



УДК 542.91 + 547.455 + 577.15.154

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНА САЛМОНЕЛЛ

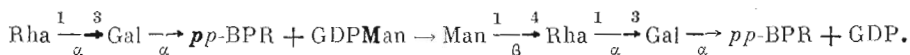
2. ИНОЗИН-, 1-N-МЕТИЛГУАНОЗИН-
И 8-БРОМГУАНОЗИНДИФОСФАТМАННОЗА:
СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КАК СУБСТРАТОВ
МАННОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ *SALMONELLA ANATUM*

Шубаев В. Н., Дружинина Т. Н., Елисеева Г. И.,
Кочетков Н. К.

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

Осуществлен синтез трех аналогов гуанозиндифосфатманнозы (I) с модифицированным гетероциклическим ядром — производных инозина (II), 1-N-метилгуанозина (III) и 8-бромгуанозина (IV) и исследована способность этих соединений служить субстратами для маннозилтрансферазы *Salmonella anatum*, участвующей в биосинтезе O-специфического полисахарида. Предложена система классификации аналогов нуклеотидсахаров по их эффективности как субстратов. Соединение (II) оказалось очень хорошим субстратом реакции, соединение (III) — хорошим субстратом; следовательно, группировка =C(NH₂)-NH— гуанинового ядра, способная служить донором водорода при образовании водородных связей, не существенна для взаимодействия соединения (I) с ферментом. Соединение (IV) — субстрат средней эффективности. Обсуждены возможные причины понижения эффективности субстрата при модификации гуанинового ядра по C⁸.

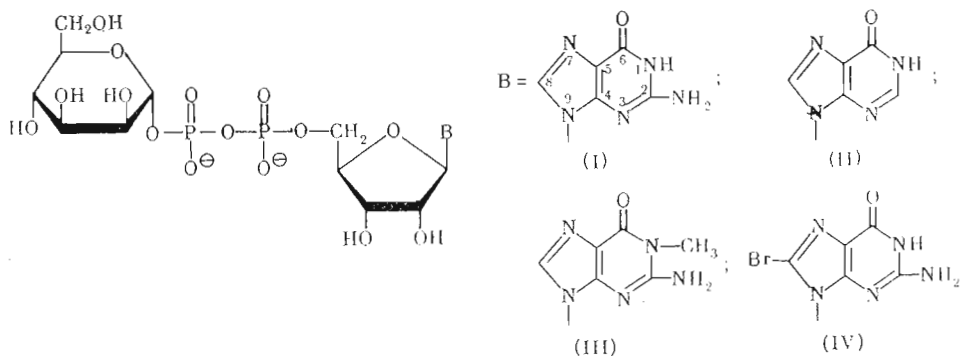
Как отмечалось в первой работе данной серии [1], исследование взаимодействия гликозилтрансфераз, участвующих в биосинтезе O-антигена салмонелл, с аналогами нуклеотидсахаров — доноров гликозильных остатков представляет значительный интерес для выяснения общих закономерностей фермент-субстратного узнавания в гликозилтрансферазах. Целью настоящей работы было получение первых данных о специфичности к структуре нуклеотидсахара маннозилтрансферазы из *Salmonella anatum*, фермента, катализирующего реакцию



Природным донором гликозильного остатка в этой реакции служит GDP-Man (I). В настоящем сообщении мы описываем синтез трех аналогов

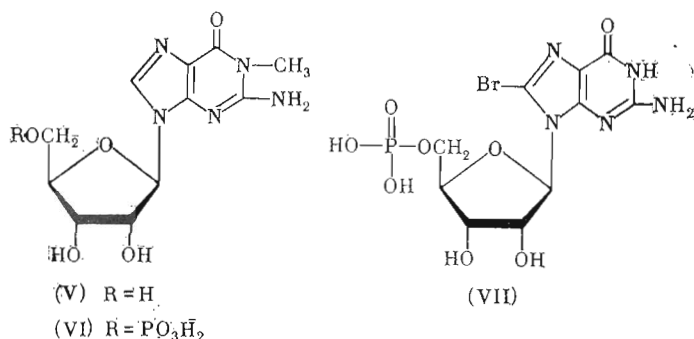
Сокращения: GDPMan — гуанозин-5'-(α -D-маннопиранозилпирофосфат), dTDP Rha — тимидин-5'-(β -L-рамнопиранозилпирофосфат), UDPGal — уридин-5'-(α -D-галактопиранозилпирофосфат), Man, Rha, Gal — остатки β -D-маннопиранозы, α -L-рамнопиранозы и α -D-галактопиранозы. BPR и MPR — остатки бактериального полиглицерола и морапrenoла, C₅₅-полиненасыщенных спиртов, углеродная цепь которых построена из остатков изопрена (обсуждение структуры см. в статье [2]), p и pp — остатки фосфорной и пирофосфорной кислот.

GDPMan, модифицированных по C², N¹ или C⁸ гетероциклического ядра, а именно производных инозина (II), 1-N-метилгуанозина (III) и 8-бромгуанозина (IV) и их свойства как субстратов маннозилтрансферазы.



Соединение (II) было ранее получено ферментативным методом с помощью пирозифосфорилазы GDPMan [3—5], имеются также краткие упоминания о его химическом синтезе [4, 6]. Мы получали этот нуклеотидсахар с помощью фосфоморфолидного метода синтеза [7] с использованием модификации, разработанной ранее в нашей лаборатории [8], проводя реакцию при избытке инозин-5'-фосфоморфолида.

Исходным веществом для получения нуклеотидсахара (III) служил 1-N-метилгуанозин (V), который был получен метилированием гуанозина действием иодистого метила в присутствии K₂CO₃, как это описано Робинсом с сотр. [9]. Поскольку в более поздней работе [10] была показана неоднозначность метилирования в этих условиях, мы провели хроматографическое разделение продуктов реакции. Выделенный нуклеозид (V) был подвергнут фосфорилированию действием хлорокси фосфора в триэтилфосфате; полученный 1-N-метилгуанозин-5'-фосфат (VI) был далее превращен в нуклеотидсахар (III) с помощью пирозифосфатного метода [11] в описанном нами ранее варианте [12].



Исходным веществом для получения нуклеотидсахара (IV) служил 8-бромгуанозин-5'-фосфат (VII), полученный bromированием гуанозин-5'-фосфата. Реакция проводилась в условиях, описанных Икехарой с сотр. [13] (см. также [14]). Для очистки соединения (VII) мы использовали хроматографию на сефадексе G-10 и препаративный электрофорез на бумаге. Синтез нуклеотидсахара (IV) из фосфата (VII) был проведен с помощью пирозифосфатного метода, как описано для соединения (III).

Полученные нуклеотидсахара (II) — (IV) (табл. 1) были очищены с помощью ионообменной хроматографии или комбинации электрофореза и хроматографии на бумаге. Во всех случаях УФ-спектры полученных

Таблица 1

Свойства аналогов GDPMan

| Измеряемая величина | Соединение | | |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|
| | (II) | (III) | (IV) |
| УФ-спектры в 0,1 н. HCl | | | |
| $\lambda_{\text{макс}}$ (нм) | 249 | 258, 280 (плечо) | 263,5 |
| A_{280}/A_{260} | 0,22 | 0,71 | 0,74 |
| A_{250}/A_{260} | 1,58 | 0,82 | 0,79 |
| УФ-спектры в 0,1 н. КОН | | | |
| $\lambda_{\text{макс}}$ (нм) | 254 | 254, 270 (плечо) | 275 |
| A_{280}/A_{260} | 0,20 | 0,63 | 1,02 |
| A_{250}/A_{260} | 1,02 | 0,98 | 0,69 |
| Отношение нуклеозид — кислотолабильный фос- фат — общий фосфат — манноза | 1,00:0,91:1,82:0,98 | 1,00:1,06:1,80:1,16 | 1,00:0,98:2,25:1,03 |
| Хроматография на бумаге R_f (R_{GMP}) в системе А | 0,34 (1,50) | 0,37 (1,65) | 0,35 (1,54) |
| $E_{\text{инкрат}}$ | 1,17 | 0,99 | 0,94 |

Таблица 2

Зависимость скорости маннозилтрансферазной реакции *
от концентрации GDPMan

| № точки | Концентрация GDPMan, мМ | $V \cdot 10^{-4}$ | | Кинетические пара- метры (вычислены по точкам 1—7) |
|---------|----------------------------|-------------------|--|---|
| | | эксперимент | вычислено по ки- нетическим пара- метрам | |
| 1 | 0,017 | 0,91 | 0,89±0,07 | K_m (мМ) = 0,051±0,005 $V \cdot 10^{-4}$ = 3,59±0,08 |
| 2 | 0,042 | 1,65 | 1,62±0,09 | |
| 3 | 0,084 | 2,10 | 2,23±0,09 | |
| 4 | 0,167 | 2,88 | 2,75±0,09 | |
| 5 | 0,246 | 2,95 | 2,97±0,08 | |
| 6 | 0,333 | 3,12 | 3,11±0,08 | |
| 7 | 0,500 | 3,22 | 3,26±0,08 | |
| 8 | 0,667 | 3,80 | 3,33±0,08 | |

* Скорость выражена как включение радиоактивности (имп/мин) в органический слой после инкубации в течение 15 мин.

Таблица 3

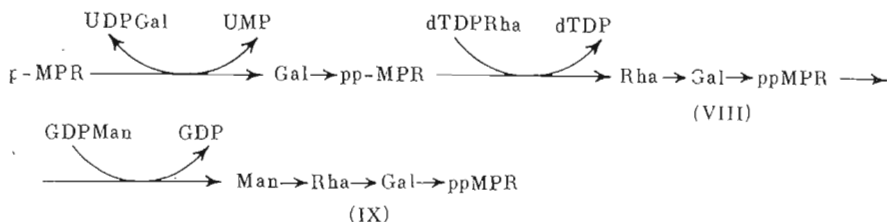
Критерии для оценки эффективности аналогов нуклеотидсахаров
как субстратов гликозилтрансфераз

| Оценка эффективности | | Границы классов | |
|--------------------------------|----------|------------------------------------|------------------------|
| словесная | балльная | по величине v ($\sigma=10$) | по величине K_m^r |
| Очень хороший субстрат | 5 | $\geq 0,67$ | ≤ 5 |
| Хороший субстрат | 4 | 0,25—0,66 | 5,1—30 |
| Субстрат средней эффективности | 3 | 0,10—0,24 | 31—100 |
| Малоэффективный субстрат | 2 | 0,01—0,099 | 101—1000 |
| Неэффективен как субстрат | 1 | $< 0,01$ | > 1000 |

соединений соответствовали УФ-спектрам нуклеозид-5'-фосфатов, отношение компонентов нуклеозид — кислотолабильный фосфат — общий фосфат — манноза было близко к теоретическому, что подтверждало структуру нуклеотидсахаров.

В качестве источника маннозилтрансферазы в данной работе был использован препарат гликозилтрансфераз, полученный из мембран *S. anatum* AI после обработки нейонным детергентом [15], в качестве

липидного акцептора гликозильных остатков — фосфат морапренола, биологически активный аналог бактериального полипренилфосфата [2, 15]. Использованный препарат фермента содержит помимо маннозилтрансферазы другие гликозилтрансферазы, участвующие в биосинтезе О-специфического полисахарида, и способен катализировать превращения:



После ряда предварительных опытов мы нашли, что наиболее воспроизводимые результаты при исследовании маннозилтрансферазной реакции, т. е. превращения (VIII) \rightarrow (IX), получаются, если полипренилпирофосфатдисахарид (VIII) не добавляется в систему извне, а образуется непосредственно в инкубационной смеси, т. е. при инкубации препарата фермента с фосфатом морапренола, UDPGal, dTDP Rha и GDPMan. При использовании GDP-[^{14}C]-Man количество образовавшегося производного (IX) можно измерить, определяя включение [^{14}C]-Man в липидную фракцию, извлекаемую органическим растворителем.

При таком контроле за протеканием реакции и применении эквимольных количеств нуклеотидсахаров количество образующегося соединения (IX) пропорционально времени инкубации в течение первых 15 мин реакции, за исключением короткого индукционного периода (рисунок). Зависимость скорости реакции от концентрации GDPMan (табл. 2) показывает, что при концентрациях субстрата ниже 0,5 мМ (точки 1—7) кинетика реакции хорошо подчиняется уравнению Михаэлиса с кажущейся константой $\sim 0,05$ мМ. При более высоких концентрациях GDPMan наблюдается увеличение скорости процесса (см. точку 8 в табл. 2; аналогичные результаты получены в других сериях опытов). Это явление может быть связано с активацией под действием GDPMan маннозилтрансферазы или гликозилтрансфераз, участвующих в биосинтезе производного (VIII); детальное исследование этого эффекта представляется целесообразным провести с использованием очищенных гликозилтрансфераз.

При интерпретации результатов, полученных при исследовании связи химической структуры аналогов нуклеотидсахаров и их эффективности как субстратов ферментативных реакций, существенное значение имеют критерии, по которым производится оценка эффективности, и мы кратко обсудим этот вопрос перед рассмотрением результатов, полученных при исследовании взаимодействия аналогов GDPMan с маннозилтрансферазой.

В этой работе и последующих работах данной серии мы будем пользоваться понятиями «относительная концентрация аналога» (σ), «относительная скорость реакции» (v), «относительная величина константы Михаэлиса» (K_m^r) и «относительная максимальная скорость» (V^r), которые определяются по формулам:

$$\begin{aligned}
 \sigma &= \frac{\text{концентрация аналога}}{K_m \text{ природного субстрата}}; \\
 v &= \frac{\text{скорость реакции с аналогом}}{V \text{ для природного субстрата}}; \\
 K_m^r &= \frac{K_m \text{ для аналога}}{K_m \text{ для природного субстрата}}; \\
 V^r &= \frac{V \text{ для аналога}}{V \text{ для природного субстрата}}.
 \end{aligned}$$

При первичной оценке эффективности аналогов как субстратов гликозилтрансфераз, имеющей своей целью качественное суждение о значении той или иной функциональной группы в молекуле субстрата для его взаимодействия с ферментом, мы будем использовать пятибалльную систему оценки эффективности. Критерии для отнесения аналогов к той или иной группе приведены в табл. 3. Основным критерием при такой оценке эффективности служит величина относительной скорости реакции при концентрации аналога, в 10 раз превосходящей величину K_m для природного субстрата (v при $\sigma = 10$).

Проведя исследование при двух концентрациях аналога, можно получить оценку величины K_m^r . Нетрудно показать, что, если кинетика реакции с аналогом подчиняется уравнению Михаэлиса, то

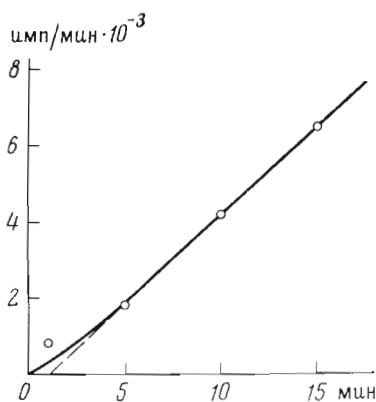
$$K_m^r = \sigma_2 \frac{a-1}{b-a}; \quad (x)$$

где $a = v_2/v_1$ и $b = \sigma_2/\sigma_1$; σ_1 и σ_2 — относительные концентрации аналога, v_1 и v_2 — соответствующие относительные скорости реакции. Величину K_m^r также можно использовать при оценке эффективности аналогов как субстратов. При этом границы оценок по величине K_m^r , приведенные в табл. 3, соответствуют границам оценок по величине v , если величина $V^r \simeq 1$, т. е. максимальная скорость реакции в присутствии аналога субстрата не отличается заметно от максимальной скорости для природного субстрата.

Имея оценку эффективности аналога по величинам v и K_m^r , можно сделать и дополнительные выводы о взаимодействии аналога с исследуемым ферментом. Если обе оценки эффективности совпадают, то очевидно, что изменение эффективности аналога при изменении структуры связано в основном с изменением величины K_m , отражающим различие в связывании природного субстрата и аналога с ферментом. Если оценки эффективности по величинам v и K_m^r не совпадают, это означает, что при переходе от природного субстрата к аналогу изменение структуры вызывает не только изменение K_m , но и значительное изменение величины V , т. е. скорости одной из стадий процесса. Наконец, если при расчете по формуле (x) получаются бессмысленные значения K_m^r (например, $K_m^r < 0$ при $a > b$), то вероятно, что кинетика реакции с аналогом при исследованных значениях концентрации не подчиняется уравнению Михаэлиса.

Сформулированные выводы носят предварительный характер и при необходимости могут быть проверены детальным исследованием кинетики реакции с аналогом субстрата. Тем не менее предварительная оценка эффективности аналогов как субстратов ферментативной реакции по приведенным выше критериям представляется весьма полезной, особенно для тех случаев, когда детальное кинетическое исследование связано со значительными экспериментальными затруднениями.

При исследовании взаимодействия аналогов GDPMan с маннозилтрансферазой *S. anatum* были использованы методы, разработанные нами ранее [1, 15]. Единственным радиоактивным нуклеотидсахаром в инкубационной смеси была UDP-[¹⁴C]-Gal, образующаяся смесь полипренолфоссахаров была переведена обработкой водным фенолом и фермента



Временная зависимость протекания маннозилтрансферазной реакции

Таблица 4

Свойства аналогов GDPMan как субстратов маннозилтрансферазы
S. anatum

| Измеряемая величина | Соединение | | |
|---|------------|-------|------|
| | (II) | (III) | (IV) |
| Радиоактивность зоны трисахарида (имп/мин) · 10 ⁻³ при концентрации аналога: | | | |
| 0,5 мМ | 3,6 | 1,5 | 1,0 |
| 2,5 мМ | 4,0 | 3,7 | 3,25 |
| Относительные скорости v^* | | | |
| при $\sigma=10$ | 0,67 | 0,28 | 0,18 |
| при $\sigma=50$ | 0,74 | 0,69 | 0,60 |
| Оценка K_m^r | 1,3 | 25 | 70 |
| Балльная оценка эффективности (см. табл. 3) | | | |
| по величине v ($\sigma=10$) | 5 | 4 | 3 |
| по величине K_m^r | 5 | 4 | 3 |

* В аналогичных условиях при опыте с GDPMan (0,5 мМ) радиоактивность зоны трисахарида составила 4900 имп/мин, что соответствует $V=5,4 \cdot 10^3$ имп/мин за время инкубации.

тивным дефосфорилированием [4] в смесь дисахарида Rha → [¹⁴C]-Gal и трисахарида Man → Rha → [¹⁴C]-Gal; последние были разделены с помощью хроматографии на бумаге. Полученная картина качественно аналогична ранее описанной (см. рис. 6 в статье [15]), хотя относительные количества дисахарида и трисахарида в разных опытах заметно различаются.

Все исследованные аналоги GDPMan оказались способными служить субстратами для маннозилтрансферазы. Для подтверждения трисахаридной природы продукта реакции он был подвергнут полному кислотному гидролизу, а образующиеся моносахариды восстановлены действием [³H]-NaBH₄. Анализ образовавшейся смеси радиоактивных полиолов показал во всех случаях присутствие дульцита, маннита и сорбита.

О степени протекания маннозилтрансферазной реакции с аналогами GDPMan судили по содержанию радиоактивного вещества в зоне трисахарида. Были проведены опыты при концентрациях аналогов 0,5 и 2,5 мМ; необходимая для расчетов величина V для GDPMan определялась в параллельном опыте. Полученные результаты сведены в табл. 4. Можно видеть, что эффективность изученных аналогов GDPMan как субстратов маннозилтрансферазной реакции несколько различна; во всех случаях изменение эффективности связано, видимо, с изменением величины K_m .

Наиболее эффективным субстратом реакции является производное инозина (II), которое по приведенной выше классификации должно быть оценено как «очень хороший субстрат». Этот результат показывает, что взаимодействия с участием NH₂-группы при С² пуринового ядра не имеют существенного значения при узнавании GDPMan соответствующей маннозилтрансферазой. Это явление, по-видимому, достаточно широко распространено для ферментов, взаимодействующих с GDPMan, так как ранее была обнаружена способность соединения (II) заменять GDPMan в реакциях с маннозилтрансферазами, участвующими в биосинтезе маннана *Hansenula holstii* [16], и пиррофосфорилазами GDPMan из разных источников [3—6]. В то же время дегидрогеназа GDPMan из *Arthrobacter* не способна использовать вещество (II) в качестве субстрата [17].

Хорошим субстратом маннозилтрансферазы из *S. anatum* является производное 1-N-метилгуанозина (III). Таким образом, взаимодействия с участием NH-группы гетероциклического ядра несущественны при взаимодействии этого фермента с природным субстратом. Более того, введение заместителя по N¹ не вызывает значительных стерических

препятствий при образовании фермент-субстратного комплекса. Влияние модификации по N¹ на способность производных гуанозина взаимодействовать с различными ферментами мало изучено; показана лишь способность 1-N-метилгуанозин-5'-пирофосфата выступать в качестве субстрата для полинуклеотидфосфорилазы *Escherichia coli* [18].

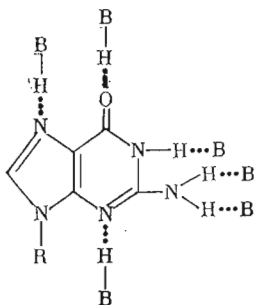
Производное 8-бромгуанозина (IV) — субстрат средней эффективности для исследуемой маннозилтрансферазы. Кажется маловероятным, чтобы группировка C⁸—Н принимала участие во взаимодействии с какими-либо специфическими группами фермента; вероятнее всего, замещение по этому центру влияет на взаимодействие аналога субстрата с ферментом косвенным образом.

Хорошо известно, что в кристаллах 8-бромгуанозин существует в виде *син*-конформера [19, 20], в то время как для большинства природных нуклеозидов и нуклеотидов характерна *анти*-конформация. На основании исследования спектров кругового дихроизма высказано предположение о преобладании *син*-конформеров и в растворах производных 8-бромгуанозина [21—23]. Гипотеза о неспособности производных 8-бромгуанозина принимать *анти*-конформацию, необходимую для нормального взаимодействия с ферментами, была выдвинута для объяснения неспособности 5'-пирофосфата этого соединения вступать в реакцию с полинуклеотидфосфорилазой [24, 25], а его 5'-трифосфата — с репликазой фага Q ϕ [26] и РНК-полимеразой *E. coli* [26, 27].

Вместе с тем были продемонстрированы субстратные свойства 8-бромгуанозин-2',3'-циклофосфата для рибонуклеазы T1 [28, 29] и ряда родственных рибонуклеаз [29], способность 5'-пирофосфата [30] и 5'-трифосфата 8-бромгуанозина [31] заменять соответствующие производные гуанозина при взаимодействии с компонентами бесклеточной системы синтеза белка, активация протеинкиназы, зависящей от гуанозин-3',5'-циклофосфата, под действием 8-бромгуанозин-3',5'-циклофосфата [32]. Таким образом, присутствие объемистого заместителя при C⁸ в действительности вряд ли приводит к полному исключению конформера, соответствующего нормальному конформеру производного гуанозина, а скорее всего, к некоторому сдвигу конформационного равновесия.

Вероятно, такой сдвиг конформационного равновесия в остатке нуклеозида является причиной некоторого ухудшения субстратных свойств соединения (IV) по сравнению с G β DPMan и в случае исследуемой маннозилтрансферазы, хотя нельзя исключить и существования стерических препятствий для образования фермент-субстратного комплекса за счет присутствия объемистого заместителя при C⁸ пуринового ядра или изменения электронной плотности на N⁷ под влиянием заместителя у C⁸ как первичной причины ухудшения субстратных свойств.

Имеющиеся данные о нуклеотид-белковых взаимодействиях (обзор — см. [33]) показывают, что во многих случаях первостепенную роль в обеспечении специфичности процесса играют водородные связи с участием функциональных групп белка и нуклеинового основания. В случае производных гуанозина существует возможность целого ряда таких взаимодействий, как это схематически показано ниже:



Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют исключить существенное значение при взаимодействии GDPMan с маннозилтрансферазой *S. anatum* тех водородных связей, при образовании которых гетероциклическое ядро выступает как донор атома водорода, т. е. водородных связей с участием NH₂- и NH-групп. Синтез аналогов GDPMan, необходимых для выяснения значения центров — потенциальных акцепторов атома водорода, т. е. атомов C⁶=O, N⁷ и N⁸, и их исследование как субстратов будут описаны в последующих сообщениях этой серии.

Экспериментальная часть

Для хроматографии на бумаге использованы системы: А — этанол — 0,5 М ацетат аммония, рН 7,5 (5 : 2); Б — *n*-бутанол — вода — СН₃СООН (5 : 3 : 2); В — *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3); Г — метанол — НСООН — вода (85 : 15 : 5), для электрофореза на бумаге — 0,05 М триэтиламмонийбикарбонат, рН 7,5, препаративный электрофорез на бумаге проводили в 0,2 М буфере, УФ-спектры записывали на спектрофотометре «Spesord UV-VIS» (ГДР). Для определения нуклеотидов в нейтральных растворах использовали значения молекулярной экстинкции: для производных гуанозина — ϵ_{260} 11 700 [34], инозина — ϵ_{218} 12 300 [34], 1-*N*-метилгуанозина — ϵ_{251} 10 400 [9], 8-бромгуанозина — ϵ_{262} 15 200 [14]. Определение фосфора проводили с реагентом, описанным в работе [35], без предварительного гидролиза (кислотолабильный фосфат) или после обработки (15 мин, 200°) 57% хлорной кислотой (общий фосфат). Восстанавливающий сахар после мягкого кислотного гидролиза (0,1 н. НСl, 15 мин, 100°) определяли по Парку — Джонсону [36], белок — по Лоури [37]. Для локализации фосфорных эфиров на бумажных хроматограммах использовали молибдатный реагент (пропись Д45а в книге [38]), восстанавливающиеся сахаров — кислый фталат анилина (пропись Д34 в книге [38]), полиолов — метод Усова и Рехтера [39]. Радиоактивные вещества определяли с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика Isosap-300 (Nuclear Chicago, США) с использованием толуольного сцинтиллятора (4 г 2,5-дифенилоксазола, 0,2 г 1,4-(2—)5-фенилоксазол-ил-бензола в 1 л толуола) для локализации радиоактивных зон на хроматограммах и диоксанового сцинтиллятора [40] для водных растворов веществ. Определение радиоактивных веществ в растворах, содержащих хлороформ, проводили как описано в работе [15]. Эффективность счета определяли по отношению каналов, она составляла при гомогенном счете ~30% для ³H и ~80% для ¹⁴C.

α-D-Маннопиранозилфосфат получали по описанному методу [41, 42], но очистку проводили ионообменной хроматографией на дауэксе 1 × 8 (НСО₃⁻-форма) (100/200 меш), элюция 0,3 М раствором триэтиламмонийбикарбоната, рН 7,5. Полученная триэтиламмониевая соль однородна при хроматографии на бумаге. R_f 0,48 (А), 0,70 (Г) и электрофорезе на бумаге E_{пикрат} 1,46.

Инозин-5'-(α-D-маннопиранозилпирофосфат) (II). Раствор 0,126 ммоль триэтиламмониевой соли *α-D*-маннопиранозилфосфата и 0,28 ммоль триэтиламмониевой соли инозин-5'-фосфоморфолида [43] (исходные вещества высушены отгонкой сухого бензола) в 3 мл диметилсульфоксида выдерживали 4 сут при 20°. Смесь выливали в 100 мл воды, раствор пропускали через колонку (7,3 × 1,4 см) дауэкса 1 × 8 (Cl⁻-форма), 100/200 меш, смывали 0,02 М раствором NH₄Cl (400 мл) инозин-5'-фосфоморфолид (0,144 ммоль), 0,04 М раствором (300 мл) инозин-5'-фосфат (0,017 ммоль) и 0,07 М раствором (350 мл) — продукт (II). Выход 0,028 ммоль (22%). Раствор концентрировали, продукт обессоливали пропуская через сефадекс G-10 (свойства см. табл. 1).

1-N-Метилгуанозин (V). К раствору 0,5 г (1,77 ммоль) гуанозина в 5 мл диметилсульфоксида добавляли 300 мг K₂CO₃ и 0,12 мл иодистого

метила, перемешивали 2 ч при $\sim 20^\circ$, затем вводили еще 100 мг K_2CO_3 и 0,04 мл иодистого метила, перемешивали еще 1 ч. Осадок отфильтровывали, фильтрат по каплям добавляли к 40 мл CH_2Cl_2 . Осадок отделяли фильтрованием, растворяли в 20 мл воды и пропускали раствор через колонку ($23 \times 1,5$ см) дауэкса 1×8 (HCO_3^- -форма), колонку промывали водой. В первых 120 мл элюата содержалось вещество с λ_{\max} 273 нм, в последующих 250 мл — продукт (V). Выход 1,35 ммоль (76%). УФ-спектр: λ_{\max} 257,280 (плечо) нм (в 0,1 н. HCl); 254, 270 (плечо) нм (в воде и 0,1 н. КОН). R_f 0,45 ($R_{\text{гуанозин}}$ 1,1) (Б).

1-N-Метилгуанозин-5'-фосфат (VI). 16,2 мг (54,5 мкмоль) 1-N-метилгуанозина добавляли к охлажденной смеси 2 мл триэтилфосфата и 0,4 мл хлорокиси фосфора, смесь выдерживали 1 ч при 5° и выливали в 25 мл абс. эфира. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в 1 М триэтиламмонийбикарбонате (рН 7,5) и наносили раствор полосой (ширина 14 см) на 2 листа бумаги Ватман ЗММ, препаративным электрофорезом при рН 7,5 выделяли триэтиламмониевую соль (VI). Выход 25,5 мкмоль (47%). УФ-спектр идентичен УФ-спектру (V), $E_{\text{пикрат}}$ 1,15 (рН 7,5), R_f 0,26 ($R_{\text{ГМР}}$ 1,14) (А).

1-N-Метилгуанозин-5'-(α -D-маннопиранозилпирофосфат) (III). 21 мкмоль триэтиламмониевой соли 1-N-метилгуанозин-5'-фосфата высушивали трехкратной отгонкой смеси спирт—бензол (1 : 1) и бензола, растворяли в 1 мл диметилформамида, добавляли 20 мкл дифенилхлорфосфата и 30 мкл три-*n*-бутиламина, оставляли на 4 ч при 20° . Раствор выливали в эфир (20 мл), осадок отделяли центрифугированием, высушивали отгонкой бензола. К остатку добавляли раствор 50 мкмоль триэтиламмониевой соли α -D-маннопиранозилфосфата в 1 мл диметилформамида и 0,5 мл пиридина, выдерживали ~ 16 ч при 20° . Анализ электрофорезом при рН 7,5 показал полное исчезновение активированного производного нуклеотида ($E_{\text{пикрат}}$ 0,35). Раствор выливали в эфир (20 мл), осадок отделяли центрифугированием, растворяли в небольшом количестве воды, отделяли препаративным электрофорезом на бумаге при рН 7,5 зону, отвечающую пирофосфату, и рехроматографией веществ из этой зоны в системе А выделяли соединение (III). Выход 3,4 мкмоль (16%). Свойства см. табл. 1.

8-Бромгуанозин-5'-фосфат (VII). К раствору 0,141 ммоль триэтиламмониевой соли гуанозин-5'-фосфата (получена очисткой препарата фирмы «Reanal», ВНР, с помощью ионообменной хроматографии) в смеси 2 мл воды и 4 мл 1 М ацетатного буферного раствора (рН 3,1) добавляли 1 мл свежеприготовленной бромной воды, выдерживали 20 мин в темноте, избыток брома удаляли экстракцией четыреххлористым углеродом (5 мл). Раствор нейтрализовали добавлением триэтиламина до рН 5, упаривали до 4 мл, наносили раствор на колонку ($72 \times 2,5$ см) с сефадексом С-10. Колонку промывали водой, в элюате измеряли оптическую плотность при 255 и 260 нм и электропроводность (с помощью кондуктометра СДМ-3 фирмы «Radiometer», Дания). После выхода солей (170—220 мл элюата) и небольшого количества вещества с A_{255}/A_{260} 1,1, вероятно непрореагировавшего гуанозин-5'-фосфата (220—300 мл элюата), собирали 300—420 мл элюата, содержащего вещество с A_{255}/A_{260} 0,95. Раствор концентрировали и продукты разделяли с помощью препаративного электрофореза на бумаге при рН 7,5, наблюдали зоны с $E_{\text{пикрат}}$ 1,25 и 0,75. Из более подвижной зоны получили триэтиламмониевую соль (VII), выход 0,054 ммоль (38%). УФ-спектр: λ_{\max} 263,5 нм (в 0,1 н. HCl), 273 нм (в 0,1 н. КОН), R_f 0,15 (А), 0,24 (Б). При гидролизе вещества щелочной фосфомоноэстеразой (триэтиламмонийбикарбонат, рН 8,7; 16 ч, 20°) получен 8-бромгуанозин, идентифицированный сравнением с заводским образцом в системе Б.

8-Бромгуанозин-5'-(α -D-маннопиранозилпирофосфат (IV). Получали аналогично описанной выше прописи для получения соединения (III), исходя из 42 мкмоль триэтиламмониевой соли (VII) и 48 мкмоль триэтил-

аммониевой соли α -D-маннопиранозилфосфата, пирофосфатный синтез проводили в смеси 3 мл диметилформамида и 2 мл пиридина. Продукт выделяли препаративным электрофорезом на бумаге. Выход 13,4 мкмоль (32%). Свойства см. табл. 1.

Временная зависимость протекания маннозилтрансферазной реакции (рисунок). Общая методика приготовления инкубационных смесей при исследовании реакций с гликозилтрансферазами описана в работе [1]. Инкубировали при 37° смесь, содержащую в объеме 0,1 мл 50 нмоль морапренилфосфата [2], 10 мкл метанола, 15 мкл 0,5% водного раствора Твина-85, 5 мкл 1 М Трис-ацетатного буфера (рН 8,5), 1 мкмоль $MgCl_2$, по 25 нмоль UDPGal (Calbiochem, США), dTDP Rha [12] и GDP-[^{14}C]-Man (10 мКи/ммоль, радиоактивный препарат фирмы «Amersham», Англия, разбавлен нерадиоактивным нуклеотидсахаром фирмы «Calbiochem», США) и препарат растворимых гликозилтрансфераз из *S. anatum* A1/15 (20 мкг белка). Реакцию останавливали добавлением смеси хлороформ — метанол (2 : 1), пробы обрабатывали как описано ранее [1, 15] для определения радиоактивности в органической фазе.

Зависимость скорости маннозилтрансферазной реакции от концентрации GDPMan. Инкубировали 15 мин при 37° смесь, содержащую в объеме 0,15 мл 40 нмоль морапренилфосфата, 10 мкл метанола, 15 мкл 0,5% раствора Твина-85, 5 мкл 1 М Трис-ацетатного буфера (рН 8,5), 1 мкмоль $MgCl_2$, 50 нмоль UDPGal и dTDP Rha, препарат растворимых гликозилтрансфераз (150 мкг белка) и GDP-[^{14}C]-Man в количествах, соответствующих концентрации, указанной в табл. 2. Пробы обрабатывали для определения радиоактивности в органической фазе [1, 15]. Величины K_m и V определяли по методу Вилкинсона [44], вычисления проводили на ЭВМ БЭСМ-6 (программа написана на языке «Алгол»). Результаты сведены в табл. 2.

Взаимодействие аналогов GDPMan с маннозилтрансферазой. Инкубировали 30 мин при 37° пробы, аналогичные описанным для исследования временной зависимости ферментативной реакции, но содержание 40 нмоль морапренилфосфата, 25 нмоль UDP-[^{14}C]-Gal (50 мКи/ммоль), 25 нмоль dTDP Rha и количества GDPMan или ее аналогов, указанные в табл. 4. После выделения полипренолфосфосахаров экстракцией смесью хлороформ — метанол их обрабатывали фенолом и фосфомоноэстеразой как описано в работе [1], анализировали продукты хроматографией на бумаге FN-15 в системе В в течение 67 ч. Локализовали радиоактивные зоны на хроматограмме, зону, соответствующую трисахариду (см. рис. 6 в статье [15]), элюировали водой и определяли ее радиоактивность. Результаты сведены в табл. 4.

Определение моносахаридного состава продукта маннозилтрансферазной реакции. Аликвоты элюатов хроматографических зон, полученных в предыдущем опыте, обрабатывали 4 ч 1 н. HCl при 105°, упаривали досуха, от остатка отгоняли воду (5 × 2 мл), растворяли остаток в 0,1 мл воды, доводили до рН 9 добавлением конц. NH_4OH , добавляли 20 мкл свежеприготовленного раствора 100 мКи [3H]- $NaBH_4$ («Изотоп», номинальная удельная активность 340 мКи/ммоль) в 0,35 мл 0,1 М бората (рН 9,5), выдерживали ~ 20 ч при 20°. Пробы подкисляли 1 М CH_3COOH до рН 5, упаривали, от остатка отгоняли метанол (5 × 1 мл). Продукты анализировали хроматографией на бумаге в системе В как описано в предыдущем опыте. Основные радиоактивные зоны отвечали по подвижности рамниту, манниту и дульциту, присутствовала также значительная радиоактивность вблизи стартовой линии, возникающая из радиоактивной примеси в препарате [3H]- $NaBH_4$.

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. П. Петренко за предоставление dTDP Rha.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шибаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Дружвинна Т. Н., Кочетков Н. К. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 249—256.
2. Вергунова Г. И., Глугодед И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И., Шашков А. С., Шибаев В. Н. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1484—1492.
3. Verachtert H., Bass S. T., Hansen R. G. (1964) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **15**, 158—165.
4. Shen L., Preiss J. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 2334—2340.
5. Verachtert H., Rodriguez P., Bass S. T., Hansen R. G. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 2007—2013.
6. Verachtert H., Rodriguez P., Bass S. T., Hansen R. G. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **92**, 482—488.
7. Roseman S., Distler J. J., Moffatt J. G., Khorana H. G. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 659—663.
8. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Лебедева К. С. (1969) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 897—903.
9. Broom A. D., Townsend L. B., Jones J. W., Robins R. K. (1964) *Biochemistry*, **3**, 494—500.
10. Singer B. (1972) *Biochemistry*, **11**, 3939—3947.
11. Michelson A. M. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **91**, 1—13.
12. Шибаев В. Н., Елисеева Г. И., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Мищенко С. С., Кочетков Н. К. (1976) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2584—2587.
13. Ikehara M., Tazawa I., Fukui T. (1969) *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1019—1024.
14. Михайлов К. С., Марченко Н. С., Чичкина В. Л., Орлова В. А., Мясоедов Н. С. (1976) *Хим. природн. соед.*, 522—525.
15. Шибаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружвинна Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 47—56.
16. Kozak L. P., Bretthauer R. K. (1970) *Biochemistry*, **9**, 1111—1125.
17. Preiss J. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 3127—3132.
18. Pochon F., Michelson A. M. (1967) *Biochim. et biophys. acta*, **145**, 321—327.
19. Bugg C. E., Thewalt U. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **37**, 623—629.
20. Travall S. S., Sobell M. (1970) *J. Mol. Biol.*, **48**, 109—123.
21. Michelson A. M., Monny C., Kapuler A. M. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **217**, 7—17.
22. Ikehara M., Uesugi S., Yoshida K. (1972) *Biochemistry*, **11**, 830—836.
23. Ikehara M., Uesugi S., Yoshida K. (1972) *Biochemistry*, **11**, 836—842.
24. Kapuler A. M., Monny C., Michelson A. M. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **217**, 18—29.
25. Ikehara M., Tazawa I., Fukui T. (1969) *Biochemistry*, **8**, 736—743.
26. Kapuler A. M., Spiegelman S. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 539—546.
27. Kapuler A. M., Reich E. (1971) *Biochemistry*, **10**, 4050—4061.
28. Yuki E., Yoshida H. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **246**, 206—215.
29. Ivanova G. S., Holy A., Zelinkova E., Bezborodova S. I., Abrosimova-Amelyanchik N. M., Tatarskaya R. I. (1974) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **39**, 2986—2997.
30. Wittinghofer A., Warren W. F., Leberman R. (1977) *FEBS Letters*, **75**, 241—243.
31. Uno H., Oyabu S., Ohtsuka E., Ikehara M. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **228**, 282—288.
32. Miller J. P., Boswell K. H., Munezama K., Simon L. N., Robins R. K., Shuman D. A. (1973) *Biochemistry*, **12**, 5310—5319.
33. Богданов А. А., Леднева Р. К. (1975) *Нуклеиново-белковое узнавание (Итоги науки и техники. Молекулярная биология, т. 5), с. 24—76, ВИНТИ, М.*
34. Burton K. (1969) in *Data for Biochemical Research* (Dawson R. M. C., Elliot D. C., Elliot W. H., Jones K. M., eds.), pp. 169—179, Clarendon Press, Oxford.
35. Lucena-Gonde F., Prat L. (1957) *Anal. chim. acta*, **16**, 473—479.
36. Park J. T., Johnson M. J. (1949) *J. Biol. Chem.*, **181**, 149—151.
37. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275.
38. Хайс И. М., Мадек К. (1962) *Хроматография на бумаге. Изд-во иностр. лит., М.*
39. Усов А. И., Рехтер М. А. (1966) *Ж. общ. химии*, **39**, 912—913.
40. Bray G. A. (1960) *Anal. Biochem.*, **1**, 279—285.
41. Hill E. C., Ballou C. E. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 895—902.
42. Perchemlides P., Osawa T., Davidson E. A., Jeanloz R. W. (1967) *Carbohydr. Res.*, **3**, 463—477.
43. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Шибаев В. Н., Спиридонова С. М. (1969) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2775—2779.
44. Wilkisson G. N. (1961) *Biochem. J.*, **80**, 324—332.

Поступила в редакцию
19.VII.1977

SPECIFICITY OF THE ENZYMES OF SALMONELLA O-ANTIGEN
BIOSYNTHESIS. 2. INOSINE, 1-N-METHYLGUANOSINE AND
8-BROMOGUANOSINE DIPHOSPHATE MANNOSES:
SYNTHESIS AND SUBSTRATE PROPERTIES IN RELATION
TO MANNOSYLTRANSFERASE FROM *SALMONELLA ANATUM*

SHIBAEV V. N., DRUZHININA T. N., ELISEEVA G. I.,
KOCHETKOV N. K.

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

Three analogs of guanosine diphosphate mannose (I), i. e. the derivatives of inosine (II), 1-N-methylguanosine (III) and 8-bromoguanosine (IV), were synthesized and studied as substrates of *Salmonella anatum* mannosyltransferase which participates in the O-antigen biosynthesis. By their properties derivatives (II) and (III) may be classified as a «very good substrate» and a «good substrate», respectively. This implies that the =C(NH₂)-NH-grouping of the guanine nucleus, which may serve as hydrogen donor in hydrogen bonding, is not essential for interaction of (I) with the enzyme. The derivative (IV) proved to be a substrate of medium efficiency. The possible reasons for a drop in substrate efficiency concomitantly with modification at C⁸ of the guanine ring are discussed.
