



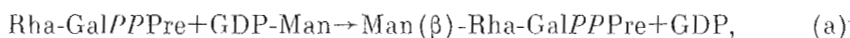
УДК 579.222.7/124.5:579.842.14:577.152.24/142

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МАННОЗИЛТРАНСФЕРАЗ ИЗ САЛМОНЕЛЛ  
СЕРОГРУПП E<sub>1</sub> И В К МОДИФИКАЦИИ  
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОГО ОСНОВАНИЯ ДОНОРА \****Дружинина Т. Н., Гоголашвили Л. М., Елисева Г. И.,  
Шибачев В. И.**Институт органической химии им. П. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

Исследована способность ряда синтетических нуклеозиддифосфатманноз с различными гетероциклическими основаниями заменять GDP-Man в реакции ферментативного маннозиллирования при сборке повторяющихся звеньев O-антигенов *Salmonella anatum* и *S. typhimurium*. Показано, что для эффективности субстрата существенно присутствие атома кислорода при C6 остатка пурина, меньшее значение имеет группировка H<sub>2</sub>N - C2 - N1 - H гетероциклического ядра. Обнаружена высокая эффективность UDP-Man в реакциях маннозиллирования.

Разнообразные полисахаридные структуры O-специфических антигенов салмонелл создаются в микробной клетке в результате согласованного действия мембраносвязанных ферментов — гликозилтрансфераз и полимеразы. По общепринятым представлениям [2], структура углеводной цепи диктуется специфичностью гликозилтрансфераз к строению доноров и акцепторов моносахаридных остатков и типу образуемой гликозидной связи.

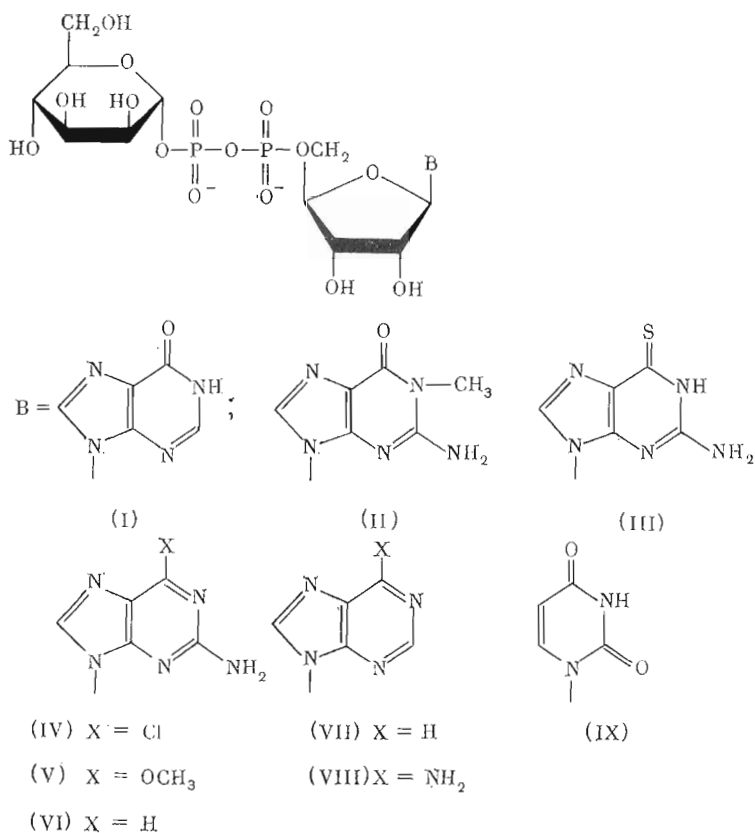
Изучая субстратную (донорную) специфичность β-маннозилтрансферазы из *Salmonella anatum*, катализирующей реакцию



мы показали ранее, что донорами остатка маннозы могут служить некоторые аналоги GDP-Man с модифицированным гетероциклическим основанием [3]. Для получения дополнительной информации о допустимых модификациях гетероциклического основания при сохранении донорных свойств мы исследовали ранее изученные аналоги GDP-Man — производные гипозина (I) и 1-N-метилгуанозина (II) — в реакции, катализируемой маннозилтрансферазой из *S. typhimurium*, которая протекает аналогично реакции (a), но с сохранением конфигурации у C1 переносимого остатка маннозы, т. е. с образованием α-маннозилной связи. Далее были изучены субстратные свойства для маннозилтрансфераз из *S. anatum* и *S. typhimurium* вновь полученного ряда аналогов GDP-Man [4], включающего в себя соединения с различными заместителями при C6 — производные 6-тиогуанозина (III), 2-амино-6-хлорпуририбозиды (IV), 2-амино-6-метоксипуририбозиды (V), 2-аминопуририбозиды (VI) и, наконец, несколько аналогов с более значительными модификациями гетероциклического ядра — производные пуририбозиды (VII), аденозина (VIII) и уридина (IX).

Для проведения реакции маннозиллирования препарат «растворимых гликозилтрансфераз» [5] инкубировали с синтетическим акцептором [<sup>14</sup>C]Gal(α)PPMrg, dTDR-Rha, и донором остатка маннозы. При этом под действием маннозилтрансферазы, присутствующей в ферментном препарате, образуется дисахаридное производное Rha-[<sup>14</sup>C]Gal(α)PPMrg, которое служит субстратом маннозилтрансферазы. Продукт маннозиллирования после мягкого кислотного гидролиза анализировали хроматографией на

\* Сообщение 8 серии «Специфичность ферментов биосинтеза O-антигена салмонелл». Сообщение 7 см. [1].



бумаге. О протекании реакции судили по содержанию радиоактивности в зоне трисахарида. Все исследуемые соединения вводили в ферментативную реакцию при концентрации 2,5 мМ, что приблизительно в 50 раз превышает величину  $K_m$  для GDP-Man [3]. Эффективность субстратов оценивали по отношению радиоактивности в зоне трисахарида, полученного при реакции с аналогом, к радиоактивности в этой зоне, полученной в контрольной пробе с GDP-Man. Результаты сведены в таблицу, в которой аналоги GDP-Man расположены в порядке убывания их субстратной эффективности для фермента из *S. anatum*.\*

Можно видеть, что по своим субстратным свойствам исследованные аналоги GDP-Man четко разбиваются на три группы: хорошие доноры остатка маннозы (IX), (I), (V), субстраты средней эффективности (II), (III), (VIII) и (VI) и малоэффективные или неэффективные субстраты (IV) и (VII). Такие же группы получаются и при исследовании аналогов GDP-Man в качестве субстратов маннозилтрансферазы из *S. typhimurium*, и, таким образом, обе маннозилтрансферазы, различающиеся по стереохимии образуемой гликозидной связи, обладают близкими требованиями к структуре гуанозинового ядра нуклеотида сахара. Наблюдаются лишь небольшие различия между двумя ферментами по эффективности субстратных свойств аналогов GDP-Man внутри каждой из этих групп.

Из полученных результатов очевидно, что узнавание ферментами гуанозинового ядра GDP-Man зависит от присутствия в пуриновом кольце функциональных групп: производное пуририбозида (VII) — малоэффективный субстрат для реакции с ферментом из *S. anatum*; в случае фермента из *S. typhimurium* образования продукта вообще не удалось обнаружить.

\* Классификация аналогов по эффективности проводилась, как описано нами ранее [3], по величине относительной скорости реакции ( $v$ ): для «хороших» субстратов величина  $v$  составляет 0,25–0,66, для «средних» — 0,10–0,24, для малоэффективных и неэффективных — 0,01–0,099.

**Относительная скорость реакции маннозилрования \* с аналогами GDP-Man, содержащими модифицированные остатки нуклеозида**

Соединение	Остаток нуклеозида	Источник фермента	
		<i>S. anatum</i>	<i>S. typhimurium</i>
(IX)	Уридин	0,39	0,46
(I)	Инозин	0,38	0,48
(V)	2-Амино-6-метоксипуририбозид	0,33	0,54
(II)	1-N-Метилгуанозин	0,15	0,18
(III)	6-Тiogуанозин	0,11	0,25
(VIII)	Аденозин	0,11	0,14
(VI)	2-Аминопуририбозид	0,10	0,19
(IV)	2-Амино-6-хлорпуририбозид	0,08	0,09
(VII)	Пуририбозид	0,05	<0,01

\* Относительную скорость реакции маннозилрования определяли как отношение радиоактивности в зоне трисахарида при хроматографии на бумаге пробы с аналогом к радиоактивности такой же зоны для пробы с GDP-Man.

Присутствие NH<sub>2</sub>-группы при С2 ядра, по-видимому, не слишком важно для фермент-субстратного взаимодействия, как это видно из хороших субстратных свойств производного инозина (I). Мало существенно, очевидно, и наличие амидного атома водорода при N1, так как производное 2-амино-6-метоксипуририбозид (V) — хороший субстрат, и даже в случае 1-N-метилгуанозинового производного (II) заметные субстратные свойства сохраняются. Что касается заместителя при С6, то для получения эффективных субстратов (сравнимых с соединением (V)) существенно присутствие атома кислорода. По-видимому, он выступает как акцептор при образовании водородной связи, так как при переходе к соединениям, в которых с С6 связан элемент III периода (сера в (III) и особенно хлор в (IV)), происходит резкое ухудшение субстратных свойств по сравнению с кислородсодержащими аналогами.

Тем не менее субстраты средней эффективности можно получить и при отсутствии С6-О-фрагмента в гетероциклическом ядре. Интересным образом введение NH<sub>2</sub>-группы по С2 или С6 пурина приводит к субстратам примерно одинаковой эффективности — (VI) и (VIII).

Неожиданный результат проведенного исследования — обнаружение хороших субстратных свойств у производного уридина (IX), очень сильно отличающегося по пространственной структуре от GDP-Man — природного субстрата маннозилтрансфераз. Этот результат, по-видимому, свидетельствует о значительной «гибкости» центра связывания гетероциклического ядра в ферменте, который при наличии благоприятных для взаимодействия функциональных групп способен «подстраиваться» под гетероциклическое ядро иной природы. В нормальных условиях биосинтеза полисахаридов использование субстрата (IX) невозможно, так как такой нуклеотидсахар не образуется ферментными системами микроорганизмов. Двойственная специфичность к структуре гетероциклического основания донора известна для ряда гликозилтрансфераз [6].

### Экспериментальная часть

Получение культуры *S. anatum* и *S. typhimurium*, препаратов растворимых гликозилтрансфераз и определение радиоактивных веществ на бумаге проводили согласно [5]. dTDP-Rha получали по методике [7], синтез 1-мораренлилпирофосфата [<sup>14</sup>C]галактозы и аналогов GDP-Man также описан ранее [3, 4, 8]. Хроматографию радиоактивных олигосахаридов осуществляли на бумаге FN-15 (Filtrak, ГДР) в системе *n*-бутанол — пиридин — вода, 6:4:3 (A). В работе использовали препарат GDP-Man (Calbiochem, США).

Для проведения ферментативной реакции маннозилрования синтетический акцептор [<sup>14</sup>C]Gal(α)PPMrg (2 нмоль) солибилизировали в 15 мкл 0,5% твина-85, добавляли 5 мкл 1 М трис-ацетатного буфера (pH 8,5), 10 мкл 0,1 М MgCl<sub>2</sub>, 25 нмоль

dGDP-Rha, 50 нмоль GDP-Man или ее аналога и 20 мкг белка «растворимых гликозилтрансфераз» (общий объем 0,1 мл). Смесь инкубировали 30 мин при 25° С, реакцию останавливали подкислением до pH 2,0 и смесь гидролизовали 15 мин при 100° С. Гидролизат анализировали хроматографией в системе А. Подвижность трисахаридного продукта  $R_{\text{сат}}$  0,45.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Калинин Н. А., Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Шibaев В. И., Кочетков Н. К. Биоорганич. химия, 1985, т. 11, № 2, с. 219–226.
2. Шibaев В. И. Успехи биол. химии, 1982, т. 23, с. 61–101.
3. Шibaев В. И., Дружинина Т. Н., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 2, с. 257–268.
4. Шibaев В. И., Елисеева Г. И. Биоорганич. химия, 1983, т. 9, № 5, с. 684–687.
5. Шibaев В. И., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 1, с. 47–56.
6. Kochetkov N. K., Shibaev V. N. Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem., 1973, v. 28, p. 307–399.
7. Шibaев В. И., Уткина И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1778–1781.
8. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шibaев В. И., Кочетков Н. К. Биоорганич. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 109–113.

Поступила в редакцию  
4.II.1986

### THE SENSITIVITY OF MANNOSYL TRANSFERASES FROM *SALMONELLA* SEROGROUPS E<sub>1</sub> AND B TO MODIFICATION OF THE GLYCOSYL DONOR HETEROCYCLIC BASE

DRUZHININA T. N., GOGILASHVILI L. M., ELISEEVA G. I., SHIBAEV V. N.

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

A series of synthetic nucleoside diphosphate mannoses with different heterocyclic bases were tested as GDP-Man analogues in enzymatic mannosylation during assembly of O-antigen repeating units of *Salmonella anatum* and *Salmonella typhimurium*. The substrate efficiency was found to depend strongly on oxygen atom presence at C6 of the purine residue, the H<sub>2</sub>N–C2–N1–H grouping of the heterocyclic nucleus being less important. UDP-Man proved to be an efficient substrate for the mannosylation reactions.