



УДК 577.154.5

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНА САЛМОНЕЛЛ

4. КИНЕТИКА РЕАКЦИЙ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНА *S. ANATUM* С ПРОИЗВОДНЫМИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПОЛИПРЕНОЛА И МОРАПРЕНОЛА

**Кусов Ю. Ю., Киселева Е. В., Данилов Л. Л., Шибанов В. Н.,
Кочетков Н. К.**

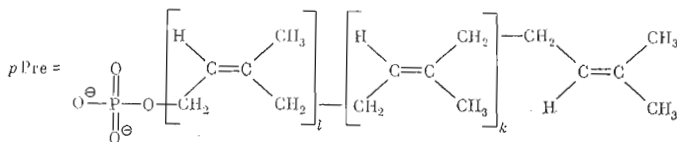
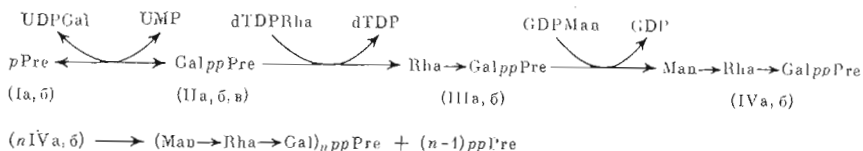
*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва*

Рожнова С. Ш., Килессо В. А.

*Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии
Министерства здравоохранения СССР, Москва*

Ферменты биосинтеза О-специфического полисахарида из *Salmonella anatum* способны использовать в качестве эффективных субстратов экзогенные морапренилфосфат и морапренилпирофосфатсахара. Определение кинетических параметров реакций показывает, что между ферментами имеются лишь небольшие количественные различия в специфичности к структуре остатка полипренола. Величина кажущейся K_m для галактозилфосфаттрансферазы — первого фермента биосинтетического цикла — на два порядка выше, чем величины K_m для остальных ферментов цикла, что позволяет предполагать регулирование суммарной скорости процесса концентрацией свободного полипренилфосфата. Синтетическая морапренилпирофосфатгалактоза является эффективным акцептором остатка рамнозы в реакции, катализируемой рамнозилтрансферазой.

Биосинтез О-антигенного полисахарида *Salmonella anatum* протекает путем последовательного переноса остатков α -D-галактозилфосфата (Galp), L-рамнозы (Rha) и D-маннозы (Man) на липидный акцептор — полипренилфосфат (pPre) и дальнейшей полимеризации трисахаридного повторяющегося звена (обзор см. [1]). Эти реакции катализируются соответствующими ферментами: галактозилфосфат-, рамнозил- и маннозилтрансферазами и, наконец, полимеразой О-антигенной цепи:



где в серии «а» рРге — остаток бактериального полипренола с $l=8$, $k=2$, а в серии «б» и «в» — остаток морапренола с $l=7$, $k=3$, (Пв) — синтетический аналог.

При биосинтезе О-антигенных полисахаридов, как и других углеводсодержащих полимеров, специфичность ферментов биосинтеза, в частности гликозилтрансфераз, к структурам доноров и акцепторов гликозильных остатков является, по-видимому, определяющим фактором для формирования строго определенной последовательности моносахаридных звеньев, а также типа и конфигурации образуемых между ними гликозидных связей [2]. В связи с этим изучение вопроса о структурных основах такой специфичности представляет значительный интерес.

В предыдущих работах этой серии было исследовано значение некоторых функциональных групп доноров гликозильных остатков для их взаимодействия с ферментами биосинтеза О-антигенного полисахарида *S. anatum* [3–5]. Специфичность же этих ферментов в отношении структуры полипренольных акцепторов изучена гораздо хуже. Ранее мы показали [6], что морапренилфосфат может заменять бактериальный полипренилфосфат во всех реакциях биосинтеза О-антигена, однако количественная характеристика была получена лишь для первой реакции биосинтетического цикла. За исключением упомянутого сообщения, в литературе практически нет количественной оценки специфичности указанных выше бактериальных ферментов в отношении структуры акцепторов полипренольной природы. Имеется лишь упоминание о способности производных растительного полипренола вступать в реакции биосинтеза О-антигена *S. anatum* (неопубликованная работа Райта и Кагасасики, цит. по [7]). Кроме того, описано исследование субстратных свойств ряда аналогов полипренилфосфата в реакции, катализируемой галактозилфосфаттрансферазой из *S. typhimurium* [8].

Настоящая работа посвящена изучению вопроса о том, как изменяется скорость последовательных ферментативных реакций биосинтеза О-антигена при замене производных бактериального полипренола (соединения ряда «а», см. схему) на производные изомерного ему морапренола (полипренола из листьев шелковицы, соединения ряда «б»); основное различие их структур состоит в соотношении *цис*- и *транс*-изопреновых звеньев полипренольного остатка. Подобное сопоставление необходимо и для оценки биологической активности морапренилпирофосфатсахаров и их аналогов, получаемых химическим синтезом; субстратные свойства первого представителя этого ряда соединений, синтетической морапренилпирофосфатгалактозы (Пв [9]), также описаны в данной работе.

Для исследования трансферазных реакций был применен препарат сольбилизованных гликозилтрансфераз, полученных обработкой мембран безэпимеразного штамма *S. anatum* А, неионным детергентом [6, 10]. О протекании каждой из этих реакций судили по включению радиоактивности в полипренилпирофосфатсахара при инкубации соответствующих немеченых акцепторов с нуклеозиддифосфатсахаром, содержащим радиоактивную метку в остатке сахара. Для оценки эффективности субстратов использовали относительную величину константы Михаэлиса

$$K_m^r = \frac{K_m \text{ для аналога}}{K_m \text{ для природного субстрата}}$$

и относительную скорость реакции при концентрации аналога, в 10 раз превосходящую величину K_m для природного субстрата,

$$v_{\sigma=10} = \frac{10V^r}{10 + K_m^r},$$

где

$$V^r = \frac{V \text{ для аналога}}{V \text{ для природного субстрата}} \quad [5].$$

Зависимость скорости галактозилфосфаттрансферазной реакции от концентрации бактериального полипренилфосфата (Ia) и морапренилфосфата (Iб)

Акцептор	[S], мМ	$v_{\text{актп}} \cdot 10^{-3}$ имп/мин	$v_{\text{выч}} \cdot 10^{-3}$ (имп/мин) \pm сигма	Кинетические параметры
(Ia)	0,025	0,876	0,930 \pm 0,230	K_m (мМ) = 0,161+0,0413 $V \cdot 10^{-3}$ (имп/мин) = 7,050 \pm 0,768
	0,037	0,905	1,308 \pm 0,307	
	0,049	1,908	1,644 \pm 0,369	
	0,122	3,360	3,037 \pm 0,553	
	0,244	3,914	4,242 \pm 0,633	
(Iб)	0,488	5,407	5,299 \pm 0,668	K_m (мМ) = 0,403 \pm 0,174 $V \cdot 10^{-3}$ (имп/мин) = 8,70 \pm 2,17
	0,050	1,524	0,961 \pm 0,441	
	0,100	1,790	1,731 \pm 0,739	
	0,150	2,090	2,361 \pm 0,949	
	0,250	3,165	3,332 \pm 1,218	
	0,500	4,934	4,819 \pm 1,519	

Таблица 2

Кинетические параметры реакций биосинтеза О-антигена *S. anatum*

Фермент	Акцептор	K_m , мМ	$V \cdot 10^2$, мкМ/мин	K_m^r	$v_{\sigma=10}$	$(V/K_m) \cdot 10^2$, мин $^{-1}$
Галактозилфосфат- трансфераза	(Ia)	161 \pm 41	21 \pm 2	2,5	0,99	0,13
	(Iб)	403 \pm 174	26 \pm 6,5			0,064
Рамнозилтрансфера- за	(IIa)	1,53 \pm 0,32	4,6 \pm 0,6	2,1	2,48	3,0
	(IIб)	3,18 \pm 0,41	14 \pm 1			4,4
	(IIв)	6,37 \pm 1,42	10 \pm 1			1,56
Маннозилтранс- фераза	(IIIa)	3,54 \pm 1,12	36 \pm 7	0,4	0,38	10,17
	(IIIб)	1,45 \pm 0,36	14 \pm 1			9,65
Полимераза О-спе- цифической цепи	(IVa)	0,779 \pm 0,12	3,9 \pm 0,2	4,5	1,92	5,0
	(IVб)	3,15 \pm 0,06	9,0 \pm 0,1			2,85

Дополнительным критерием при оценке эффективности аналогов как субстратов ферментативных реакций может служить величина V/K_m , соответствующая константе скорости реакции первого порядка при малых концентрациях субстратов (ср. оценку эффективности субстратов в работе [11]).

В одной из предыдущих работ [6] были подобраны оптимальные условия для измерения начальной скорости галактозилфосфаттрансферазной реакции и было обнаружено ингибирование процесса в присутствии избытка акцептора. В настоящей работе мы провели измерения скорости реакции при малых концентрациях соединений (Ia) и (Iб); согласно табл. 1, при близких значениях максимальной скорости реакции кажущаяся величина K_m для соединения (Iб) в 2,5 раза выше, чем для производного (Ia). Оценивая по предложенным ранее критериям [5] эффективность соединения (Iб) как субстрата галактозилфосфаттрансферазы, можно видеть, что как по относительной величине кажущейся константы Михаэлиса (K_m^r), так и по значению относительной скорости реакции ($v_{\sigma=10}$) морапренилфосфат может быть отнесен к категории «очень хороших субстратов» ($K_m^r < 5$, $v_{\sigma=10} > 0,67$) (табл. 2).

Из данных табл. 2 также видно, что и по параметру V/K_m фосфаты (Ia) и (Iб) близки. Следовательно, замена в полипренильном остатке (Ia) одного из *cis*-изопреновых звеньев на *trans*-изопреновое звено не сказывается существенно на акцепторных свойствах полипренилфосфата в реакции, катализируемой галактозилфосфаттрансферазой из *S. anatum*. Аналогичные данные получены в реакции, катализируемой галактозилфосфаттрансферазой из *S. typhimurium*, при сравнении субстратных свойств

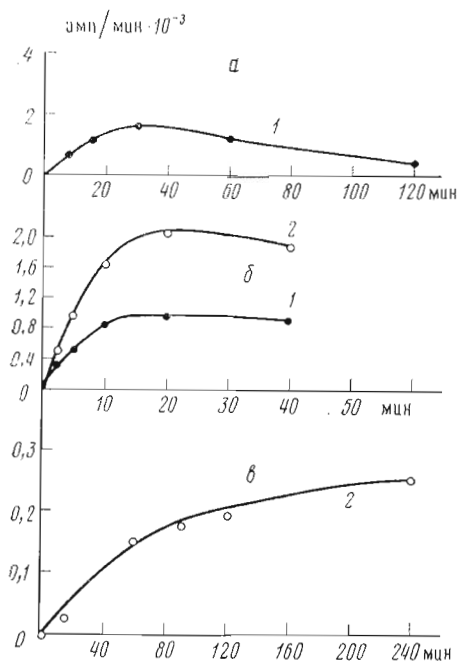


Рис. 1

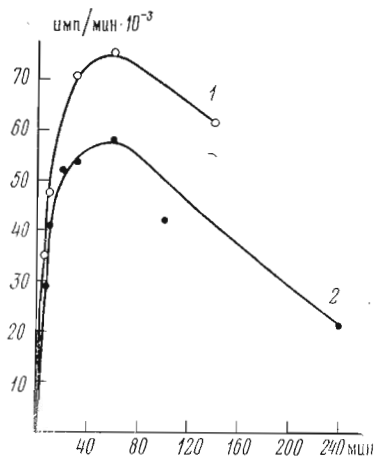


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость от времени реакций, катализируемых рамнозилтрансферазой (а), маннозилтрансферазой (б) и полимеразой (в) на основе бактериального полипренола (1) и морапренола (2)

Рис. 2. Зависимость образования соединений (IIб) (1) и (IVа) (2) от времени, исходя из фосфатов (Iб) и (Iа) при инкубации с UDPGal и dTDP[¹⁴C]Rba и с UDPGal, dTDP Rba и GDP[¹⁴C]Man соответственно

Рис. 3. Анализ продуктов полимеризации (IVб) хроматографией на бумаге. 1 — контроль, 2 — опыт

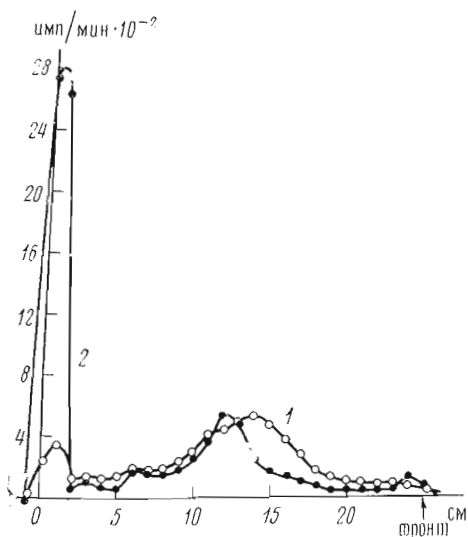


Рис. 3

бактериальных полипрецилфосфатов, выделенных из *B. stearothermophilus* и *Sh. flexneri*, со свойствами химически фосфорилированного полипренола из *Trichosantes palmata* [8].

При изучении рамнозилтрансферазы, катализирующей вторую реакцию биосинтеза O-антигена, синтетическую морапрецилширофосфатгалактозу (IIв [9]) сравнивали с биохимически полученными производными (IIа) и (IIб) на основе бактериального полипренола и морапренола соответственно, которые образовывались при взаимодействии полипрецилфосфатов (Iа) и (Iб) с немеченой уридиндифосфатгалактозой (UDPGal) в условиях определения активности галактозилфосфаттрансферазы, но при проведении реакции до достижения равновесия. При исследовании кинетики рамнозилтрансферазной реакции за меру начальной скорости принимали включение рамнозы за 20 мин инкубации (см. рис. 1а). Приведенные в табл. 2 данные показывают, что, несмотря на некоторые раз-

личия в абсолютных значениях K_m и V для производных (IIa) и (IIб), последний можно оценить как очень хороший субстрат реакции и по величине K_m , и по значению $v_{0=10}$ [5]; дополнительная оценка эффективности соединения (IIб) по кажущейся константе скорости реакции первого порядка (V/K_m) также свидетельствует о близости субстратных свойств соединений (IIa) и (IIб) в рамнозилтрансферазной реакции. Следовательно, и второй фермент биосинтеза О-антигена *S. anatum* не проявляет строгой специфичности в отношении тех элементов структуры, которые отличают морапренол от бактериального полипренола.

Как видно из табл. 1, для химически синтезированного соединения (IIв) при близких величинах V наблюдается несколько более высокое значение кажущейся K_m , чем для этого же соединения, полученного биосинтетическим путем (IIб). Различия, однако, невелики, и по сформулированным выше критериям производное (IIв) следует классифицировать как очень хороший субстрат. Этот результат показывает, таким образом, возможность эффективного использования синтетических морапренилпирирофосфатсахаров как субстратов для ферментов биосинтеза О-антигена. Причины наблюдаемых различий в значениях K_m и V не вполне ясны: они могут быть связаны с худшей растворимостью соединения (IIв) в водном растворе неионого детергента либо с наличием неодинаковых примесей в биохимически полученном и синтетическом препаратах.

Формирование трисахаридного повторяющегося звена соединения (IVб) завершается присоединением остатка маннозы к акцептору — рамнозилгалактозилпирирофосфатполипренолу. Акцепторная специфичность рамнозилтрансферазы изучена на примере двух дисахаридных производных (IIIa) и (IIIб), содержащих остаток бактериального полипренола и морапренола соответственно. Ферментативный синтез этих соединений осуществлен взаимодействием полипренилфосфатов (Ia) или (Iб) с немечеными нуклеотидсахарами — UDPGal и тимидиндифосфатрамнозой (dTDP Rha) в течение 60 мин вместо рекомендованных [10] 120 мин, поскольку, как показано на рис. 2 на примере взаимодействия фосфата (Iб) с UDPGal и dTDP [^{14}C] Rha, более продолжительное время реакции приводило к существенному снижению выхода дисахаридных производных. Линейность включения маннозы в дисахаридные акцепторы (IIIa) и (IIIб), соблюдавшаяся вплоть до 10 мин инкубации (см. рис. 1б), позволила изучить зависимость скорости рамнозилтрансферазной реакции от концентрации этих акцепторов.

В реакции, катализируемой рамнозилтрансферазой (табл. 2), значение кажущейся K_m морапренилпирирофосфатдисахарид (IIIб) несколько ниже, чем у природного субстрата, и только более низкая максимальная скорость реакции делает эти субстраты сопоставимыми, особенно при сравнении кажущихся констант скоростей реакции первого порядка (V/K_m). Оценивая эффективность соединения (IIIб) по предложенным ранее критериям, можно видеть, что морапренилпирирофосфатдисахарид является «хорошим» субстратом рамнозилтрансферазы при оценке по величине относительной скорости реакции ($v_{0=10}=0,38$) и «очень хорошим» при оценке по значению K_m . Следовательно, рамнозилтрансфераза, как и две предыдущие гликозилтрансферазы биосинтеза О-антигена *S. anatum*, не обладает строгой специфичностью в отношении структуры полипренольного остатка акцептора.

Все три изученные гликозилтрансферазы оказались способными эффективно использовать соответствующие акцепторы на основе растительного морапренола, хотя в количественном отношении между ними наблюдаются небольшие различия по чувствительности к модификации структуры остатка полипренола.

При исследовании специфичности полимеразы, катализирующей полимеризацию трисахаридного повторяющегося звена в О-антигенный поли-

сахарид, в качестве источника фермента был использован препарат мембран.

Трисахаридные производные (IVa) и (IVб), необходимые для изучения акцепторной специфичности полимеразы, были получены ферментативным путем, исходя из фосфатов бактериального полипренола и мораренола соответственно. Как и при получении соединений (IIIa) и (IIIб) (см. выше), рекомендованное время (120 мин, [10]) инкубации исходных полипренилфосфатов с соответствующими нуклеотидами пришлось сократить ввиду резкого снижения выхода (рис. 2). Полимеризацию полученных трисахаридных акцепторов (IVa) и (IVб) с вышеописанным препаратом мембран контролировали с помощью хроматографии на бумаге. Из рис. 3 можно видеть, что ~80% радиоактивности переходит в находящийся на старте хроматограммы полимерный продукт. Линейная (до 60 мин) зависимость образования полимера от времени, показанная на рис. 1в на примере полимеризации трисахаридного производного (IVб), позволила изучить зависимость начальной скорости полимеризации от концентрации трисахаридных производных (IVa) и (IVб). Приведенные в табл. 2 данные демонстрируют, что в реакции, катализируемой полимеразой O-специфической цепи, эффективности экзогенных полипренилпирофосфаттрисахаридов на основе бактериального полипренола (IVa) и мораренола (IVб) близки как по кажущейся константе скорости реакции первого порядка (V/K_m), так и по значениям K_m^r и $v_{0.10}$, предложенным для оценки эффективности аналогов природных субстратов [5]. Вывод о том, что полимеразы O-антигена не обладает строгой специфичностью к структуре остатка полипренола, не вызывает сомнения, хотя эти данные и следует рассматривать как предварительные из-за отсутствия достаточного количества трисахаридных производных (IVa) и (IVб), что связано с их исключительной лабильностью при очистке ионообменной хроматографией и особенно при обессоливании.

Сравнение величин K_m для ферментов, катализирующих последовательные стадии биосинтеза O-антигена, позволило обнаружить интересный факт: для первого фермента биосинтетического цикла эти величины приблизительно на два порядка выше, чем для следующих ферментов цикла. Таким образом, регулирование суммарной скорости процесса, по крайней мере *in vitro*, в значительной степени зависит от концентрации свободного полипренилфосфата; при его малой концентрации биосинтез O-антигена лимитируется скоростью первой реакции — единственной обратимой реакцией из всего цикла. Возможно, что такая регуляция необходима для обеспечения координации биосинтеза O-антигенного полисахарида и другого полимера клеточной стенки — пептидогликана, в биосинтезе которого также участвует полипренилфосфат.

Экспериментальная часть

В работе использовали дефектный по UDPGal-4-эпимеразе (КФ 5.1.3.2) штамм *S. anatum* A₁, любезно предоставленный д-ром А. Райтом [12]; выращивание клеток проводили на минимальной среде [13] с добавлением 0,2%-ной глюкозы, не содержащей примеси галактозы. Способы получения препарата мембран и препарата растворимых гликозилтрансфераз, методы анализа радиоактивных соединений, а также источники радиоактивных и немеченых нуклеотидсахаров описаны ранее [6]. При получении UDP[6-³H]Gal были внесены следующие модификации: 1) контроль за окислением UDPGal осуществляли электрофорезом на бумаге в 0,05 М триэтиламонийбикарбонатном буфере, pH 7,5, с последующим опрыскиванием электрофореграммы 0,2%-ным динитрофенилгидразином в 1 н. HCl [14]; 2) при выделении UDP[6-³H]Gal вместо препаративной хроматографии на бумаге применена гель-фильтрация на колонке (2,2×70 см) с сефадексом G-50; выход UDP[6-³H]Gal удалось повысить

до 75–80%. Удельная активность полученной UDP[³H]Gal составила при этом 104 мКи/ммоль.

Нерадиоактивная dTDP Rha получена из dTDP Glc по варианту метода [15] с использованием в качестве препарата фермента супернатанта, получаемого при выделении препарата мембраи [6]. Инкубационную смесь, содержащую 0,3 мл 1 М трис-HCl (pH 7,8), 0,06 мл 0,1 М EDTA, 0,6 мл 0,03 М NADP, 0,3 мл 0,2 М глюкозо-6-фосфата, 0,06 мл глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (КФ 1.1.1.49; Serva, ФРГ), 17 мг (28,3 мкмоль) dTDP Glc (Sigma, США) и 6 мл супернатанта, выдерживали 24 ч при 20°С и наносили на колонку (2,2×70 см) с сфадексом G-50. При элюции водой помимо фракции белков получена фракция, содержащая нуклеотидсахар; в гидролизате (2 н. HCl, 100°С, 25 мин) этой фракции обнаружена только рампоза (углеводный анализатор фирмы Technicon, Autoanalyzer). Выход dTDP Rha 26 мкмоль (92%).

Выделение бактериального полипренилфосфата ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе (Whatman, DE-32, Англия) проводили как описано [6], но применяли колонку размером 0,8×8 см и предварительно переводили липидфосфаты в пиридиниевую соль, для чего раствор дезацелированных липидфосфатов в 10 мл смеси CHCl₃-MeOH (2:1) перемешивали с 1 мл дауэкс-50 (C₅H₅N⁺-форма). Это существенно уменьшает потери при ионообменной хроматографии.

Общая методика исследования реакций, катализируемых гликозилтрансферазами. Акцепторы (Ia, б) вносили в инкубационные смеси (общий объем 0,1 мл) как описано ранее [6]; соединения (IIa, б, в) — (IVa, б) добавляли в 0,1% растворе твина-85 с поддержанием постоянной концентрации детергента в инкубационных смесях (общий объем 0,15 мл). По окончании реакции в инкубационные смеси, содержащие помимо акцепторов 5 мкл 1 М трис-ацетата, pH 8,5, с 10 мкл 0,1 М MgCl₂ (буфер А), 10 мкл 2,5 мМ нуклеотидсахара и 50 мкл препарата растворимых гликозилтрансфераз из *S. apatum* A₁, добавляли 2 мл смеси CHCl₃-MeOH (2:1), выдерживали 10 мин при 20°С и экстрагировали по Фольчу [16]. Органический слой упаривали под лампой 500 Вт, добавляли 0,5 мл воды, 10 мл диоксанового сцинтиллятора [17] и измеряли радиоактивность. Контрольная проба не содержала экзогенного акцептора. Кинетические параметры (*K_m* и *V*) определяли из данных по зависимости скорости реакции от концентрации субстрата с помощью метода Вилкинсона [18]; вычисления проводили на ЭВМ ВЭСМ-6 (программа написана на языке «Алгол»). В качестве примера в табл. 1 приведены данные по определению кинетических параметров для реакции, катализируемой галактозилфосфаттрансферазой.

Зависимость скорости галактозилфосфаттрансферазной реакции от концентрации полипренилфосфатов (Ia) и (Iб). В инкубационные смеси помимо указанных в общей методике компонентов вносили 5 мкл 2,5 мМ UDP[³H]Gal (50 мКи/ммоль), 55 мкг белка-фермента, а также выделенный из клеток *E. coli* полипренилфосфат (Ia) или морапренилфосфат (Iб) в количествах, соответствующих концентрациям, указанным в табл. 1. Смеси инкубировали при 20°С в течение 10 мин и обрабатывали по вышеописанной методике. Контрольные пробы не содержали акцепторов. Результаты представлены в табл. 1 и 2.

Исследование рамнозилтрансферазной реакции. Для биохимического получения производных (IIa) и (IIб) 17 нмоль соединения (Ia) или 65 нмоль продукта (Iб) инкубировали с немеченой 2,5 мМ UDPGal по общей методике в течение 30 мин при 20°С. Органическую фазу упаривали в токе N₂ до минимального объема, остаток растворяли в 0,2 мл 0,1% твина-85. Выход акцепторов (IIa) и (IIб), определенный по параллельной инкубации контрольной пробы с UDP[³H]Gal, составил ~1–5%.

Химически синтезированный галактозилпирофосфатморалренол (IIв) [9] вносили в инкубационные смеси в виде 14,5 мМ раствора в 0,1%

твине-85. Зависимость протекания реакции от времени определяли по общей методике с добавлением 0,1 нмоль акцептора (IIa) или 4 нмоль соединения (IIб), 5 мкл 2,5 мМ dTDP[¹⁴C]Rha и 60 мкг белка-фермента. Смеси инкубировали при 25°С в течение указанного на рис. 1а времени. При исследовании зависимости скорости рамнозилтрансферазной реакции от концентрации акцепторов в приготовленные по общей методике инкубационные смеси добавляли 10 мкл 2,5 мМ dTDP[¹⁴C]Rha и акцепторы (IIa), (IIб) и (IIв) в 0,1% твине-85 в указанных ниже количествах. После инкубации в течение 20 мин при 25°С смеси обрабатывали по вышеописанной методике. В контрольные пробы не добавляли акцепторы (IIa), (IIб) или (IIв). Получены следующие результаты:

для соединения (IIa) [S], мкМ	0,127	0,254	0,508	0,762	1,017	
$v_{\text{эксп}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,342	0,580	1,158	1,456	1,760	
$v_{\text{выч}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,339	0,630	1,103	1,470	1,765	
для соединения (IIб) [S], мкМ	0,224	0,449	0,899	1,348	1,799	
$v_{\text{эксп}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,888	1,322	2,866	4,067	4,765	
$v_{\text{выч}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,876	1,538	2,934	3,964	4,809	
для соединения (IIв) [S], мкМ	0,480	0,960	1,446	2,406	3,853	5,786
$v_{\text{эксп}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,679	1,075	1,833	2,569	3,844	4,452
$v_{\text{выч}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,673	1,257	1,776	2,632	3,618	4,568

Кинетические параметры рамнозилтрансферазной реакции приведены в табл. 2.

Ферментативное получение дисахаридных акцепторов (IIIa) и (IIIб). Зависимость образования соединений (IIIб) из (Iб) от времени изучали при инкубации 50 нмоль продукта (Iб) в буфере А с добавлением 10 мкл 5 мМ UDPGal, 5 мкл 2,5 мМ dTDP[¹⁴C]Rha (10 мКи/ммоль) и 50 мкл (55 мкг белка) препарата растворимых гликозилтрансфераз. После инкубации при 25°С в течение указанного на рис. 2 времени смеси обрабатывали как описано в общей методике. Для получения соединений (IIIa) и (IIIб) 15,3 нмоль фосфата (Ia) или 32 нмоль фосфата (Iб) инкубировали 60 мин при 25°С в смеси (объем 0,1 мл), содержащей помимо препарата фермента (5 мкг белка) немеченые UDPGal и dTDP Rha (по 10 мкл 2,5 мМ раствора). Контрольная проба содержала вместо немеченой радиоактивную dTDP[¹⁴C]Rha. Органические фазы, полученные по общей методике, упаривали в токе N₂ до минимального объема, остаток растворяли в 0,25 мл 0,1% раствора твина-85. Выход акцепторов ~2%.

Исследование маннозилтрансферазной реакции. Зависимость взаимодействия производных (IIIa) и (IIIб) с 0,25 мМ GDP[¹⁴C]Man (10 мКи/ммоль) от времени изучена инкубацией при 25°С 0,1 нмоль соединения (IIIa) или 0,23 нмоль соединения (IIIб) с 55 мкг белка-фермента в течение указанного на рис. 1б времени. При изучении зависимости скорости маннозилтрансферазной реакции от концентрации акцепторов (IIIa) и (IIIб) последние вводили в буфер А в 0,1% растворе твина-85. Смеси инкубировали при 25°С в течение 10 мин с 10 мкл 2,5 мМ GDP[¹⁴C]Man (10 мКи/ммоль) и с 55 мкг белка-фермента. По окончании инкубации смеси обрабатывали по общей методике. Получены следующие результаты:

для соединения (IIIa) [S], мкМ	0,333	0,726	1,453	2,160	3,600	5,400
$v_{\text{эксп}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	1,025	1,577	2,347	3,063	4,433	6,170
$v_{\text{выч}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,790	1,446	2,474	3,242	4,313	5,991
для соединения (IIIб) [S], мкМ	0,753	1,506	3,012	4,507	7,533	11,267
$v_{\text{эксп}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	1,295	1,724	2,086	2,480	2,602	3,218
$v_{\text{выч}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	1,135	1,694	2,247	2,521	2,794	2,956

Кинетические параметры маннозилтрансферазной реакции приведены в табл. 2.

Ферментативное получение трисахаридных акцепторов (IVa) и (IVб). Зависимость от времени образования трисахаридных акцепторов из полипренилфосфатов изучена на примере получения производного (IVa) из фосфата (Ia), для чего 12,25 нмоль фосфата (Ia) инкубировали при 25° С в буфере А, содержащем 0,5 мМ UDPGal, 0,25 мМ dTDPPrha, 0,25 мМ GDP[¹⁴C]Man (50 мКи/ммоль), с 50 мкл (55 мкг белка) препарата фермента. Результаты представлены на рис. 2. Для получения производных (IVa) и (IVб) аналогичные пробы, содержащие 12,2 нмоль фосфата (Ia) или 45 нмоль фосфата (Iб), инкубировали 60 мин при 25° С. Органические фазы, содержащие ~2% соединения (IVa) или (IVб), считая на исходные полипренилфосфаты, упаривали в токе N₂ до минимального объема, остаток растворяли в 0,1% растворе твина-85 и использовали далее без очистки для предварительного изучения полимеразной реакции.

Изучение полимеризации экзогенных трисахаридных акцепторов (IVa) и (IVб). Предварительное изучение реакции полимеризации проводили с препаратами мембран на примере полимеризации трисахаридного производного (IVб). Инкубационная смесь в общем объеме 35 мкл содержала 15 мкл 2 М трис-малеата (рН 6,0), 5 мкл 0,1 М MgCl₂, 5 мкл (20 000 имп/мин) [¹⁴C]Man-соединения (IVб) в 0,1% растворе твина-85 и 10 мкл (200 мкг белка) препарата мембран. Контрольную пробу выдерживали 3 мин при 100° С сразу после добавления фермента, по окончании инкубации (2 ч, 27° С) смесь нагревали 3 мин при 100° С, количественно наносили на бумагу Whatman 1 в виде полоски шириной 1 см и хроматографировали восходящим способом в системе EtOH — 1 М AcONH₄, рН 7,5 (7 : 3 по объему). После высушивания хроматограмму разрезали на полоски (1×1 см), которые считали в 10 мл толуольного сцинтиллятора [6]. Распределение радиоактивности представлено на рис. 3. Для изучения зависимости протекания полимеразной реакции от времени смеси, содержащей производное (IVб) (9600 имп/мин), 5 мкл (100 мкг белка) препарата мембран, 15 мкл 2 М трис-малеата, рН 6,0, и 5 мкл 0,1 М MgCl₂, инкубировали при 27° С указанное на рис. 1в время. По окончании реакции смеси обрабатывали как описано выше; суммарная радиоактивность продуктов, расположенных на хроматограмме на расстоянии 2 см от места нанесения, приведена на оси ординат рис. 1в. Изучение зависимости скорости реакции полимеризации от концентрации соединений (IVa) и (IVб) проведено по аналогичной методике с очищенными ионообменной хроматографией [10] акцепторами (IVa) и (IVб). По окончании инкубации (60 мин, 27° С) смеси обрабатывали как описано выше. Получены следующие результаты:

для соединения (IVa) [S], мкМ	0,606	1,212	1,818	3,636
$v_{\text{эксп}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,239	0,380	0,304	0,475
$v_{\text{выч}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,238	0,331	0,380	0,447
для соединения (IVб) [S], мкМ	0,485	0,970	1,454	1,938
$v_{\text{эксп}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,219	0,282	0,515	0,624
$v_{\text{выч}} \cdot 10^{-3}$, имп/мин	0,175	0,337	0,488	0,628

Кинетические параметры полимеразной реакции представлены в табл. 2.

Авторы выражают благодарность Н. А. Калинин за помощь, оказанную при выделении бактериального полипренилфосфата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Robbins P. W., Wright A. (1971) in: *Microbial Toxins* (Weinbaum G., Kadis S., Aje J. J., eds), vol. 4, pp. 351-368, Acad. Press, N. Y.—London.
2. Roden L., Schwartz M. B. (1975) in: *MTP Intern. Rev. Sci. Biochem., Ser. 1*, vol. 5, *Biochemistry of Carbohydrates* (Whelan W. J., ed.), pp. 95-152, Butterworths, London University Park Press, Baltimore.
3. Шибаев В. Н., Дружинина Т. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Кочетков Н. К. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 249-256.
4. Шибаев В. Н., Дружинина Т. Н., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 257-268.
5. Шибаев В. Н., Дружинина Т. Н., Кочетков Н. К., Кучар Ш., Бауер Ш. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 410-414.
6. Шибаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 47-56.
7. Warren C. D., Jearloz R. W. (1972) *Biochemistry*, 11, 2565-2572.
8. Mańkowsky T., Sasak W., Janczura E., Chojnacki T. (1977) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 181, 393-401.
9. Шибаев В. Н., Данилов Л. Л., Чекуничков В. Н., Кусов Ю. Ю., Кочетков Н. К. (1979) *Биоорганическая химия*, 5, 308-310.
10. Osborn M. J., Cynkin M. A., Gilbert J. M., Müller L., Singh M. (1972) in: *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan N. O., eds), vol. 28 (*Complex Carbohydrates*, part B), pp. 583-601, Acad. Press, N. Y.—London.
11. Hammes W. P., Neuhaus F. C. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 3140-3150.
12. Kanegasaki S., Wright A. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 67, 951-958.
13. Мейссл Д., Мейссл Э. (1967) *Экспериментальная микробиология*, с. 47, «Мир», М.
14. Pflitzner K. S., Moffatt J. G. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, 5661-5670.
15. Bernstein R. L., Robbins P. W. (1965) *J. Biol. Chem.*, 240, 391-397.
16. Folch J., Less M., Sloane-Stanly G. H. (1962) *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
17. Bray G. A. (1960) *Anal. Biochem.*, 1, 279-285.
18. Wilkinson G. N. (1964) *Biochem. J.*, 80, 324-332.

Поступила в редакцию
18.IV.1979г.

SPECIFICITY OF THE ENZYMES OF SALMONELLA O-ANTIGEN BIOSYNTHESIS. 4. THE REACTION KINETICS FOR *S. ANATUM* O-ANTIGEN BIOSYNTHESIS ON EXOGENOUS DERIVATIVES OF BACTERIAL POLYPRENOL AND MORAPRENOL

KUSOV Yu. Yu., KISELEVA E. V., DANILOV L. L., SHIBAEV V. N.,
KOCHETKOV N. K., ROZHNOVA S. Sh., KILESSO V. A.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow; Central Research Institute of Epidemiology,
Ministry of Health of the USSR, Moscow*

Exogenously added moraprenyl phosphate and moraprenyl sugar pyrophosphates may serve as efficient substrates for the enzymes of *S. anatum* O-specific polysaccharide biosynthesis. The kinetic data show slight differences in the specificity of the enzymes towards the structure of polyprenol moiety of lipid intermediates. The apparent K_m values for the first enzymic reaction catalyzed by galactosyl phosphate transferase are about 100-fold higher than those of the other reactions of biosynthetic cycle. This suggests that the rate of the whole process in vitro is controlled by the free polyprenyl phosphate concentration. Synthetic moraprenyl pyrophosphate galactose is a good acceptor of rhamnose in the rhamnosyl transferase reaction.