



УДК 577.152.24*137'142

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ФУКОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ МОЗГА КРЫС С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ АКЦЕПТОРОВ*

© 2000 г. Г. Я. Видершайн, О. Коул, Н. В. Бовин**, Н. Э. Нифантьев**, Р. МакКлуер***

*Отдел биомедицины Центра им. Е.К. Шрайвер, Уолтхем, США;***Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;****Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва;*****Отдел педиатрии медицинского факультета университета Техаса, Хьюстон, США*

Поступила в редакцию 25.05.99 г. Принята к печати 24.07.99 г.

Субстратная специфичность фукозилтрансферазы (FT) из переднего мозга и мозжечка крыс была исследована с помощью синтетических акцепторов. Из 16 исследованных акцепторов ферментативному фукозилрованию подвергались только те, которые содержали фрагмент – Galβ1-4GlcNAcβ1-R. Изомер со связью 1–3, а также лактоза и олигосахариды с дополнительным остатком Neu5Ac при Gal или остатком Fuc при GlcNAc не фукозилировались, субстратные свойства Fucα1-2Galβ1-4GlcNAc были такими же, как у Galβ1-4GlcNAc. Показано, что FT из мозжечка и переднего мозга имеет специфичность, схожую со специфичностью FT IV млекопитающих. При сходных профилях специфичности активность FT из мозжечка по отношению ко всем исследованным субстратам была выше, чем у FT, выделенной из переднего мозга.

Ключевые слова: фукозилтрансфераза, субстратная специфичность, синтетические акцепторы; мозг крыс.

ВВЕДЕНИЕ

Фукозилированные гликоконъюгаты присутствуют в различных человеческих и животных тканях, в том числе в тканях ЦНС, где в составе O- и N-цепей гликопротеинов, в протеогликанах и гликолипидах были идентифицированы антиген Le^x (Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-R, CD15) и его сиалилированная форма SiaLe^x (Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-R, CD15s) [1–5]. Все больше данных свидетельствует о том, что гликоконъюгаты, содержащие эпитопы Le^x, играют важную роль в межклеточных взаимодействиях при эмбриогенезе и опухолеогенезе и что они, возможно, включены также в процессы развития нервной системы [6–10]. Поскольку завершающая стадия биосинтеза Le^x состоит в присоединении остатка фукозы к лактозаминному фрагменту, катализируемом α1,3-фукозилтрансферазой (КФ 2.4.1.37, FT) [4], именно этот фермент играет ключевую роль в экспрессировании антигена Le^x.

* Статья посвящается профессору А.Я. Хорлину в связи с его 70-летием.

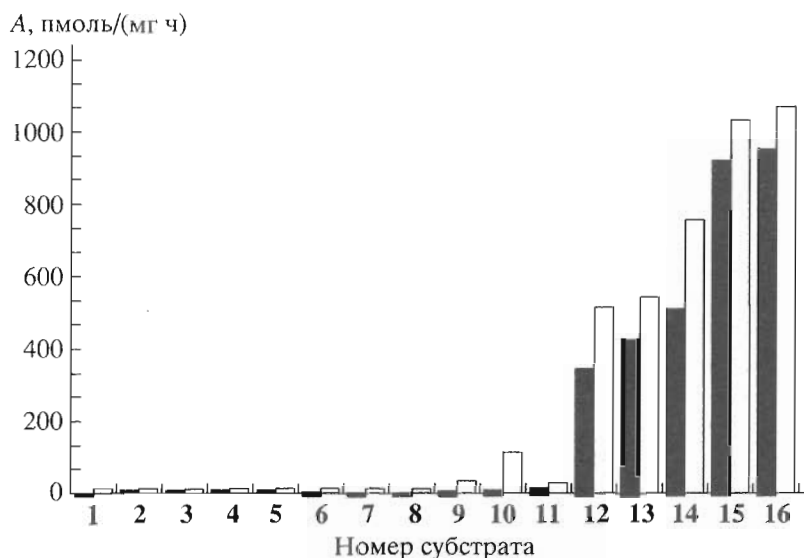
Сокращения: Le^x – антиген Льюис X; SiaLe^x – сиалилированный антиген Льюис X; FT – фукозилтрансфераза; PAA – полиакриламид; Biot – биотин; LacNAc – N-ацетиллактозамин; ЦНС – центральная нервная система.

Автор для переписки (тел.: (095) 330-71-38; e-mail: bovin@carb.siobc.ras.ru).

Ранее мы осуществили клонирование гена крысиной FT и получили этот белок в клетках COS-1 [11]. Предсказанная аминокислотная последовательность, субстратная специфичность и устойчивость к действию N-этилмалеимида показали его сходство с мышьиной и человеческой FT IV (ср. [12]). Недавно мы описали фукозилтрансферазу растущих переднего мозга и мозжечка крыс, имеющую схожие свойства [13]. Во всех указанных экспериментах в качестве субстратов FT использовали природные олигосахариды и гликолипиды. Однако природные акцепторы FT труднодоступны и часто гетерогенны, что осложняет интерпретацию результатов. Синтетические аналоги строго определенной структуры лишены этого недостатка и занимают важное место в исследовании трансфераз [14]. В данной работе представлены новые данные о субстратной специфичности FT из мозга крыс, полученные с синтетическими акцепторами различной структуры. Предварительные результаты этого исследования опубликованы в работе [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве акцепторов были взяты низкомолекулярные (олигосахариды) и высокомолекулярные (водорастворимые полиакриламидные конъю-



Определение фукозилтрансферазной активности (A) препаратов из переднего мозга (черные столбцы) и мозжечка (серые столбцы) крыс с использованием синтетических субстратов ((1)–(16)). Анализ проводили как описано в “Эксперимент. части”. Все значения – средние из двух измерений, отклонение меньше 10%.

югаты) соединения, содержащие остаток GlcNAc (1)–(16); некоторые из них содержали дополнительные остатки биотина, придающие неогликоконъюгату гидрофобные свойства [14], что иногда способствует лучшему взаимодействию с гликозилтрансферазами [2].

- Galβ1-4Glc (1)
- GlcNAcβ-PAA-Biot (2)
- Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ1-OMe (Le^x-OMe) (3)
- Glcβ-PAA-Biot (4)
- Galβ1-3GlcNAcβ-PAA-Biot (5)
- Galβ1-3GalNAcβ-PAA (6)
- Fucα1-2Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ-PAA (7)
- Fucα1-3GlcNAcβ-PAA (8)
- Galβ1-3GlcNAcβ-OMe (9)
- Fucα1-4GlcNAcβ-PAA (10)
- Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-OPr (11)
- Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ-OPr (12)
- Galβ1-4GlcNAcβ-PAA-Biot (13)
- Galβ1-4GlcNAc (14)
- Galβ1-4GlcNAcβ-OMe (15)
- Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ-OMe (16)

Во всех случаях в качестве положительного контроля был использован LacNAc (14). Полученные данные представлены на рисунке. Активность FT по отношению к большинству субстратов для препарата из мозжечка была выше, чем для FT переднего мозга. Так как профили специфичности двух препаратов были практически идентичны (см. рисунок), различие в их активнос-

ти, по-видимому, связано с разным содержанием в тканях. Показано, что β-метилгликозид N-ацетиллактозамина (15) является лучшим акцептором для FT, чем свободный дисахарид (14). Различие можно объяснить тем, что LacNAc представляет собой смесь α- и β-аномеров и, возможно, α-аномер гликозилируется с меньшей скоростью.

Из 16 испытанных акцепторов заметному фукозилрованию подверглись только те, которые содержали фрагмент Galβ1-4GlcNAc (акцепторы (12)–(16)). Акцептор с незамещенным остатком GlcNAc, а также соединения, содержащие дисахаридный фрагмент с 1–3 связью (акцепторы (5), (6) и (9)), не подвергались фукозилрованию, то же самое относится и к Galβ1-4Glc (1). Сиалилированный олигосахарид (11) не был акцептором для FT из мозжечка и переднего мозга, как и для человеческой FT IV (ср. [11, 13]), что подтверждает предварительные данные [15] о его специфичности. Монофукозилированный субстрат Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ-OMe (16) показал несколько лучшие субстратные свойства, чем LacNAc (14). Субстраты (3) и (7), в которых гидроксил 3 остатка GlcNAc уже фукозилирован, как и следовало ожидать, были неактивными.

Полученные данные позволяют предположить, что минимальной структурой, узнаваемой FT из мозга крыс, является дисахарид Galβ1-4GlcNAc (14). Таким образом, последовательность Galβ1-4GlcNAc со свободным гидроксилом не только в положении C-3 остатка глюкозамина (т.е. подвергаемом фукозилрованию), но и при C-3 остатка галактозы необходимы для данной FT в узнавании участка субстрата. Высокомолекулярная

форма лактозамина, акцептор (13), не имеет преимуществ перед мономерным (14).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Акцепторы. В качестве акцепторов использованы коммерческие полиакриламидные неогликоконъюгаты (Syntesome GmbH, Мюнхен, Германия). Олигосахариды и гликозиды синтезированы как описано ранее [16–19] или получены от "Sigma". Мольная доля углеводов в РАА-неогликоконъюгатах составляет 20%, за исключением акцепторов (7) и (8) (10%).

GDP-L-[¹⁴C]фукоза (283 Ки/моль) получена от DuPont – New England Nuclear (США), *N*-ацетиллактозамин (LacNAc), GDP-L-фукоза, лактоза (Lac), CHAPS (3-[(3-холинамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат) от Sigma Chemical Co. (США). Использовали Тритон X-10 (Fisher Scientific Company, США), анионообменную смолу AG-1X8, 100–200 меш, в CH₃COO⁻ форме (BioRad, США); картриджи BondElut C₁₈ и ионообменные картриджи в NR₃⁺-форме с соотношением массы сорбента к объему колонки 100 мг/мл колонки (Analytichem International, США).

Для получения ферментного препарата использованы передний мозг и мозжечок 12-дневных крыс линии Sprague-Dawley. Все манипуляции с ферментами проводили на льду. Ткани мозга были гомогенизированы в 20 мМ MOPS/NaOH-буфере (рН 7.4), содержащем Тритон X-10 (0.5%) в течение 1 мин в стеклянном гомогенизаторе (Kontes Dual Tissue Grinder). После центрифугирования (800 g, 15 мин) собирали надосадочную жидкость. Аликвоты (100 мкл) замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C. Размороженные экстракты использовали в качестве ферментного препарата в день анализа.

Ферментативное фукозиллирование. За исключением оговоренных случаев (см. ниже) при определении субстратной специфичности стандартная инкубационная смесь (50 мкл) содержала 25 мкмоль MOPS/NaOH-буфера, 0.25 мкмоль MnCl₂, 5 мкмоль NaCl, 0.5 мкмоль АТР, 104 нмоль *N*-ацетиллактозамина или другого субстрата (за исключением биотинилированных, см. ниже), 0.5 нмоль GDP-L-[¹⁴C]фукозы, разбавленной немеченой GDP-L-Fuc (Sigma) до удельной активности ~54000 имп/нмоль, CHAPS (1%) и 20 мкл тканевых экстрактов (около 100–200 мг белка) в качестве ферментного препарата. После инкубирования при 37°C в течение 3 ч реакцию останавливали добавлением 0.5 мл холодной воды и немедленно наносили смесь на колонку (1 мл) с анионообменной смолой AG 1-X8 (BioRad). Колонку промывали 1 мл воды и собирали в скитилляционный сосуд смыв, содержащий меченые фукозиллированные продукты. После добавления 4.5 мл

сцитилляционной смеси (Ready Safe, Beckman) измеряли радиоактивность пробы.

Некоторые особенности методики фукозиллирования сиалилированного и биотинилированных акцепторов связаны, соответственно, с их зарядом и гидрофобностью.

При использовании в качестве акцептора сиалилированного олигосахариды (11) колонку промывали 1 мл 0.15 М NaCl; в этих условиях GDP-фукоза в отличие от сиалильных производных не элюируется, а остается связанной на колонке [11].

При использовании в качестве акцепторов биотинилированных акцепторов реакцию смесь после смешения всех компонентов обрабатывали ультразвуком 1 мин. Ферментативную реакцию прекращали добавлением 0.5 мл 0.1 М раствора KCl в смеси CHCl₃ – MeOH – H₂O (3 : 48 : 47) (раствор А) и наносили реакцию смесь на картридж C₁₈, уравновешенный раствором А [20]. Непрореагировавшую GDP-фукозу элюировали 1 мл раствора А с последующей промывкой 3 мл воды. Биотинилированные продукты элюировали 2 мл смеси CHCl₃–MeOH (2 : 1), затем 2 мл метанола. Элюаты объединяли, высушивали в токе азота и определяли радиоактивность при помощи сцитилляционного счетчика, добавляя 4.5 мл сцитилляционной смеси.

Полученные значения корректировали (вычитали фоновые значения), учитывая перенос фукозы на эндогенные акцепторы. Специфическую активность фукозилтрансфераз выражали в пикомолях перенесенной фукозы на миллиграмм белка в час.

Белок определяли в 96-луночных планшетах при помощи BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA). Поглощение измеряли при 562 нм на спектрофотометре BT 2000 Microkinetics Reader (Fisher Biotech, Pittsburg, PA, USA). Калибровочную кривую строили, используя растворы бычьего сывороточного альбумина известной концентрации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данное исследование поддержано грантом NIH HD05515. О. Коул получал поддержку от Национального общества рассеянного склероза США (грант PP0581). Авторы благодарят Ф. Смита и Д. Ньюбурга (Центр им. Е.К. Шрайвер) за поддержку и плодотворное обсуждение и И.М. Белянчикова (ИБХ РАН) за помощь в подготовке рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakomori S. // *Histochem. J.* 1992. V. 24. P. 771–776.
2. Fukuda M. // *Molecular Glycobiology* / Eds M. Fukuda, O. Hindsgaul. Oxford: Oxford University Press, 1994. P. 1–52.

3. Gersten K.M., Natsuka S., Trinchera M., Petryniak B., Kelly R., Hiraiwa N., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., Lowe J. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 25047–25056.
4. Mollicone R., Candelier J.-J., Mennesson B., Coullin P., Venot A.P., Oriol R. // *Carbohydrate Res.* 1992. V. 228. P. 265–276.
5. Williams M.A., Gross S.K., Evans J.E., McCluer R.H. // *J. Lipid Res.* 1988. V. 29. P. 613–619.
6. Hakomori S. // *Adv. Cancer Res.* 1989. V. 52. P. 257–331.
7. Cooling L.W., Zhang D.-S., Koerner T.A.W. // *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* 1997. V. 9. P. 191–209.
8. Boubelik M., Floryk D., Bohata J., Draberova L., Macak J., Smid F., Draber P. // *Glycobiology.* 1998. V. 8. P. 139–146.
9. Mai J., Marani E., Hakomori S. // *Histochem. J.* 1992. V. 24. P. 759–909.
10. Jungalwala F.B. // *Neurochem. Res.* 1994. V. 19. P. 945–957.
11. Sajdel-Sulkowska E.M., Smith F.I., Wiederschain G.Ya., McCluer R.H. // *Glycoconj. J.* 1996. V. 14. P. 249–258.
12. Bergwerff A.A., van Kuik J.A., Schiphorst W.E., Koelman C.A., van den Eijnden D.H., Kamerling J.P., Vliegthart J.F. // *FEBS Lett.* 1993. V. 334. P. 133–138.
13. Wiederschain G., Koul O., Aucoin J., Smith F., McCluer R.H. // *Glycoconj. J.* 1998. V. 15. P. 379–388.
14. Bovin N.V. // *Glycoconj. J.* 1998. V. 15. P. 431–446.
15. Wiederschain G., Koul O., Bovin N., Nifant'ev N., McCluer R.H. // *Glycobiology.* 1996. V. 6. P. 761.
16. Perez S., Mouhous-Riou N., Nifant'ev N., Tsvetkov Y., Bachet B., Imberty A. // *Glycobiology.* 1996. V. 6. P. 537–542.
17. Нифантьев Н.Э. // *ЖВХО.* 1998. Т. 42. С. 134–150.
18. Duus J., Nifant'ev N.E., Shashkov A.S., Khatuntseva E.A., Bock K. // *Carbohydr. Res.* 1996. V. 288. P. 25–44.
19. Kochetkov N.K., Nifant'ev N.E., Backinowsky L.V. // *Tetrahedron.* 1987. V. 43. P. 3109–3121.
20. Williams M.A., McCluer R.H. // *J. Neurochem.* 1980. V. 35. P. 266–269.

The Study of the Substrate Specificity of Rat Brain Fucosyltransferase Using Synthetic Acceptors

G. Ya. Wiederschain*, O. Koul*, N. V. Bovin*, N. E. Nifant'ev***, and R. McCluer******

*Department of Biomedical Sciences, E.K. Shriver Center, Waltham, MA 02452; Departments of Neurology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

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

***Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, GSP-1 Moscow, 117913 Russia

****Department of Pediatrics, University of Texas Medical School, Houston, TX 77030, USA

The substrate specificity of fucosyltransferase (FT) from rat forebrain and cerebellum was studied using synthetic acceptors. Of 16 acceptors tested, only those containing the Gal β 1-4GlcNAc β 1-R fragment were subjected to enzymic fucosylation. The isomer with a 1-3 bond as well as lactose and oligosaccharides with an additional Neu5Ac residue attached to Gal or a Fuc residue attached to GlcNAc were not fucosylated whereas Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc displayed the same substrate properties as Gal β 1-4GlcNAc. FT from cerebellum and forebrain was shown to have the specificity similar to that of mammalian FT IV. The activity of the cerebellum FT with all types of substrates was higher than that of FT isolated from forebrain, the specificity profiles being similar.

Key words: fucosyltransferase, substrate specificity, synthetic acceptors; rat brain

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7138; e-mail: bovin@carb.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 6. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.