



УДК 547.458'118'363.04:577.154

УЧАСТИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ
МОРАПРЕНИЛПИРОФОСФАТСАХАРОВ
В ОБРАЗОВАНИИ ЛИПИДОЛИГОСАХАРИДОВ И ГЛИКОПРОТЕИНОВ
В МЕМБРАННОМ ПРЕПАРАТЕ ИЗ ПРОРОСТКОВ КЛЕВЕРА

Дружинина Т. Н., Панкрушина А. Н., Шибяев В. Н.

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

Полипренилфосфосахара играют важную роль в биосинтезе углеводных цепей многих биополимеров микроорганизмов [1, 2] и гликопротеинов с N-гликозидной связью из животных и растений [3]. Концентрация производных полипренолов в клетках чрезвычайно мала, что сильно затрудняет изучение их строения и характер их участия в различных процессах. Одним из способов решения этой проблемы может быть введение в ферментные системы синтетических производных полипренолов и прослеживание их дальнейших превращений.

Ранее нами было показано [4], что препарат мембран из проростков клевера катализирует образование липидолигосахаридов, содержащих остатки галактозы, глюкозы и маннозы, и последующее включение этих олигосахаридных цепей в состав эндогенных гликопротеинов. В качестве акцептора моносахаридных остатков в этом процессе выступает производное эндогенного полипренола типа долихола. Этот ферментный препарат способен использовать в синтезе липидолигосахаридов и экзогенные акцепторы, что было продемонстрировано на примере морапсенилфосфата, который служил акцептором моносахаридных остатков при росте олигосахаридных цепей, построенных из остатков маннозы.

В настоящей работе мы исследовали способность выступать в качестве акцепторов маннозных остатков при биосинтезе липидолигосахаридов и их последующем превращении в гликопротеины ряда морапсенилфосфатсахаров, недавно синтезированных в нашей лаборатории [4, 5], а именно морапсенилфосфатов α -D-галактопирапозы Gal α 1ppMpr; α -D-глюкопирапозы Glc α 1ppMpr и α -D-маннопиранозы Man α 1ppMpr.

После инкубации производных морапсенола и GDP-[¹⁴C]Man с мембранным препаратом из инкубационной смеси выделяли, как описано ранее [4], фракции липидмоносахаридов, липидолигосахаридов и углеводсодержащих полимеров и определяли их радиоактивность. Введение в инкубационную смесь Glc α 1ppMpr не влияло на уровень включения маннозы в упомянутые фракции, в то время как при добавлении Man α 1ppMpr и Gal α 1ppMpr, напротив, наблюдалось заметное стимулирование включения [¹⁴C]маннозы во фракции липидолигосахаридов и полимеров (таблица, опыты 1—4). Таким образом, остаток глюкозы, входящей в состав полипренилфосфатсахара, не может служить инициатором роста олигосахаридной цепи при синтезе липидолигосахаридов под действием ферментного препарата мембран, а для морапсенилфосфатов маннозы и галактозы участие в этой реакции кажется весьма вероятным.

Чтобы убедиться, что стимуляция синтеза липидолигосахаридов в присутствии Man α 1ppMpr и Gal α 1ppMpr связана с участием экзогенного акцептора, а не с активацией реакции с эндогенным акцептором, мы провели аналогичные эксперименты с радиоактивными производными [¹⁴C]Man α 1ppMpr и [¹⁴C]Gal α 1ppMpr (таблица, опыты 5—8). В пробах, не содержащих GDP-Man (опыты 7, 8), почти вся радиоактивность была обнаружена во фракции липидмоносахаридов, в то время как при добав-

Включение маннозы в олигосахаридные цепи при инкубации GDP-Man в присутствии ферментного препарата из проростков клевера и синтетических морауренилпирофосфатсахаров*

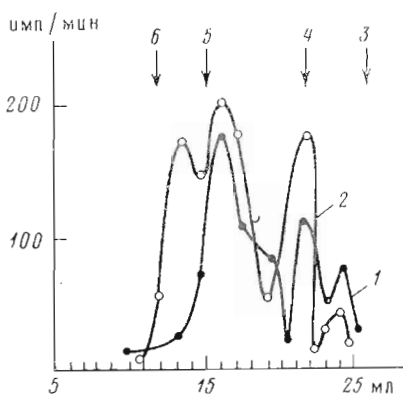
Номер опыта	Липид-акцептор, нмоль	Радиоактивность во фракциях, имп/мин		
		липидмоносахариды	липидолигосахариды	полимеры
1	—	100	990	1200
2	Man α 1ppMpr, 10	95	1680	2060
3	Gal α 1ppMpr, 10	115	1740	3550
4	Glc α 1ppMpr, 10	90	850	1100
5	[14 C]Man α 1ppMpr, 1	16 300	7000	3000
6	[14 C]Gal α 1ppMpr, 1	9 000	1200	1400
7**	[14 C]Man α 1ppMpr, 0,25	5 340	540	190
8**	[14 C]Gal α 1ppMpr, 0,5	3 900	300	100

* Условия инкубации как в работе [4]; объем пробы 100 мкл, количество GDP-[14 C]Man (опыт 1—4) — 12,5 нмоль и GDP-Man (опыт 5,6) — 50 нмоль.

** Инкубация в отсутствие GDP-Man.

лении немеченого нуклеотидилсахара значительная часть ее переходит во фракцию липидолигосахаридов. Анализ инкубационных смесей методом ТСХ (силикагель G 60, «Merck», ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4, подтвердил превращение моносахаридных производных морауренилпирофосфата (R_f 0,2) в олигосахаридные (R_f 0,05).

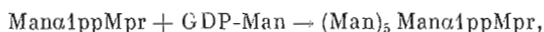
Анализ олигосахаридных компонентов липидолигосахаридов, образующихся из Man α 1ppMpr и GDP-[14 C]Man, был проведен после их мягкого кислотного гидролиза (0,01 н. HCl, 100°С, 15 мин). При хроматографии образующихся олигосахаридов на сефадексе G-15 было обнаружено три продукта (рисунок, 1), основной из них соответствовал гексасахариду. Полностью аналогичная картина наблюдалась при анализе продуктов, полученных из [14 C]-Man α 1ppMpr и GDP-Man, что подтверждает включение моносахаридного остатка акцептора в состав продуктов реакции. Анализ олигосахаридов с помощью хроматографии на бумаге (система бутанол — пиридин — вода, 4 : 3 : 4) подтверждает, что основным продуктом реакции является гексасахарид. После обработки [14 C]маноолигосахаридов



Распределение радиоактивности при гель-фильтрации на сефадексе G-15 олигосахаридов, полученных при реакции GDP-[14 C]Man с Man α 1ppMpr (1) и Gal α 1ppMpr (2) в присутствии препарата мембран из проростков красного клевера. Стрелками указаны объемы выхода моносахарида (3), раффинозы (4), гексасахариды [7] (5) и (GlcNAc) $_2$ Man $_9$ Glc $_3$ [8] (6)

α -маннозидазой («Sigma», 0,06 ед. акт., pH 4,6; 24 ч) и хроматографии на бумаге обнаружили единственную радиоактивную зону, соответствующую по подвижности маннозе. Значит, в исследуемой системе образуются α -манноолигосахариды. Как и следовало ожидать, на восстанавливающем конце олигосахаридов, полученных с использованием [14 C]Man α 1ppMpr, находится остаток меченой маннозы, так как после их обработки NaBH $_4$ и кислотного гидролиза вся радиоактивность обнаружена в зоне маннита (хроматография на бумаге в системе нитрометан — уксусная кислота — этанол — вода, насыщенная борной кислотой, 8 : 1 : 1 : 1).

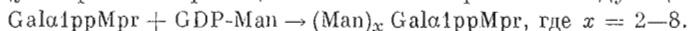
Таким образом, препараты мембран из проростков клевера катализируют реакцию



приводящую к олигосахаридам, в которых остатки маннозы соединены α -гликозидной связью.

Аналогичная схема была использована для анализа липидолигосахаридов, образующихся из GDP-Man и Gal α 1ppMpr. В этом случае образуются

три основных продукта, олигосахаридные цепи которых, по данным гель-фильтрации (рисунок, 2), соответствуют трисахариду, гексасахариду и более высокомолекулярному соединению (последнее, по данным хроматографии на бумаге, соответствует олигосахариду со степенью полимеризации 7—9). Как и в случае использования $\text{Man}\alpha 1\text{ppMpr}$, остатки маннозы, включаемые в состав олигосахаридной цепи из GDP-Man , соединены между собой α -маннозидной связью, так как после обработки α -маннозидазой было обнаружено два радиоактивных продукта, соответствующих по хроматографической подвижности маннозе и дисахариду. Таким образом, протекающую при этом реакцию можно изобразить следующим образом:



Включение $[^{14}\text{C}]$ маннозы и $[^{14}\text{C}]$ галактозы из радиоактивных полипренилпирофосфатсахаров во фракцию полимеров (таблица), очевидно, отражает метаболическую связь между липидсахарами и полимерами. Для дальнейшего изучения этого процесса мы выделили фракцию липидолигосахаридов, образованных в смеси $[^{14}\text{C}]\text{Gal}\alpha 1\text{ppMpr}$ и GDP-Man (липидолигосахарид 1) или $[^{14}\text{C}]\text{Man}\alpha 1\text{ppMpr}$ и GDP-Man (липидолигосахарид 2), и проинкубировали их с мембранным препаратом. После инкубации 85% радиоактивности из соединения (1) и 50% радиоактивности из соединения (2) перешло во фракцию полимеров. Следовательно, липидолигосахариды, полученные из синтетических морапренилпирофосфатсахаров, способны служить предшественниками углеводных цепей полимеров. Полимеры, образованные при участии $\text{Gal}\alpha 1\text{ppMpr}$ и $\text{Man}\alpha 1\text{ppMpr}$ (опыты 2, 3, 5, 6, таблица), на 90% расщеплялись при обработке проназой («Serva», 16 ед. акт., рН 7,5; 48 ч) и, значит, состояли в основном из гликопротеинов.

Таким образом, использование синтетических гликозилпирофосфатных производных морапренола позволило показать, что в мембранном препарате из клевера образуются липидманноолигосахариды, содержащие на восстанавливаемом конце остатки маннозы, галактозы (но не глюкозы), которые способны служить предшественниками олигосахаридных цепей гликопротеинов.

Авторы выражают глубокую благодарность Л. Л. Данилову и С. Д. Мальцеву за предоставление синтетических гликозилпирофосфатов морапренола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шибаяев В. Н. Успехи биол. химии, 1976, т. 17, с. 187—216.
2. Tonn S. J., Gander J. E. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1979, v. 33, № 1, p. 169—199.
3. Struck D. K., Lennarz W. J. In: *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*/ Ed. Lennarz W. J. New York—London: Plenum Press, 1980, p. 35—83.
4. Дружинина Т. Н., Панкрушина А. Н., Шибаяев В. Н., Лихолат Т. В. Биохимия, 1981, т. 46, № 8, с. 1445—1457.
5. Daniilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. *Carbohydr. Res.*, 1981, v. 88, № 2, p. 203—211.
6. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибаяев В. Н., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 109—113.
7. Кочетков Н. К., Николаев А. В., Дмитриев Б. А. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1981, № 3, с. 699—700.
8. Lehle L. *Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 109, № 2, p. 589—601.

Поступило в редакцию
26.XI.1981

PARTICIPATION OF SYNTHETIC MORAPRENYL PYROPHOSPHATE SUGARS IN BIOSYNTHESIS OF LIPID-OLIGOSACCHARIDES AND GLYCOPROTEINS IN MEMBRANE PREPARATION FROM RED CLOVER SEEDLINGS

DRUZHININA T. N., PANKRUSHINA A. N., SHIBAIEV V. N.
*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

The ability of glucosyl-, galactosyl- and mannosyl derivatives of moraprenyl pyrophosphate to accept mannose from $\text{GDP}-[^{14}\text{C}]\text{Man}$ was tested with enzyme membrane preparation from the red clover seedlings. The glucosyl derivative was ineffective in this system, whereas the other two gave rise to lipid-oligosaccharides with structures of $(\text{Man})_{2-8}\text{Gal}\alpha 1\text{ppMpr}$ or $(\text{Man})_5\text{Man}\alpha 1\text{ppMpr}$. Using the same enzyme preparation, radioactivity from these lipid-oligosaccharides was transferred into endogenous glycoproteins.