



УДК 577.115.5 + 593.94-147.62.088

© 1993 Р. Ф. Мензелев, Г. П. Смирнова*,
Н. В. Чекарева*, Е. Н. Звонкова**, Ю. М. Краснопольский,
В. И. Швец**

ГАНГЛИОЗИД G_{M3} ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ЛОШАДИ: СТРУКТУРА И ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК

Предприятие «Биолек», Харьков;

* *Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;*

** *Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова*

Показано, что ганглиозид G_{M3} из эритроцитов лошади способен усиливать пролиферацию фибробластов мыши. При определении структуры G_{M3} кроме классических методов химической деградации, ферментативного гидролиза нейраминидазой и хроматомасс-спектрометрии использованы ВЭЖХ 9-антриметилловых эфиров ганглиозидов для характеристики состава сфингозиновых оснований и масс-спектрометрия с ионизацией осколками деления ядер калифорния-252. Установлено, что в состав олигосахаридной части ганглиозида G_{M3} из эритроцитов лошади входит остаток N-гликолилнейраминовой кислоты, а керамид содержит в основном сфингозин 20 : 1 и жирную кислоту 24 : 0.

Ганглиозиды — гликофинголипиды клеточной поверхности; содержащие остатки сиаловой кислоты, участвуют как во взаимодействиях типа клетка — клетка, клетка — вирус, клетка — молекула, так и в функционировании плазматической мембраны [2]. Примером роли ганглиозидов в функционировании цитоплазматической мембраны может служить влияние ганглиозида G_{M3} на клеточный рост за счет подавления фосфорилирования остатков тирозина рецепторов фактора роста фибробластов (FGF) и эпидермального фактора роста (EGF) [3, 4].

Было показано, что добавление экзогенного G_{M3} ингибирует рост клеток ВНК, культивируемых в среде, содержащей единственный ростовой фактор — FGF [3]. Пролиферация клеток мыши 3Т3 подавлялась добавлением G_{M3} , что было связано с ингибированием фосфорилирования рецептора фактора роста из тромбоцитов (PDGF) [5]. Уменьшение пролиферативной активности клеток карциномы человека линии А 431, характеризующихся высоким содержанием рецепторов для EGF, также коррелировало со специфичным ингибированием фосфорилирования рецепторов при добавлении G_{M3} в среду культивирования [4, 6].

Наше изучение влияния ганглиозидов на процессы пролиферации клеток показало, что ганглиозид G_{M3} из эритроцитов лошади может усиливать пролиферацию гепатоцитов у крыс после частичной гепатэктомии и при индуцированном гепатите, а также и в первичной культуре [7]. Необходимо отметить, что

Использованы стандартные сокращения, рекомендованные для гликолипидов [1].

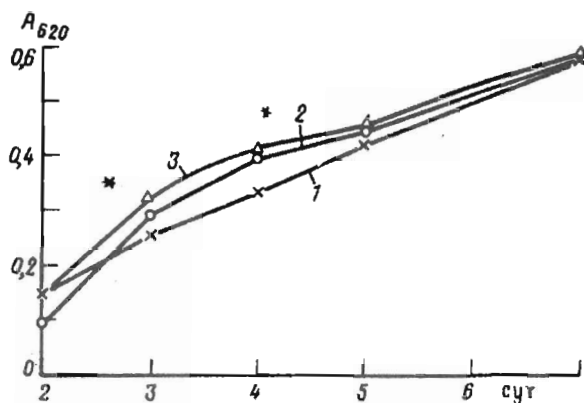


Рис. 1. Влияние ганглиозида G_{M3} из эритроцитов лошади (G_{M3} -NGc, 7,5 мкг/мл) на пролиферацию фибробластов при инкубировании клеток с ганглиозидом в течение 3 ч (2, вариант А) и при добавлении ганглиозидов в культуральную среду (3, вариант Б). Результаты представлены как средние значения двух независимых экспериментов по 8 точек на лунку. Звездочками отмечены точки, для которых различие с контролем (1) статистически достоверно ($p < 0,05$)

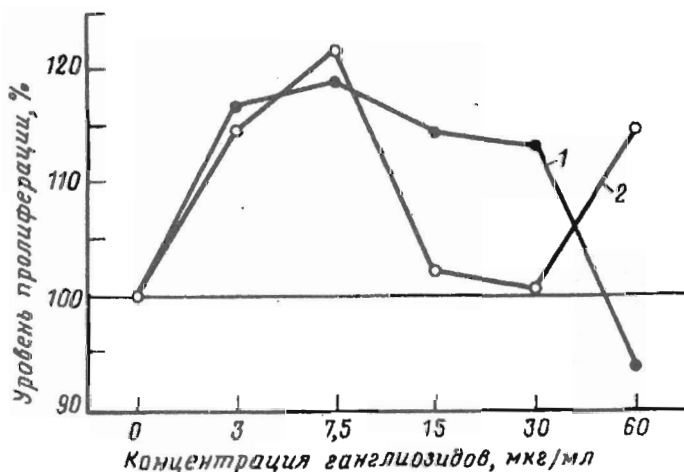


Рис. 2. Зависимость уровня пролиферации фибробластов (% от контроля) от концентрации ганглиозида G_{M3} -NGc на 4-е сут культивирования (1 — вариант А, 2 — вариант Б). Результаты представлены как средние значения двух независимых экспериментов по 8 лунок на точку

способность G_{M3} увеличивать включение [3H]тимидина в ДНК не зависела от типа остатка нейраминовой кислоты (NeuNAc или NeuNGc) [7].

Чтобы выяснить, влияет ли тип клеток на характер изменения пролиферации под действием ганглиозида G_{M3} из эритроцитов лошади, в настоящей работе вместо гепатоцитов, пролиферация которых, по всей видимости, индуцируется и контролируется ростовым фактором, отличным от EGF и FGF [8], мы использовали перевиваемую линию фибробластов мыши. Исследования проводили при двух вариантах инкубирования клеток с ганглиозидом: 3-часовое инкубирование клеток однодневной культуры (аналогично опытам с первичной культурой гепатоцитов, вариант А) и культивирование клеток в среде, содержащей ганглиозид (аналогично опытам других авторов, вариант Б). В экспериментах был использован G_{M3} с чистотой выше 99%, полученный с помощью ВЭЖХ. Нами было показано, что G_{M3} из эритроцитов лошади способен усиливать пролиферацию фибробластов при обоих типах инкубирования (рис. 1). Увеличение количества фибробластов было продемонстрировано нами при разных концентрациях ганглиозида, причем

наиболее эффективными были низкие концентрации, в частности 7,5 мкг/мл (рис. 2).

Таким образом, результаты, полученные нами ранее в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [7], и результаты этой работы позволяют считать, что ганглиозид G_{M3} из эритроцитов лошади способен усиливать пролиферацию клеток. Отличия наших данных от результатов экспериментов других авторов [4—6] побудили нас к детальному выяснению структуры ганглиозида G_{M3} , использованного в наших экспериментах.

Структура ганглиозида G_{M3}

В продуктах полного кислотного гидролиза нами обнаружены нейтральные моносахариды — глюкоза и галактоза. При частичном кислотном гидролизе отщеплялась сиаловая кислота и образовывался гликофинголипид, подвижность которого, по результатам ТСХ, совпадала с подвижностью стандарта лактозилцерамида. При гидролизе нейраминидазой из *Vibrio cholerae* также полностью отщеплялась сиаловая кислота и образовывался дигексозилцерамид. Сравнение подвижности при ТСХ сиаловой кислоты со стандартами N-ацетил- и N-гликолилнейраминовых кислот показало, что в составе G_{M3} присутствует остаток только N-гликолилнейраминовой кислоты. По данным количественного анализа, ганглиозид содержит остатки глюкозы, галактозы и сиаловой кислоты в соотношении 1 : 1 : 1.

Положение связей между остатками моносахаридов и последовательность моносахаридов в ганглиозиде определяли с помощью метода метилирования. При ГЖХ продуктов кислотного метанолиза перметилированного ганглиозида был обнаружен только один пик производного сиаловой кислоты, соответствующий стандарту метилового эфира метилкетозида 4, 7, 8, 9-тетра-O-метил-N-метил-N-(O-метилгликолил)нейраминовой кислоты. Следовательно, в ганглиозиде остаток N-гликолилнейраминовой кислоты занимает концевое положение. Хроматомасс-спектрометрический анализ частично метилированных ацетатов полиолов, полученных после гидролиза перметилированного ганглиозида, восстановления $NaBH_4$ и последующего ацетилирования, показал присутствие 1, 3, 5-три-O-ацетил-2, 4, 6-три-O-метилдальциты и 1, 4, 5-три-O-ацетил-2, 3, 6-три-O-метилсорбита. Следовательно, в ганглиозиде остаток глюкозы замещен в положении 4, а остаток галактозы — в положении 3.

При ГЖХ частично метилированных ацетатов полиолов, образующихся из перметилированного дигексозилцерамида, полученного после гидролиза ганглиозида нейраминидазой, обнаружены пики 1, 5-ди-O-ацетил-2, 3, 4, 6-тетра-O-метилдальциты и 1, 4, 5-три-O-ацетил-2, 3, 6-три-O-метилсорбита.

Из результатов метилирования следует, что олигосахаридная часть ганглиозида линейна, в начале цепи находится остаток глюкозы, замещенный по O4 остатком галактозы, который гликозилирован по O3 остатком N-гликолилнейраминовой кислоты.

Для определения конфигурации гликозидных связей нейтральных сахаров дигексозилцерамид, полученный при частичном кислотном гидролизе, ацетилировали и окисляли хромовым ангидридом. Глюкоза и галактоза, по данным ГЖХ, окислились практически полностью. Следовательно, присутствует только β -гликозидная связь. Согласно результатам гидролиза нейраминидазой, сиаловая кислота присоединена α -кетозидной связью.

Таким образом, структура олигосахаридной части исходного ганглиозида полностью соответствует структуре ганглиозида G_{M3} -NGc.

Для определения строения липидной части ганглиозида был проведен кислотный метанолиз. В продуктах метанолиза с помощью ТСХ были обнаружены метиловые эфиры незамещенных высших жирных кислот и сфингозин. Состав жирных кислот был проанализирован с помощью хроматомасс-спектрометрии.

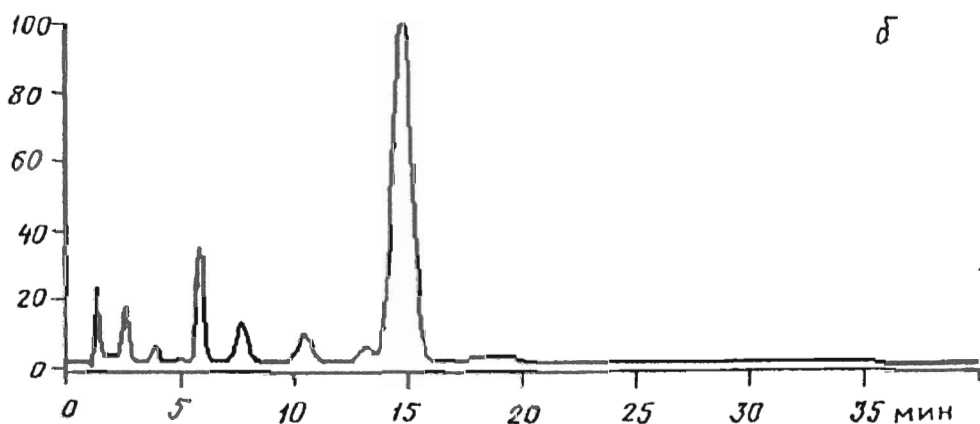
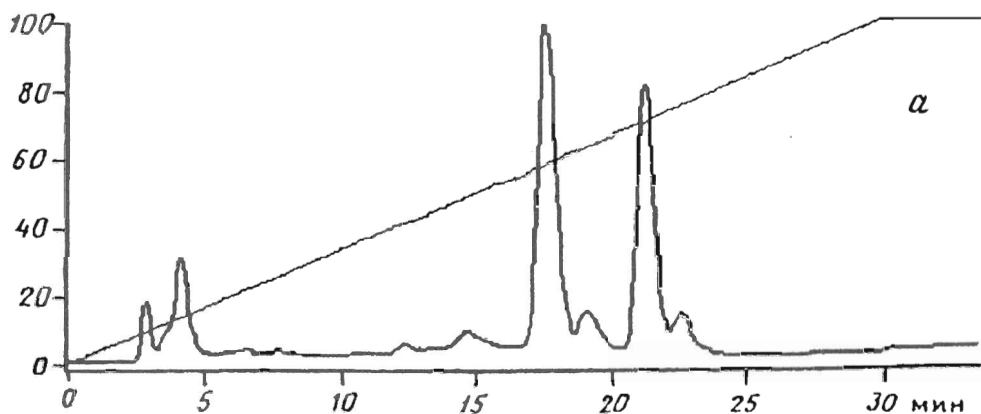


Рис. 3. ВЭЖХ 9-антрилметилловых эфиров $\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4\text{SphNAc}$ (а) и $\text{II}^3\text{NeuAc-LacSphNAc}$ (б) при разделении на колонке Lichrosorb RP-18. Условия проведения хроматографии см. таблицу. Флуоресценция максимального пика принята за 100%

Основная кислота в ганглиозиде G_{M3} — 24 : 0 (69%), минорные — 16 : 0, 18 : 0, 20 : 0, 22 : 0, 23 : 0 и 26 : 0. Содержание ни одной из них не превышает 7%.

Для характеристики сфингозиновых оснований мы использовали ВЭЖХ на обращенной фазе 9-антрилметилловых эфиров (АМЕ) ганглиозидов, полученных действием на ганглиозиды 9-антрилдиазометана. Предварительно нами была исследована возможность использования данного подхода на стандартном ганглиозиде G_{M1} из мозга быка. Было установлено, что состав молекулярных видов G_{M1} полностью соответствует литературным данным [9]. Анализ тем же методом производного ганглиозида G_{M1} , в котором остатки жирных кислот были заменены нами на ацетильные группы ($\text{II}^3\text{NeuAc-GgOse}_4\text{SphNAc}$), показал присутствие двух основных пиков (49 и 40%) и двух минорных (5 и 6%) (см. рис. 3а), что хорошо коррелировало с результатами анализа молекулярных видов и данными литературы [9].

Подобный подход был использован нами для анализа сфингозиновых оснований в G_{M3} из эритроцитов лошади. При анализе АМЕ- $\text{II}^3\text{NeuAc-LacSphNAc}$ (рис. 3б) детектируется один главный пик (69%) и несколько минорных (наибольший из них не превышал 8%). При масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления ядер калифорния-252 был обнаружен ион с массовым числом 1308. Из этих

ВЭЖХ 9-антрилметиловых эфиров ганглиозидов на колонке Lichrosorb RP18

Ганглиозид	Размер колонки, мм	Градиентная программа	Подвижная фаза	
			A	B
H ³ NeuAc-CgOse ₄ SphNAc	3 × 150	35 мин 0—100% B	MeO—MeCN—H ₂ O, 56 : 24 : 20	MeOH—MeCN, 70 : 30
	3 × 150	20 мин 80—100% B 15 мин 100% B	MeOH—MeCN—H ₂ O, 35 : 15 : 50	MeOH—MeCN, 70 : 30
H ³ NeuAc-LacSphNAc	3 × 300	—	MeOH—MeCN—H ₂ O, 56 : 24 : 20	

данных и результатов анализа жирных кислот следует, что главным длинноцепочечным основанием является сфингозин 20 : 1.

Таким образом, из результатов наших экспериментов на культуре фибробластов мышцы и результатов установления структуры следует, что ганглиозид G_{M3} -NGc, в состав церамида которого входят в основном сфингозин 20 : 1 и кислота 24 : 0, способен усиливать пролиферацию клеток.

Экспериментальная часть

В работе были использованы в качестве стандартов: G_{M3} , G_{M1} , лактозилцерамид, N-ацетил- и N-гликолилнейраминовые кислоты (Sigma), нейраминидаза из *Vibrio cholerae* (Sigma). Органические растворители, за исключением ацетонитрила (Lichrosolv, Merck), были перегнаны перед использованием; вода очищена на установке Milli Q (Millipore).

9-Антрилдиазометан получали окислением гидразона 9-антрилкарбальдегида (Союзреактив) оксидом ртути согласно [10].

Ганглиозид G_{M3} -NGc из эритроцитов лошади получали как описано [11] и хроматографировали на колонке с силикагелем 60 (40—63 мкм, Merck). 1 г фракции моносиалоганглиозидов, растворенный в 5 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1), наносили на колонку (3×30 см) и элюировали смесью хлороформ — метанол — вода (70 : 30 : 5). Фракции (по 15 мл), содержащие G_{M3} , объединяли, упаривали до объема 10—20 мл, ганглиозид осаждали ацетоном, отфильтровывали и высушивали при высоком вакууме (10 Па). По данным аналитической ВЭЖХ, чистота полученного вещества составила 96—97%.

IP^3 NeuAc-GgOse₄SphNAc и IP^3 NeuAc-LacSphNAc. Ганглиозид G_{M1} и G_{M3} подвергали щелочному гидролизу (0,8 М КОН в MeOH, 100° С, 20 ч) [12]. Реакционную смесь нейтрализовали HCl, разбавляли в 20 раз водой и выделяли дезацетилованный лизоганглиозид твердофазной экстракцией на патроне C16 (БиоХимМак, Россия; вещество элюировали метанолом) и ацетиловали действием As_2O_3 в смеси MeOH — 4% $NaHCO_3$ (1 : 1).

Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на приборе фирмы Gilson с инжектором модели 7 125 фирмы Rheodine. Ганглиозиды анализировали на колонке Диасорб 130 NH_2 (4×150 мм, 6 мкм) (БиоХимМак) с предколонкой Диасорб 130 NH_2 (4×50 мм, 6 мкм) при элюировании смесью метанол — 2-пропанол—ацетонитрил — 40 мМ фосфатный буфер, pH 5,6 (168 : 96 : 23 : 20) с расходом 1,5 мл/мин и детектированием при 215 нм.

Препаративный вариант осуществляли при введении 10 мг вещества в 0,8 мл смеси 2-пропанол — вода (1 : 2) на колонку Zorbax NH_2 (21,4×250 мм, 8 мкм; Du Pont) с элюированием смесью метанол — 2-пропанол — ацетонитрил — 30 мМ фосфатный буфер, pH 5,6 (168 : 84 : 24 : 35). Скорость элюции 20 мл/мин. Детектирование осуществляли при 215 нм [13]. По данным аналитической ВЭЖХ, чистота препарата G_{M3} была не менее 99%.

Для получения АМЕ-производных к раствору ганглиозидов в метаноле (0,15 мкмоль), пропущенному через колонку (4×30 мм) со смолой Amberlite IR-120 в H^+ -форме, прибавляли метанольный раствор 9-антрилдиазометана (5 мкмоль). Через 30 мин к реакционной смеси добавляли уксусную кислоту (10 мкл) и наносили на колонку (4×40 мм) с силикагелем 60 (40—63 мкм). Колонку промывали хлороформом (5 мл), и АМЕ-производные элюировали метанолом (2 мл).

АМЕ-производные ганглиозидов анализировали с помощью ВЭЖХ на колонке Lichrosorb RP 18 (5 мкм) с предколонкой (4×4 мм, 5 мкм) Lichrosorb RP 18 (детектирование флуоресценции при $\lambda_{возб}$ 210—410 нм и $\lambda_{исп}$ 430—470 нм). Условия хроматографии представлены в таблице.

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 (Merck). Использовали системы растворителей: для гликолипидов $CHCl_3$ — CH_3OH — 0,2% $CaCl_2$, 60 : 35 : 8 (обнаружение — резорциновым [14] и орциновым [15] реактивами); для сиаловых

кислот — $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH}$ — вода — 2 М NH_4OH , 6 : 2 : 1 (обнаружение — резорциновым реактивом); для сфингозиновых оснований CHCl_3 — CH_3OH — 2 М NH_4OH , 40 : 10 : 1 (обнаружение — 0,2% раствором нингидрина в ацетоне); для метиловых эфиров высших жирных кислот — CHCl_3 (обнаружение — раствором бромтимолового синего и серной кислотой).

ГЖХ, хроматомасс-спектрометрию, количественные определения сиаловых кислот и гексоз, полный и частичный кислотный гидролиз, полный кислотный метанолиз проводили аналогично описанному ранее [16]. Метилирование ганглиозидов осуществляли по методу [17], окисление хромовым ангидридом — по методу [18], ферментативный гидролиз — по методу [19].

Для масс-спектрометрических исследований ганглиозида (20 мкл, 100 мкг/мл) в смеси хлороформ — метанол (2 : 1) наносили на нитроцеллюлозную подложку и высушивали на воздухе. Подложку готовили методом электрораспыления раствора нитроцеллюлозы в ацетоне на установке «Электроспрей» (ПО «Электрон», Сумы, Украина). Спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре МСБХ с ионизацией осколками деления ядер калифорния-252 (ПО «Электрон», Сумы, Украина). Время накопления — 130 000 стартов, ускоряющее напряжение 20 кВ.

Клеточные культуры. Ганглиозид G_{M3} , очищенный с помощью препаративной HPLC, обессоливали на колонке (3×5 см) с Lichroprep RP18 (Merck), упаривали, высушивали при высоком вакууме и растворяли в воде до концентрации 1,5 мг/мл. После фильтрации через фильтр 0,22 мкм (Millipore) количественно определяли содержание ганглиозида по нейраминовой кислоте [20] и стерильно добавляли к инкубационной среде для получения растворов с необходимой концентрацией (3, 7,5, 15, 30 и 60 мкг/мл).

Фибробласты мыши перевиваемой линии L-41 высевали в количестве $5 \cdot 10^3$ клеток на лунку в 96-луночную панель для клеточных культур (Flow) в ростовой среде (среда 199 (Flow), содержащая 10% фетальной сыворотки (Flow) и 2000 ед/мл пенициллина) (вариант А). Через 24 ч культивирования при 37° С в атмосфере CO_2 среду сливали, клетки промывали средой 199 с пенициллином и добавляли растворы ганглиозидов в среде 199. Инкубирование с ганглиозидом проводили при 37° С в атмосфере CO_2 в течение 4 ч, раствор ганглиозидов удаляли, клетки промывали средой 199 с пенициллином и добавляли новую ростовую среду. Клетки культивировали 7 сут при 37° С в атмосфере CO_2 .

Пролиферативную активность клеток определяли путем измерения концентрации белка по методу Брэдфорда [21], для чего клетки промывали раствором Хэнкса (3×200 мкл на лунку), гидролизовали 1 М NaOH (90 мкл на лунку, 37° С, 1 ч), добавляли 9 М H_2SO_4 (40 мкл на лунку) и краситель (100 мкл на лунку). Оптическую плотность при 620 нм измеряли на приборе Multiscan MCC 340 (Labsystem) с учетом фонового поглощения лунок, не содержащих клеток.

В варианте культивирования клеток в ганглиозидсодержащей среде (вариант Б) все операции проводили аналогично, за исключением того, что через 24 ч ростовую среду заменяли на среду с ганглиозидом в необходимых концентрациях и продолжали культивирование.

Авторы приносят благодарность А. Ю. Нокелю (Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова) за помощь при получении масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of Lipids//Eur. J. Biochem. 1977. V. 79. № 1. P. 11—21.
2. Nakomori S.//Ann. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 733—764.
3. Bremer E., Nakomori S.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1982. V. 108. № 1. P. 711—718.
4. Bremer E., Schlessinger J., Nakomori S.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 5. P. 2434—2440.

5. Bremer E., Hakomori S., Bowen-Pope D. F., Raines E., Ross R.//J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 10. P. 6818—6825.
6. Song W., Vacca M. F., Welti R., Rintoul D. A.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 1. P. 10174—10181.
7. Menzeleev R. F., Bozhkov A. I., Volkova N. A., Zvonkova E. N., Krasnopolsky Yu. M., Shvets V. I.//Biochem. and Biophys. Res. Commus. In Press.
8. Nakamura T., Nawa K., Ichihara A.//Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1984. V. 122. № 3. P. 1450—1459.
9. Sonnino S., Asquotti D., Riboni L., Giuliani A., Kirschner G., Tettamanti G.//Chem. and Phys. Lipids. 1986. V. 42. № 1. P. 3—26.
10. Nakaya T., Tomomoto T., Imoto M.//Bull. Chem. Soc. Jap. 1967. V. 40. № 4. P. 691—692.
11. Miyazaki K., Okamura N., Kishimoto Y., Lee Y. C.//Biochem. J. 1986. V. 235. № 2. P. 756—761.
12. Schwarzmann G., Sandhoff K.//Meth. Enzymol. 1987. V. 138. P. 319—341.
13. Menzeleev R. F., Krasnopolsky Yu. M., Zvonkova E. N., Shvets V. I.//J. Chromatogr. In Press.
14. Svennerholm L.//Biochim. et biophys. acta. 1957. V. 24. № 3. P. 604—611.
15. Vaskovsky V. E., Kostelsky E. Y., Svetashev V. I., Zhukova I. G., Smirnova G. P.//Compar. Biochem. and Physiol. 1970. V. 34. № 1. P. 163—177.
16. Чекарева Н. В., Смирнова Г. П., Кочетков Н. К.//Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 3. С. 387—397.
17. Larson G., Karlson H., Hansson G. C., Pimlott W.//Carbohydr. Res. 1987. V. 161. № 2. P. 281—290.
18. Laine R. A., Renkonen O.//J. Lipid Res. 1975. V. 16. № 2. P. 102—106.
19. Ishizuka I., Kloppenburg M., Wiegandt H.//Biochim et biophys. acta. 1970. V. 210. № 2. P. 299—305.
20. Svennerholm L.//Acta chim. scand. 1958. V. 12. № 3. P. 547—554.
21. Практическая химия белка: Пер. с англ./Ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. С. 297—298.

Поступила в редакцию
16.II.1993

R. F. Menzeleev, G. P. Smirnova, N. V. Chekareva*,
E. N. Zvonkova**, Yu. M. Krasnopolsky, V. I. Shvets***

**GANGLIOSIDE G_{M3} FROM EQUINE ERYTHROCYTES:
THE STRUCTURE AND EFFECT ON CELL PROLIFERATION**

«Biolek» Company, Kharkov;

** N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow;*

*** M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

An increase of the mouse fibroblast proliferation by ganglioside G_{M3} from equine erythrocytes is described. The structure of G_{M3} has been established on the basis of chemical methods, enzymatic degradation, GC-MS, as well as plasma desorption mass spectrometry and HPLC of 9-anthrylmethyl esters of gangliosides to characterize the long-chain base composition. The oligosaccharide moiety includes an N-glycolylneuraminic acid residue, whereas the main components of the lipid moiety are 20 : 1 sphingosine and 24 : 0 fatty acids.