



УДК 547.952

СТРУКТУРА СИАЛОЛИГОСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ
ДИСИАЛОЗИЛГАНГЛИОЗИДА ГЕПАТОМЫ 27 КРЫС

Дятловицкая Э. В., Новиков А. М., Бергельсон Л. Д.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

При исследовании ганглиозидов гепатомы 27 крыс обнаружен сialogликолипид, отсутствующий в печени. Установлено, что этот ганглиозид, являющийся наряду с гематозидом основным сialogликолипидом исследуемой опухоли, содержит сфингозиновые основания, глюкозу, галактозу, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилнейраминную кислоту в отношении 1 : 1 : 2 : 1 : 2. На основании анализа продуктов, образующихся при метилировании ганглиозида и последующем кислотном метанолизе, а также при действии на ганглиозид нейраминидазы из *Vibrio cholerae*, сделан вывод, что исследуемый ганглиозид идентичен дисиалозилганглиозиду $G_{D_{1b}}$. Обсуждается возможный путь биосинтеза дисиалозилганглиозида $G_{D_{1b}}$ в гепатоме.

Многочисленными исследованиями установлено, что в культурах клеток, трансформированных вирусами *in vitro*, меняется состав ганглиозидов по сравнению с нормой [1]. В большинстве случаев ганглиозидный состав упрощается, а биосинтез полисиалозилганглиозидов прекращается. Значительно менее исследован ганглиозидный состав злокачественных тканей [2]. Имеются две работы, посвященные ганглиозидам гепатом [3, 4]. В них показано наличие в этих опухолях трех ганглиозидных компонентов: N-ацетилгематозида $G_{M_3}^*$, моносиалозилганглиозида G_{M_1} и дисиалозилганглиозида $G_{D_{1a}}$. Несколько иной результат получен нами при изучении ганглиозидов гепатомы 27 [6, 7]. С помощью ТСХ (рис. 1) в этой ткани было обнаружено четыре типа ганглиозидов: гематозид G_{M_3} , в составе которого помимо N-ацетилнейраминозиллактозилцерамида был обнаружен N-гликолилнейраминозиллактозилцерамид, моносиалозилганглиозид G_{M_1} и два дисиалозилганглиозида, один из которых присутствовал в преобладающих количествах. Минорный дисиалозилганглиозид по хроматографической подвижности и структуре соответствовал дисиалозилганглиозиду $G_{D_{1a}}$, а основной компонент обладал более полярными свойствами. Первый из указанных дисиалозилганглиозидов присутствовал в печени, второй в печени обнаружен не был (рис. 1). Поскольку до сих пор имелись указания о наличии в гепатомах лишь дисиалозилганглиозида $G_{D_{1a}}$, представляло интерес изучить структуру второго дисиалозилганглиозида G_{D_x} гепатомы 27, являющегося наряду с гематозидом основным сialogликолипидом этой опухоли [7].

* Сокращения ганглиозидов даны по Свеннерхольму [5].

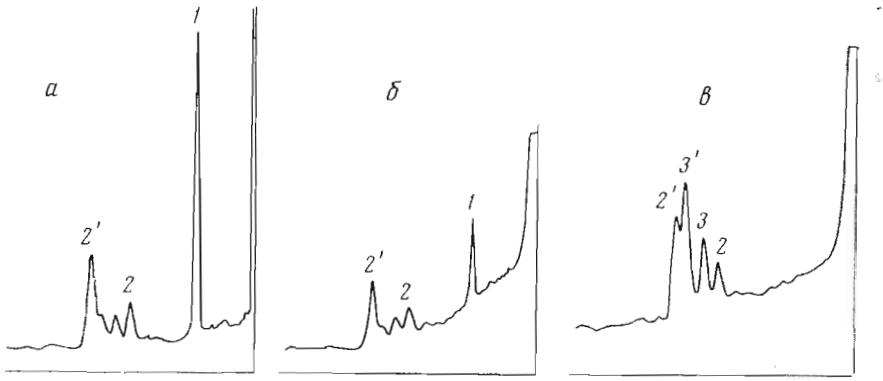
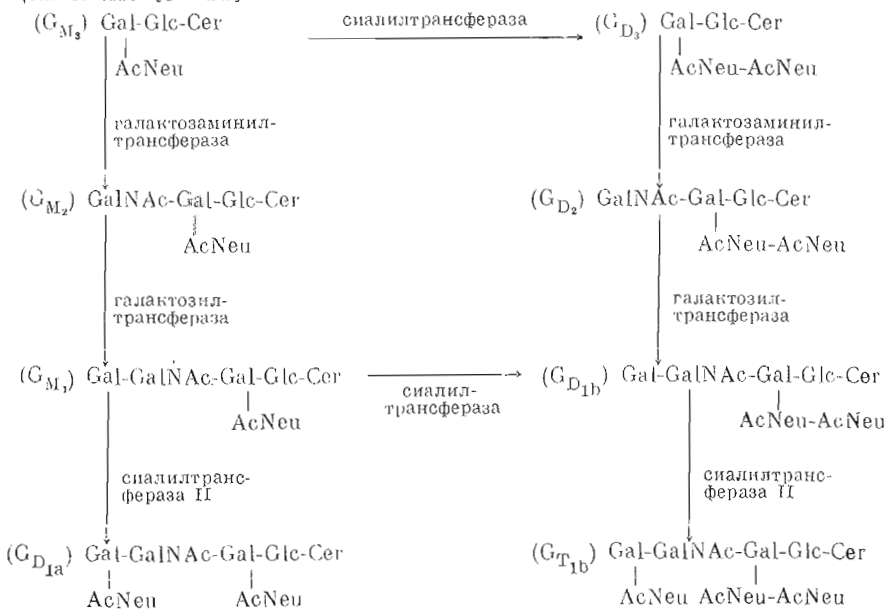


Рис. 2. ГЖХ продуктов частичного метилирования сахаров, присутствующих в ганглиозидах: *a* — дисиалозилганглиозид G_{D1b} гепатомы; *b* — моносиалозилганглиозид G_{M1} мозга; *c* — дисиалозилганглиозид G_{D1a} мозга. Метилгликозиды: 1 — 2,3,4,6-тетра-О-метилгалактозы, 2 и 2' — 2,3,6-три-О-метилглюкозы, 3 и 3' — 2,4,6-три-О-метилгалактозы

Формально результаты анализа метилированных сахаров не исключают структуру, в которой N-ацетилгалактозамин и N-ацетилнейраминовая кислота были бы присоединены к находящемуся в месте разветвления остатку галактозы соответственно в положении 3 и 4 или остаток N-ацетилгалактозамина имел бы заместитель не у C_3 . Однако такая структура представляется маловероятной и до сих пор не обнаружена в ганглиозидах млекопитающих. В то же время многочисленные данные [1, 2, 9] свидетельствуют о том, что в трансформированных клетках и опухолевых тканях отсутствуют какие-либо необычные ферментные системы биосинтеза ганглиозидов, которые могли бы способствовать образованию таких сиалогликолипидов.

Наличие в гепатоме 27 преобладающего в количественном отношении дисиалозилганглиозида G_{D1b} , отличающегося от дисиалозилганглиозида печени, связано с некоторыми особенностями биосинтеза ганглиозидов в гепатоме.

Известно, что ганглиозиды синтезируются в аппарате Гольджи по следующей схеме [9—11]:



Этот путь был подробно изучен при исследовании ганглиозидов мозга, однако многие из приведенных реакций характерны также и для печени крыс [11]. Десиалозилганглиозид $G_{D_{1b}}$ может синтезироваться как из ганглиозида G_{D_2} [12, 13], так и из моносиалозилганглиозида G_M [14]. Три-сиалозилганглиозид $G_{T_{1b}}$, присутствующий в печени крыс, синтезируется только из $G_{D_{1b}}$, но не из $G_{D_{1a}}$ [15]. Следовательно, в печени крыс ганглиозид $G_{D_{1b}}$ должен образовываться в качестве промежуточного продукта биосинтеза трисиалозилганглиозида. Однако скорость его превращения, видимо, столь велика, что он в этом органе не обнаруживается или накапливается лишь в незначительных количествах [4]. Накопление ганглиозида $G_{D_{1b}}$ в гепатоме 27 указывает на то, что в данной опухоли стадия превращения ганглиозида $G_{D_{1b}}$ в $G_{T_{1b}}$ блокирована, видимо, из-за низкой активности сиалилтрансферазы II. Пониженная активность этой гликозилтрансферазной системы, ведущая к повышению содержания ганглиозидов с более короткими олигосахаридными цепями, ранее отмечалась и в некоторых трансформированных клетках [1].

Экспериментальная часть

Для исследования использовали ткань гепатомы 27 (20—21-й день после перевивки опухоли). В качестве стандартов применяли ганглиозиды мозга крупного рогатого скота. Экстракцию и выделение суммарных ганглиозидов проводили как указано в работе [6].

Разделение суммы ганглиозидов на индивидуальные фракции осуществляли с помощью препаративной ТСХ; на стеклянную пластинку (13×18 см) с тонким слоем силикагеля КСК (150—200 меш, 6 г силикагеля, 0,3 г гипса, 15 мл воды) полосой наносили 25—30 мг ганглиозидов, которые дважды хроматографировали в системе хлороформ — метанол — 2,5 н. аммиак, 60 : 35 : 8 (система А). После высушивания разделенные фракции обнаруживали парами йода; зоны, соответствующие ганглиозидам, извлекали и элюировали смесью хлороформ — метанол — вода, 60 : 35 : 8 (система Б). Элюаты упаривали в вакууме и остаток растворяли в смеси хлороформ — метанол, 2 : 1. Идентификацию ганглиозидов проводили с помощью ТСХ в системе А, Б и *n*-пропанол — вода, 7 : 3; после высушивания ганглиозиды обнаруживали реагентом Свеннерхольма [16].

Жесткий кислотный гидролиз проводили путем нагревания в запаянной ампуле в течение 14 ч при 100° 0,1—0,5 мкмоль ганглиозида с 1 мл 2 н. HCl. Полученный гидролизат упаривали в вакууме досуха, к остатку добавляли 1 мл воды и 1 мл хлороформа и смесь энергично встряхивали. Водный слой содержал сахара, нижний слой — жирные кислоты и сфингозиновые основания. Содержание сфингозина, сиаловых кислот, глюкозы, галактозы и галактозамина определяли как описано ранее [6].

Десиалирование ганглиозидов проводили мягким кислотным гидролизом (0,1 мкмоль ганглиозида, 1 мл 0,1 н. HCl, 80° , 3,5 ч). Гидролизат упаривали досуха, остаток растворяли в 5 мл смеси хлороформ — метанол, 2 : 1, к полученному раствору добавляли 1 мл воды и смесь энергично встряхивали. Полученный после разделения водный слой, содержащий отщепившиеся сиаловые кислоты, пропускали через колонку ($0,6 \times 20$ см) с дауэксом 2×8 (в ацетатной форме), кислоты элюировали 1 М ацетатным буфером, pH 4,6, полученный элюат обессоливали пропусканием через колонку ($1,5 \times 12$ см) с катионитом КУ-2 (H⁺) и затем упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 0,1 мл воды и сиаловые кислоты идентифицировали с помощью ТСХ [6]. Оставшийся после разделения органический слой упаривали досуха, остаток растворяли в 0,1 мл хлороформа и хроматографировали в тонком слое силикагеля в системе хлороформ — метанол — вода, 6 : 4 : 1. Асиалозилганглиозиды обнаруживали антроновым реагентом [17].

Метилирование ганглиозидов проводили по методу Хакомори [18]. Полученный продукт метилирования растворяли в хлороформе, наносили на колонку (1,5 × 10 см) с силикагелем КСК (100—150 меш) и элюировали последовательно смесями хлороформ — метанол, 50 : 1, 50 : 2, 50 : 3 и 50 : 4 (по 25 мл каждой смеси). Продукт метилирования ганглиозидов вымывался двумя последними смесями. Объединенный элюат упаривали, растворяли в 3 мл раствора хлористого ацетила в метаноле (1 : 10 по объему) и раствор нагревали в течение 5 ч при 90° в запаянной ампуле [19]. После метаполиза реакционную смесь экстрагировали гексаном (дважды по 5 мл), нижний слой упаривали досуха в вакууме и остаток растворяли в 0,1 мл метанола. Полученные продукты частичного метилирования анализировали с помощью ТСХ в системе хлороформ — ацетон, 4 : 1 и ГЖХ (хроматограф «Руче-Uniscam», серия 104, модель 64, Англия) на колонке с карбоваксом 20М ТРА при 180°.

Ферментативное расщепление ганглиозидов с помощью нейраминидазы из *Vibrio cholerae* проводили в присутствии альбумина [20]. Ганглиозид (100 нмоль сиаловых кислот) растворяли в 0,1 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,5, добавляли 10 мкл 1%-ного раствора CaCl₂, 0,1 мл 0,15%-ного водного раствора альбумина и 25 мкл раствора нейраминидазы («Koch-Light Lab.», Англия, 500 МЕ/мл). Смесь инкубировали 24 ч при 37°. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ в системе А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brady R. O., Fishman P. H. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **355**, 121—148.
2. Bergelson L. D. (1972) in *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, vol. 13, p. 1—59, Pergamon Press, London.
3. Siddiqui B., Hakomori S. (1970) *Cancer Res.*, **30**, 2930—2936.
4. Cheema P., Yogeeswaran G., Morris H. P., Murray R. K. (1970) *FEBS Lett.*, **11**, 181—184.
5. Svennerholm L. (1963) *J. Neurochem.*, **10**, 613.
6. Дятловицкая Э. В., Новиков А. М., Бергельсон Л. Д. (1974) *Биохимия*, **39**, 552—556.
7. Дятловицкая Э. В., Новиков А. М., Горькова Н. П., Сорокина Н. Б., Бергельсон Л. Д. (1975) *Докл. АН СССР*, **220**, 969—974.
8. Drzeniek R. (1973) *Histochem. J.*, **5**, 271—290.
9. Fishman P. H. (1974) *Chem. and Phys. Lipids*, **13**, 305—326.
10. Roseman S. (1970) *Chem. and Phys. Lipids*, **5**, 270—297.
11. Keenan T. W., Morre D. J., Basu S. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 310—315.
12. Cumar F. A., Fishman P. H., Brady R. O. (1974) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5075—5084.
13. Cumar F. A., Tallian J. F., Brady R. O. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 2322—2327.
14. Arce A., Maccioni H. J., Caputto R. (1971) *Biochem. J.*, **121**, 483—493.
15. Mestrallet M. G., Cumar F. A., Caputto R. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1—7.
16. Svennerholm L. (1963) *Methods in Enzymol.*, **6**, 459—462.
17. Eichberg J., Whittaker V. P., Dawson R. M. C. (1964) *Biochem. J.*, **92**, 91—100.
18. Hakomori S. (1964) *J. Biochem.* **55**, 205—208.
19. McCluer R. H. (1970) *Chem. and Phys. Lipids*, **5**, 220—234.
20. Balasubramanian A. S. (1971) *Ind. J. Biochem. Biophys.*, **8**, 77—82.

Поступила в редакцию
24.IV.1975

STRUCTURE OF THE SIALOOLIGOSACCHARIDE MOIETY OF A DISIALOSYLGANGLIOSIDE FROM RAT HEPATOMA 27

DYATLOVITSKAYA E. V., NOVIKOV A. M., BERGELSON L. D.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

Among the gangliosides from rat hepatoma 27 a sialoglycolipid absent in the liver was detected. This ganglioside which along with hematoside constitutes the main sialolipid of the tumor was found to contain sphingosine bases, glucose, galactose, N-acetylgalactosamine and N-acetylneuraminic acid in a 1 : 1 : 2 : 1 : 2 ratio. From permethylation studies of the ganglioside and analysis of the products formed on its treatment with *Vibrio cholerae* neuraminidase the identity of the ganglioside with disialosylganglioside G_{D_{1b}} was deduced. Possible pathways of disialosylganglioside G_{D_{1b}} biosynthesis in rat hepatoma are discussed.