



УДК 542.91 + 547.455 + 577.15.154

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНА САЛМОНЕЛЛ

3. СВОЙСТВА АНАЛОГОВ ГУАНОЗИНДИФОСФАТМАННОЗЫ,
СОДЕРЖАЩИХ ДЕЗОКСИЗВЕНО ПРИ С-3 И С-6 ОСТАТКА ГЕКСОЗЫ,
КАК СУБСТРАТОВ МАННОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ *SALMONELLA ANATUM*

Шибав В. Н., Дружинина Т. Н., Кочетков Н. К.,
Кучар Ш., Бауэр Ш.

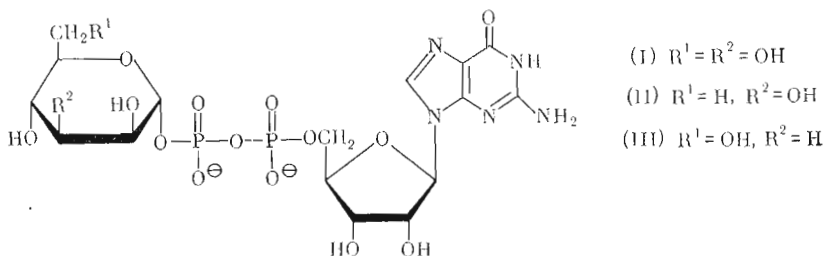
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва;

Институт химии Словацкой Академии наук, Братислава

Аналоги гуанозиндифосфатманнозы, у которых OH-3" или OH-6" заменены на атом водорода, способны заменять природный нуклеотид — сахар в реакции, катализируемой маннозилтрансферазой из *Salmonella anatum*, участвующей в биосинтезе О-специфического полисахарида. 6"-Дезоксипроизводное является более эффективным субстратом реакции, чем 3"-дезоксипроизводное.

В предыдущем сообщении серии [1] были приведены первые данные о специфичности маннозилтрансферазы из *Salmonella anatum*, участвующей в биосинтезе О-специфического полисахарида, к структуре гетероциклического ядра GDPMan (I), природного донора гликозильного остатка для этой реакции. В настоящей работе мы сообщаем первые результаты, полученные при исследовании влияния модификации структуры переносимого остатка гексозы в GDPMan на субстратные свойства нуклеотидсахара.

С этой целью было исследовано взаимодействие с ферментом двух аналогов GDPMan, в которых остаток маннозы заменен на остаток 6-дезоксид-маннозы (*D*-рамнозы) (II) и 3-дезоксид-*D*-арабино-гексозы (III).

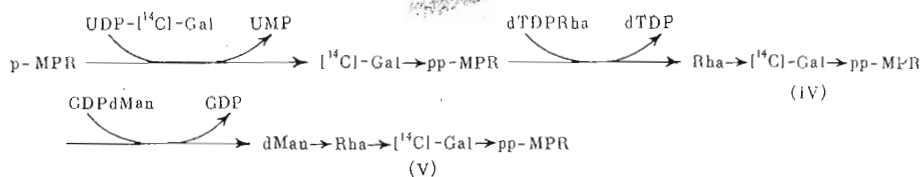


Синтез аналогов GDPMan (II) и (III) был осуществлен недавно в Институте химии Словацкой Академии наук [2]. Соединение (II) было также син-

Сокращения: UDPGlc — уридин-5'-(α -*D*-глюкопиранозилпирофосфат), GDPd Man — соединения (II) и (III), dMan — остаток 6-дезоксид-*D*-маннопиранозы или 3-дезоксид-*D*-арабино-гексопиранозы, прочие сокращения — см. ссылку [1].

тезировано Барбером [3]. Сообщалось о его синтезе из GDPMan под действием ферментов из грамотрицательного микроорганизма [4] и высших растений [5].

Исследование способности аналогов GDPMan, содержащих остатки дезоксисахаров, служить субстратами маннозилтрансферазы было проведено по методике, описанной в предыдущем сообщении [1]. При взаимодействии препарата солюбилизованных гликозилтрансфераз из мембран *S. anatum* A₁ [6] с морапренилфосфатом [6, 7], UDP-[¹⁴C]-Gal, dTDP Rha и GDPdMan в системе происходят следующие реакции:



Образующаяся смесь полипренолфосфосахаров (IV) и (V) была обработкой фенолом и фосфомоноэстеразой [8] переведена в смесь дисахарида и трисахарида, которая анализировалась далее с помощью хроматографии на бумаге. Как видно из рисунка, хроматографическая система А, которая была использована ранее для анализа смеси Rha → Gal и Man → Rha → Gal, дает хорошие результаты и при анализе продуктов реакции, содержащих дезоксианалоги маннозы.

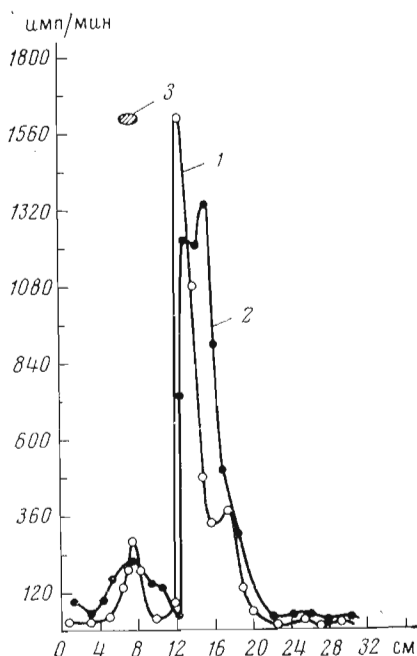
Для подтверждения трисахаридной природы продукта, содержавшегося в зоне с малой хроматографической подвижностью, были проведены кислотный гидролиз этого продукта и восстановление полученных гексоз действием [³H]-NaBH₄. Результаты радиохроматографического анализа полученных полиолов, представленные в табл. 1, полностью соответствуют ожидаемым результатам для трисахаридов, содержащих остатки дезоксианалогов маннозы. В случае продукта, полученного из соединения (II), практически вся радиоактивность сосредоточена в зонах, отвечающих по подвижности дульциту и рамниту, и отсутствует в зоне, отвечающей манниту. Аналогичная картина наблюдается при реакции с соединением (III), однако при рехроматографии зоны, отвечающей рамниту, удастся обнаружить присутствие двух радиоактивных полиолов, отвечающих по подвижности продуктам восстановления рамнозы и 3-дезоксид-арабино-гексозы.

Таблица 1

Анализ полиолов, полученных после гидролиза трисахаридных продуктов маннозилтрансферазной реакции

Полиолы	R _{Gal} в системе А	Отношение радиоактивности в зонах дульцита и рамнита
Полиолы, полученные из продукта ферментативной реакции с нуклеотидсахаром:		
(I)	0,98; 1,30; 1,73	1,0:1,0
(II)	0,98; 1,73	1,0:2,0
(III)	0,98; 1,75 *	1,0:1,8
Заведомые образцы полиолов:		
дульцит	0,95	
маннит	1,27	
рамнит	1,73	

* При рехроматографии в системе В получены две зоны с приблизительно равной радиоактивностью R_{Gal} 1,73 и 1,80.



Хроматографическое разделение олигосахаридов, полученных при расщеплении продуктов маннозилтрансферазной реакции, образовавшихся в присутствии 50 μ моль соединения (II) (1) и соединения (III) (2). 3 — подвижность трисахарида

Хроматографическое разделение олигосахаридов, полученных при расщеплении продуктов маннозилтрансферазной реакции, образовавшихся в присутствии 50 μ моль соединения (II) (1) и соединения (III) (2). 3 — подвижность трисахарида

Соединение (III) — субстрат средней эффективности для маннозилтрансферазы. Непропорциональное возрастание скорости реакции с этим аналогом при увеличении его концентрации позволяет предполагать, что

Таким образом, оба исследованных аналога GDPMan обладают способностью в некоторой степени заменять природный субстрат. Оценка эффективности аналогов GDPMan как субстратов маннозилтрансферазной реакции проводилась как описано в предыдущем сообщении [1]. Мерой скорости ферментативной реакции служило количество образовавшегося радиоактивного трисахарида, необходимая для расчетов величина K_m для GDPMan была определена в предыдущей работе [1], а величина V для GDPMan рассчитывалась по результатам опыта с этим субстратом, проведенного в идентичных условиях (табл. 2).

В соответствии с предложенной классификацией аналогов нуклеотидсахаров по их эффективности как субстратов [1] соединение (II) должно быть оценено как хороший субстрат для исследуемого фермента, и, следовательно, взаимодействия с участием гидроксильной группы при С-6 остатка гексозы не имеют существенного значения для улавливания маннозилтрансферазой *S. anatum*. Ранее была отмечена возможность биосинтеза (II) с использованием растительной пиррофосфорилазы GDPMan [3], которая, таким образом, также

может использовать субстрат, лишенный гидроксильной группы при С-6.

Таблица 2

Свойства аналогов GDPMan как субстратов маннозилтрансферазы из *S. anatum*

Измеряемая величина	Соединение	
	(II)	(III)
Радиоактивность зоны трисахарида, (имп/мин) $\cdot 10^{-3}$, при концентрации аналога		
0,5 мМ	0,82	0,34
2,5 мМ	1,81	2,30
Относительные скорости v^*		
при $\sigma=10$	0,29	0,12
при $\sigma=50$	0,65	0,82
Оценка K_m	23	—
Оценка эффективности аналога (см. табл. 3 в статье [1])		
по величине v ($\sigma=10$)	4	8
по величине K_m^r	4	

* В параллельном опыте с GDPMan (0,5 мМ) радиоактивность зоны трисахарида составила 2560 имп/мин, что соответствует $V=2,8 \cdot 10^3$ имп/мин за время инкубации.

в этом случае кинетика реакции носит сложный характер и не подчиняется уравнению Михаэлиса.

В проводившихся ранее исследованиях специфичности взаимодействия ферментов с уридиндифосфатглюкозой (обзор, см. [9]) было отмечено особо важное значение гидроксильной группы при С-3 остатка гексозы для узнавания ферментами нормального субстрата. В частности, для аналога UDPGlc, в котором OH-3" была заменена на атом водорода, не было обнаружено реакции с сахарозосинтетазой из проростков гороха, арбутинсинтетазой из пшеничных отрубей и гликогенсинтетазой из печени крыс [10]. В случае реакций, катализируемых гликогенсинтетазой [11] и трегалозофосфатсинтетазой дрожжей [12], этот аналог был малоэффективным субстратом и обладал наихудшими субстратными свойствами по сравнению с другими аналогами UDPGlc, содержащими остаток дезоксисахаров. Результаты настоящей работы показывают, что при взаимодействии GDPMan с маннозилтрансферазой очень сильного ухудшения субстратных свойств при замене OH-3" на атом водорода не наблюдается и, следовательно, взаимодействие маннозилтрансферазы с нуклеотидсахаром подчиняется иным закономерностям.

Экспериментальная часть

Основные методы исследования описаны в предыдущих работах [1, 6, 8]. Для хроматографии на бумаге использованы системы: А — *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3, Б — *n*-бутанол — пиридин — вода, 10 : 3 : 3.

Взаимодействие аналогов GDPMan с маннозилтрансферазой. Инкубировали 30 мин при 37° смесь, содержащую в объеме 0,1 мл 80 нмоль морапренилфосфата [7], 10 мкл метанола, 15 мкл 0,5% раствора Твина-85, 5 мкл 1 М Трис-ацетатного буфера (рН 8,5), 1 мкмоль MgCl₂, 25 нмоль UDP-[¹⁴C]-Gal (50 мКи/ммоль), 25 нмоль dTDPPha, препарат растворимых трансфераз *S. anatium* A₁ [6] и количества GDPMan или ее аналогов, указанные в табл. 2. Реакцию останавливали добавлением 2 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1), проводили экстракцию полипренолфосфосахаров, как описано в статье [6], и их расщепление последовательным действием фенола и фосфомоноэстеразы, как описано в статье [8]. Типичная картина хроматографического разделения показана на рисунке, результаты сведены в табл. 2.

Определение моносахаридного состава продуктов маннозилтрансферазной реакции осуществляли в соответствии с работой [1]. Результаты приведены в табл. 1.

Авторы глубоко благодарны Ю. Ю. Кусову за полезное обсуждение, С. Ш. Рожновой (ЦНИИЭ Минздрава СССР) за выращивание микроорганизма, Л. Л. Данилову за предоставление морапренилфосфата и В. А. Петренко за предоставление dTDPPha.]

ЛИТЕРАТУРА

1. Шибяев В. Н., Дружинина Т. Н., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К. (1978) Биоорган. химия, 4, 257—268.
2. Kuřar S., Bauer S. (1977) Collect. Czech. Chem. Commun., 42, in press.
3. Barder G. A. (1969) Biochemistry, 8, 3692—3695.
4. Markovitz A. (1964) J. Biol. Chem., 239, 2091—2098.
5. Barber G. A. (1968) Biochem. et biophys. acta, 165, 68—75.
6. Шибяев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. (1978) Биоорган. химия, 4, 47—56.
7. Вергунова Г. И., Глуходей И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И., Шашков А. С., Шибяев В. Н. (1977) Биоорган. химия, 3, 1484—1493.
8. Шибяев В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Дружинина Т. Н., Кочетков Н. К. (1978) Биоорган. химия, 4, 249—256.
9. Кочетков Н. К., Шибяев В. Н. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1169—1189.

10. Габриэлян Н. Д., Лавина Е. Б., Кусов Ю. Ю., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. (1971) Докл. АН СССР, 199, 962—964.
11. Zemek J., Kučar S., Bauer Š. (1973) Eur. J. Biochem., 40, 195—199.
12. Zemek J., Strmen J., Kučar Š., Bauer Š. (1976) Eur. J. Biochem., 64, 283—286.

Поступила в редакцию
19.VII.1977

SPECIFICITY OF THE ENZYMES OF SALMONELLA O-ANTIGEN BIOSYNTHESIS.
3. THE PROPERTIES OF GUANOSINE DIPHOSPHATE MANNOSE ANALOGS
CONTAINING DEOXY UNIT AT C-3 OR C-6 OF HEXOSYL RESIDUE AS
SUBSTRATES OF MANNOSYLTRANSFERASE FROM *SALMONELLA ANATUM*

SHIBAEV V. N., DRUZHININA T. N., KOCHETKOV N. K.,
KUČAR Š., BAUER Š.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Chemistry,
Slovak Academy of Sciences, Bratislava*

The analogs of guanosine diphosphate mannose which contain hydrogen atom instead of OH-3" or OH-6" were found to be capable of substituting the natural sugar nucleotide in the reaction with mannosyltransferase from *Salmonella anatum*, the enzyme which participates in the O-antigen biosynthesis. The 6"-deoxy derivative is more efficient substrate of the reaction than the 3"-deoxy analog.
