиза и деградации по Смиту. В результате метилирования, последующего гидролиза, восстановления и ацетилирования получена смесь ацетатов частично метилированных полиолов, которую анализировали методом хроматомасс-спектрометрии. Четыре главных продукта реакции идентифицированы как 2,3,4-три- O -метил-1,5-ди- O -ацетил-6-дезоксигексит, 2,4-ди- O -метил-1,3,5-три- O -ацетил-6-дезоксигексит, 2,6-ди- O -метил-1,3,4,5-тетра- O -ацетилгексит и 2,3-ди- O -метил-1,4,5-три- O -ацетилпентит. Следовательно, в состав гликана входят концевая 6-дезоксирамноза, О3-замещенная 6-дезоксирамноза, 3,4-дизамещенная гексопираноза (манноза) и О4-замещенная пентоза (ксилоза). Таким образом, гликан является разветвленным регулярным полисахаридом, причем в узле разветвления находится манноза, а на невосстанавливющем конце боковой цепи — 6-дезоксигексоза.

Предварительные опыты по кинетике гидролиза гликана показали, что он чрезвычайно кислотолабилен. Так, при гидролизе 0,1 н. CF_3COOH выход рамнозы достигает максимума уже через ~ 2 ч при 100°C , несколько медленнее нарастает выход ксилозы и фукозы (максимум через ~ 4 ч) и еще медленнее накапливается манноза: через 2 ч лишь $\sim 50\%$ от максимального количества. Исходя из этого, с целью выделения небольших олигосахаридных фрагментов был проведен частичный гидролиз гликана в 0,05 н. CF_3COOH (100°C , 30 мин). Продукты деградации разделяли на колонке с TSK HW-50 с детекцией при 200 нм и по цветной реакции на углеводы (рис. 3).

Углеводный анализ показал, что фракция III содержит моносахариды, преимущественно рамнозу. Судя по месту элюции, фракции II и I представляют собой главным образом моно- и димерное повторяющееся звено (тетра- и октасахариды соответственно). По моносахаридному составу эти фракции оказались практически одинаковы и содержали все четыре моносахарида в соотношении, близком к эквимолярному. Анализ их после восстановления NaBH_4 показал, что при восстановлении резко уменьшается количество фукозы, в то время как содержание других сахаров изменяется незначительно. Отсюда следует, что на восстанавливающем конце моно- и димерного повторяющегося звена находится фукоза. Таким образом, учитывая данные метилирования, фукоза, так же как и манноза, находится в основной цепи и замещена в положение О3, а легкогидроли-

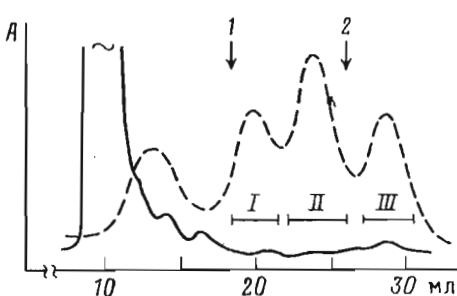


Рис. 3

Рис. 3. Разделение продуктов частичного гидролиза гликана на колонке (0,8 × 53 см) с гелем TSK HW-50 в воде. Детекция при 200 нм (сплошная кривая) и по реакции с орцином и серной кислотой (штриховая кривая). 1 и 2 — место элюции олигосахаридов (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3,6₂Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc-ol и Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal. Отмечены границы объединения фракций

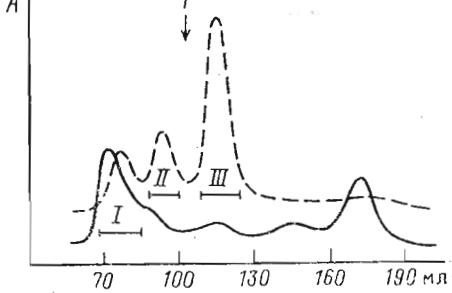


Рис. 4

Рис. 4. Разделение продуктов деградации гликана по Смиту на колонке (1,5 × 98 см) с сефадексом G-15 в воде. Детекция при 205 нм (сплошная кривая) и по реакции с орцином и серной кислотой (штриховая кривая). 1 — место элюции олигосахарида Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal

зумая рамноза занимает концевое положение в боковой цепи. Стоит отметить также, что олигосахаридные фрагменты, содержащиеся во фракции II, не содержат фосфора и, следовательно, фосфатная группа не входит в состав повторяющегося звена гликана.

Для дальнейшего выяснения последовательности моносахаридных остатков в повторяющемся звене была проведена деградация гликана по Смиту. Можно было ожидать, что если ксилоза находится в боковой цепи, основная цепь из 3-замещенных остатков фукозы и 3,4-дизамещенных остатков маннозы не будет расщепляться периодатом, а если 4-замещенная ксилоза находится в основной цепи, полисахарид будет деполимеризоваться с образованием фрагментов, содержащих фукозу и маннозу. Результаты хроматографии продуктов деградации гликана по Смиту приведены на рис. 4. Основным углеводным фрагментом (фракция III) оказался, судя по месту элюции и углеводному анализу, дисахарид, содержащий в равном количестве фукозу и маннозу. Спектр ^1H -ЯМР (табл. 2) подтвердил, что дисахарид включает в себя остатки α -маннопиранозы и α -фукопиранозы [13]. Для установления последовательности моносахаридных звеньев в дисахариде проведено его окисление и восстановление с последующим полным гидролизом. Анализ продуктов реакции показал, что манноза полностью окисляется, а фукоза сохраняется и, следовательно, дисахарид имеет строение: Man α 1-3Fuc α 1-2Gro, где 2Gro — остаток 2-замещенного глицерина, образующийся в результате деградации остатка ксилозы. Таким образом, ксилоза находится в главной цепи гликана, а последовательность моносахаридных остатков в полимере такова: ...Man-Fuc-Xyl ...

Следует заметить, что гидролиз окисленного и восстановленного гликана проводился очень мягкий (1% CH_3COOH , 100°С, 1 ч) с тем, чтобы сохранить фукозидную связь. При этом деполимеризация полисахаридной цепи по остатку ксилозы проходила, по-видимому, неполностью и оставалось небольшое количество димера (фракция II, рис. 4). Доказательством того, что фракция II представляет собой димер повторяющегося линейного звена, является размер этого фрагмента (больше трисахарида) и его моносахаридный состав (содержит в равном количестве маннозу и фукозу). Строение димерного фрагмента можно представить в виде Man α 1-3Fuc α 1-R-3(4)Man α 1-3Fuc α 1-2Gro (R — окисленный и восстановленный остаток ксилозы), при этом находящийся внутри цепи остаток маннозы замещен деградированным остатком ксилозы либо по O3, либо по O4 (при условии исходного замещения этого остатка рамнозой). Окисление и восстановление этого фрагмента (фракции II), последующий полный гидролиз и анализ показали, что и в димере манноза полностью окисляется. Значит,

Таблица 2

Данные ^1H -ЯМР-спектра олигосахарида (фракция III рис. 4)

Звено	Протон	Химический сдвиг, м.д.	Наблюдаемая мультиплетность *	KCCB, Гц
Manα	H1	5,07	д	$J_{1,2}$ 1,8
	H2	4,04	дд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	3,88	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,63	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H5	~3,7	м	
	H1	5,06	д	$J_{1,2}$ 3,6
	H2	3,88	дд	$J_{2,3}$ 9,8
	H3	3,98	дд	$J_{3,4}$ 3,6
	H4	4,93	уд	$J_{4,5}$ ~2
	H5	4,20	ук	$J_{5,6}$ 6,5
	H6	1,17	д	

* д — дублет, дд — дублет дублетов, т — триплет, м — мультиплет, уд, ук — уширенные дублет и квартет.

Таблица 3

Отнесение сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектре олигосахарида

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Литературные данные						
Man α [14]	95,3	71,5	71,5	68,2	74,2	62,3
Fuc α [15]	99,3	69,2	70,4	73,0	67,4	16,7
С учетом эффектов гликозилирования [14]						
Man α	103,6	71,5	71,5	68,2	74,2	62,3
-3Fuc α	>95	68,5	78,5	72,6	67,9	16,7
Экспериментальные данные						
Man α	103,65	71,7 *	71,4 *	68,2	74,7	62,4 *
-3Fuc α	99,4	68,9	78,6	72,95	68,2	16,5
-2Gro	62,8 *	80,1	61,7 *			

* Отнесение неоднозначно.

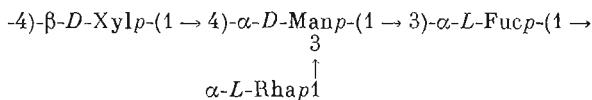
манноза замещена остатком ксилозы по O4 (но не по O3), и, таким образом, последовательность моносахаридных остатков в главной цепи выглядит так: -4Man1-3Fuc1-4Xyl-, а остаток рамнозы в боковой цепи замещает маннозу по O3.

С учетом полученных данных о строении дисахарида оказалось возможным однозначно отнести все сигналы в его ^{13}C -ЯМР-спектре (табл. 3). Хорошее совпадение экспериментальных химических сдвигов с расчетными (учитывая эффекты гликозилирования [14, 15]) подтверждает последовательность моносахаридов в дисахариде и тип замещения остатка фукозы. Из спектральных данных вытекает также, что манноза и фукоза имеют различные абсолютные конфигурации. Окончательный выбор из двух вариантов структуры (α -L-Man- α -D-Fuc-Gro или α -D-Man- α -L-Fuc-Gro) был сделан исходя из величины удельного оптического вращения дисахарида (-120°), которая очень близка к рассчитанной по правилу Кляйна для второй структуры (-118°).

Информация об абсолютной конфигурации двух оставшихся моносахаридных остатков (Xyl и Rha) была получена из ^{13}C -ЯМР-спектра гликана. Отнесение сигнала C5 (63,75 м. д.) замещенного по C4 остатка ксилопиранозы не вызывает сомнения [16] — он соответствует β -ксилопиранозе. Легко подсчитать β -эффект гликозилирования ксилопиранозы α -L-фукопиранозой ($-2,35$ м. д., ср. [13]). Большой отрицательный β -эффект гликозилирования указывает на различную абсолютную конфигурацию остатков

ксилозы и фукозы, и, следовательно, D-конфигурацию ксилозы. Для двух из четырех сигналов в аномерной области отнесение совершенно однозначно: сигнал при 103,15 м. д. принадлежит C1 α -D-маннопиранозы (ср. с сигналом в спектре дисахарида), а сигнал при 104,3 м. д. принадлежит C1-атому β -D-ксилопиранозы. Отсюда следует, что сильнопольные сигналы при 97,9 и 97,65 м. д. принадлежат C1-атомам α -L-фукопиранозы и α -рамнопиранозы. Независимо от конкретного отнесения сигналов α -эффект гликозилирования для C1-атома рамнопиранозы не превышает +3,5 м. д. [15]. С учетом типа связи в дисахаридном фрагменте Rha1-3Man это значение может отвечать только α -L- или β -D-конфигурации остатка рамнозы. По данным спектра ^1H -ЯМР гликана, остаток рамнозы имеет α -конфигурацию, и, следовательно, единственным возможным вариантом является α -L-конфигурация рамнозы.

Таким образом, из всех полученных химических и спектральных данных следует, что гликан из *C. oncopelti* построен из повторяющихся тетрасахаридных звеньев:



Размер полисахаридной цепи, т. е. число повторяющихся звеньев, можно оценить, исходя из относительной молекулярной массы гликана (~ 15 кДа по белку), а также из результатов анализа высокомолекулярной фракции I, полученной при деградации гликана по Смиту (рис. 4). Эта фракция является, по-видимому, кбротовой («якорной») частью гликана, находящейся на его восстановливающем конце. Как было установлено, она содержит из моносахаридов только маннозу и фукозу, которые не окислились и остались связанными с «якорной» частью. Хроматография фракции I на колонке с TSK HW-60 в тех же условиях, что и на рис. 1, показала, что углеводы сосредоточены главным образом в пике, элюирующимся с максимумом при 280 мл, т. е. в объеме элюции белка с $M \sim 5$ кДа. Эта фракция содержала маннозу, фукозу, фосфат и этаноламин в соотношении, близком к 3 : 2 : 3 : 2, а также небольшое количество глюкозамина (жирные кислоты и инозит не определяли). Учитывая уменьшение молекулярной массы гликана при его окислении с ~ 15 до ~ 5 кДа и изменение мольного соотношения Man — P с $\sim 8 : 1$ (в исходном полимере) до $\sim 1 : 1$ (в высокомолекулярном продукте его окисления), можно считать, что гликан содержит около 10 повторяющихся тетрасахаридных звеньев. Тот факт, что с «якорной» частью гликана остаются связанными остатки маннозы и фукозы, позволяет предположить, что какой-либо из этих моносахаридов осуществляет связь регулярной полисахаридной цепи с «якорем», т. е. находится на восстановливающем конце биологического повторяющегося звена.

Данных о «якорной» части гликана пока явно недостаточно. Нами установлено лишь, что в ее состав могут входить фосфат, этаноламин, глюкозамин и инозит. Последние два компонента лишь качественно идентифицированы с помощью ЖХ и ГЖХ. Количественный анализ этих единиц усложняется малым их содержанием по сравнению с другими моносахаридами и затрудненностью кислотного гидролиза «якорного» участка. Наличие указанных компонентов, а также жирных кислот позволяет предположить, что он, вероятно, подобен «якорю» гликофосфолипидного антигена простейших *Leishmania* [7, 8]. Такого же типа «якорь» имеет поверхностный антиген простейших *Trypanosoma brucei*, но он удерживает в мембране вариабельную олигосахаридную цепь, ковалентно связанную с белком (точнее, с гликоцерептином) с $M \sim 50$ —60 кДа [5]. Имеются также сведения о том, что простейшие *C. fasciculata* и *C. harnosa* содержат поверхностные гликопротеины [17]. Однако полученные нами данные показывают, что углеводы в *C. oncopelti* практически не входят в состав полимеров, в частности белков, с $M > 20$ кДа, а главным гликоконъюгатом является регулярно построенный гликан, который, по-видимому, имеет гидрофобный «якорь» типа фосфатидилинозита.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H -ЯМР сняты на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) в D_2O при 70°C (гликан) и 60°C (олигосахарид). Величины химических сдвигов даны относительно 4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфоната натрия (0 м. д.). Отнесение сигналов в спектре олигосахарида выполнено с помощью методики двойного гомоядерного резонанса в разностном варианте. Спектры ^{13}C -ЯМР сняты для растворов олиго- и полисахарида в D_2O при 30°C на приборе Bruker AM-300 (ФРГ), в качестве внутреннего стандарта использовали метанол, δ 50,15 м. д. Иноозит (в виде полного ацетата) идентифицировали методом ГЖХ на хроматографе Hewlett-Packard 5890 A с использованием колонки Ultra-1 (25 м) и градиента температуры $175 \rightarrow 290^\circ \text{C}$ (10 град/мин). Содержание углеводов и аминокислот (а также этаноламина) определяли с помощью анализатора Biotronik LC-2000 (ФРГ) после гидролиза 1 н. CF_3COOH (100°C , 3 ч) или 4 н. HCl (100°C , 15 ч) соответственно. Фосфор (общий) анализировали по методу [18]. Суммарные жирные кислоты определяли колориметрически по методу [19]. Электрофорез по Леммли проводили в 15% полиакриламидном геле. Оптическое вращение олигосахаридов измеряли в воде при 20°C на поляриметре DIP-360 (Jasco). Метилирование гликана проводили по методу [20], частично метилированные ацетаты полиолов идентифицировали с помощью хроматомасс-спектрометра GC/MS Finnigan-MAT INCOS 50, используя капиллярную колонку RSL-200 ($0,25 \times 30 \text{ мм}$), градиент температуры $50 \rightarrow 220^\circ \text{C}$ (5 град/мин).

Выделение гликана. Культивирование *C. oncopelti* проводили в ферментах объемом 45 л при $24-25^\circ \text{C}$, используя пептонную среду [21]. Биомассу собирали в стационарной фазе роста культуры (на 5-е сут), отделяли от культуральной жидкости сепарированием, осадок трижды отмывали водой, центрифугируя каждый раз при $3000g$, полученный осадок ($\sim 20 \text{ г}$) суспендировали в 200 мл 0,6% раствора CPC и перемешивали 1 ч при 20°C . Смесь центрифугировали (см. схему), к супернатанту приливали при перемешивании 4 объема ацетона и полученный осадок растворяли при нагревании ($50-60^\circ \text{C}$) в 20 мл 0,5% раствора SDS. К раствору приливали при перемешивании равный объем метанола, смесь оставляли на 16 ч при 5°C и центрифугировали. К супернатанту снова приливали равный объем метанола, осадок отделяли центрифугированием, полученный продукт (осадок 4) растворяли в 2 мл 0,5% раствора SDS и хроматографировали порциями на колонке ($2,6 \times 86 \text{ см}$), с гелем TSK HW-60 в 0,3% растворе SDS, содержащем 0,01 н. NaCl , с УФ-детекцией при 280 нм. Содержание углеводов во фракциях (4 мл) определяли по реакции с орцином и серной кислотой (рис. 1). Фракцию I дialisировали, концентрировали и повторяли осаждение гликана 75% метанолом как описано выше. Результаты анализа получаемых в процессе выделения гликана фракций приведены в табл. 1.

Частичный гидролиз гликана (5 мг) осуществляли в 2 мл 0,05 н. CF_3COOH (100°C , 30 мин), раствор упаривали и продукт хроматографировали на колонке ($0,8 \times 53 \text{ см}$) с гелем TSK HW-50 в воде с УФ-детекцией при 200 нм. Для калибровки колонки использовали олигосахариды с известным строением, выделенные нами ранее [22]. Кривую элюции олигосахаридов строили, определяя суммарное содержание углеводов в собранных фракциях (0,5 мл) в реакции с орцином и серной кислотой, после чего фракции объединяли, как показано на рис. 3. Фракция III содержала моносахариды: полный гидролиз давал лишь незначительный прирост моносахаридов. Из олигосахаридных фракций I и II отбирали по две аликовты (30 мкл). Одну из аликовт каждой фракции восстанавливали NaBH_4 и все пробы далее гидролизовали 1 н. CF_3COOH 3 ч при 100°C и проводили количественный анализ моносахаридов. Для обеих фракций результаты анализов близки: без восстановления фракции I и II содержат рамнозу, маннозу, фукозу и ксилозу в соотношении, близком к эквимолярному; после восстановления количество рамнозы, маннозы и ксилозы практически не изменяется, а количество фукозы уменьшается на 60 и 90% соответственно.

Деградация по Смиту. Гликан (20 мг) окисляли в 3 мл 0,05 М NaIO_4 (20°C , 40 ч, в темпите), восстанавливали ~ 70 мг NaBH_4 , через 4 ч раствор подкисляли уксусной кислотой, упаривали несколько раз с метанолом и уксусной кислотой, продукт деионизовали на колонке ($98 \times 1,5$ см) с сефадексом G-15 в воде и гидролизовали 1% CH_3COOH 1 ч при 100°C . Гидролизат упаривали, хроматографировали на той же колонке с анализом фракций по реакции с орцином и серной кислотой (рис. 4) и во фракциях I—III определяли содержание сахаров. Во всех фракциях обнаружены только манноза и фукоза в примерно равных количествах. Для дисахарида (2,1 мг), содержащегося во фракции III, сняты ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектры и измерено оптическое вращение: $[\alpha]_D^{20} - 120^\circ$ ($c 0,21$; вода). Олигосахаридные фрагменты (фракции II и III) окисляли NaIO_4 и восстанавливали NaBH_4 как описано выше, полученные продукты деионизовали на колонках с AG-50 (H^+) и AG-1 (CH_3COO^-), гидролизовали 1 н. CF_3COOH 2 ч при 100°C и определяли моносахаридный состав. В обоих случаях обнаружена только фукоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Host-Parasite Cellular and Molecular Interaction in Protozoal Infections. V. 11 / Eds Chang K.-P., Snary D. NATO ASI Series, Series H.: Cell Biology. Heidelberg: Springer-Verlag, 1987.
2. Current Topics in Microbiology and Immunology. 1985. Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 1985. V. 117.
3. Сухарева Н. Н. // Простейшие — новые объекты биотехнологии. Л.: Наука, 1989. С. 3—78.
4. Ferguson M. A. J., Williams A. F. // Ann. Rev. Biochem. 1988. V. 57. P. 285—320.
5. Ferguson M. A. J. // Science. 1988. V. 239. № 4841. P. 753—759.
6. Schmitz B., Klein R. A., Duncan I. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1987. V. 146. № 3. P. 1055—1063.
7. Rosen G., Pahlsson P., Londner M. V., Westerman M. E., Nilsson B. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 18. P. 10457—10463.
8. Turco S. J., Orlando P. A., Jr., Homans S. W., Ferguson M. A. J., Dwek R. A., Rademacher T. W. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 12. P. 6711—6715.
9. Patt S. L., Shoolery J. N. // J. Magnet. Reson. 1982. V. 46. P. 535—542.
10. Gorin P. A. J., Masurek M. // Carbohydr. Res. 1976. V. 48. № 2. P. 171—186.
11. Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Tanatar N. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1986. V. 146. № 2. P. 346—349.
12. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Солдаткина М. А., Парамонов Н. А., Захарова И. Я. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1208—1213.
13. Altona C., Haasnoot C. A. G. // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417—423.
14. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59—75.
15. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27—66.
16. Kováč P., Hirsch J., Shashkov A. S., Usov A. I., Yarotsky S. V. // Carbohydr. Res. 1980. V. 85. № 2. P. 177—185.
17. Mendelzon D. H., Parodi A. J. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 5. P. 2129—2133.
18. Hess H. H., Derr J. E. // Anal. Biochem. 1975. V. 63. № 2. P. 607—613.
19. Snyder F., Stephen N. // Biochim. et biophys. acta. 1959. V. 34. № 1. P. 244—245.
20. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276—278.
21. Сухарева Н. Н., Зеленева Р. Н., Силаев А. Б., Доронина Л. А. // Вестн. МГУ. Сер. биол., почвоведение. 1969. № 3. С. 3—10.
22. Арбатский Н. П., Мартинова М. Д., Деревицкая В. А., Kochetkov N. K. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. № 4. С. 995—999.

Поступила в редакцию
24.VII.1990

N. P. ARBATSKY, D. V. YURTOV, A. S. SHASHKOV, N. N. SUKHAREVA*,
T. S. TITOVA*, V. A. DEREVITSKAYA, N. K. KOCHETKOV

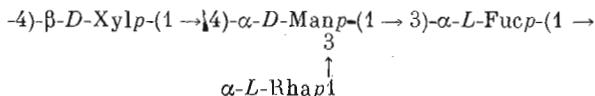
THE STRUCTURE OF GLYCAN FROM THE PROTOZOAN *CRITHIDIA ONCOPELTI*

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy

of Sciences of the USSR, Moscow;

* Department of Biology, M. V. Lomonosov State University, Moscow

A major sugar polymer was isolated from the protozoan *Cryptosporidium oncopelti* related to Trypanosomatidae family and shown to be a regular glycan built of the tetrasaccharide repeating units. The unit's structure was deduced from the chemical and NMR spectroscopy data as follows:



In addition to carbohydrates, some fatty acids, inositol, ethanolamine, and phosphate were also found, thus allowing one to consider them as components of hydrophobic anchor of glycan (similar to phosphatidylinositol), an usual structural element of many protozoan glycoproteins and glycophospholipids.