

Н. Д. Габриелян, Е. Б. Лапина, Ю. Ю. КУСОВ, В. Н. ШИБАЕВ,  
ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

**СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЯДА ФЕРМЕНТОВ ГЛЮКОЗИЛИРОВАНИЯ  
ОТНОСИТЕЛЬНО СТРУКТУРЫ ОСТАТКА ГЕКСОЗЫ  
В УРИДИНДИФОСФАТГЛЮКОЗЕ**

Катализируемый ферментами перенос остатка моносахарида с нуклеозиддифосфатсахаров является основным путем синтеза природных гликозидов, олиго- и полисахаридов (см. обзор <sup>(1)</sup>). Ферменты гликозилирования обычно весьма специфичны к структуре переносимого остатка моносахарида, что обеспечивает необходимую точность биосинтеза. Неизвестны случаи, в которых аналог нуклеозиддифосфатсахара, отличающийся от природного субстрата конфигурацией хотя бы у одного из асимметрических центров переносимого остатка сахара, мог бы участвовать в ферментативных реакциях гликозилирования.

Эта специфичность не является, однако, абсолютной. Как установлено в работах <sup>(2-4)</sup>, ряд ферментов гликозилирования может использовать УДФ-2-дезоксиглюкозу (т. е. уридин-5'-дифосфат) вместо УДФ-глюкозы, и, таким образом, удаление гидроксильной группы у C<sub>(2)</sub>-остатка глюкозы не приводит к потере субстратных свойств. Осуществленный недавно синтез аналогов УДФ-глюкозы, лишенных гидроксильной группы у C<sub>(6)</sub>, C<sub>(1)</sub> и C<sub>(3)</sub> (см. соответственно работы <sup>(5-7)</sup>) остатка гексозы, позволяет выяснить вопрос о том, в какой степени необходимы эти гидроксильные группы для способности УДФ-глюкозы участвовать в ферментативных реакциях гликозилирования.

В настоящем сообщении мы описываем результаты, полученные при исследовании взаимодействия трех упомянутых выше аналогов УДФ-глюкозы с тремя ферментами гликозилирования: сахарозосинтетазой из проростков гороха (УДФ-глюкоза: фруктоза-2-глюкозилтрансфераза, КФ 2.4.1.13), арбутинсинтетазой из зародышей пшеницы (УДФ-глюкоза: дифенол-глюкозилтрансфераза) и синтетазой гликогена из печени крыс (УДФ-глюкоза: α-глюкан-глюкозилтрансфераза, КФ 2.4.1.11). Сахарозосинтетазы была очищена как описано в <sup>(8)</sup>; концентрация исследуемых аналогов превышала величину константы Михаэлиса для УДФ-глюкозы в 2—3 раза. Количество образовавшегося дисахарида определялось колориметрической реакцией с 2-тиобарбитуровой кислотой <sup>(9)</sup>. Инкубационную смесь, содержащую в 0,2 мл 3 μмоля фруктозы, 0,6—2,0 μмоля нуклеотида, 600 μг белка ферментного препарата и 0,11 ммоль трис-НСl-буфера рН 7,2, выдерживали 60 мин. при 37°. Добавляли 0,2 мл 1 N NaOH; инкубировали 15 мин. при 100°; доводили объем пробы водой до 1 мл; добавляли 1 мл 0,03 M раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и 1 мл концентрированной HCl. Нагревали 6 мин. при 100°; оптическую плотность измеряли при 432 мμ.

Полученные результаты сведены в табл. 1; из рассмотрения ее видно, что в случае УДФ-3-дезоксиглюкозы реакции гликозилирования не происходит, а из УДФ-6-дезоксиглюкозы и УДФ-4-дезоксиглюкозы образуются заметные количества фруктозосодержащих дисахаридов. Последнее подтверждено также хроматографией на бумаге; после обессоливания инкубационной смеси и хроматографии в системе *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:2) удается обнаружить вещество, подвижность которого соответствует подвижности дисахарида.

Протекание реакции, катализируемой арбутинсинтетазой (<sup>10</sup>, <sup>11</sup>), контролировалось с помощью хроматографии на бумаге в системе *n*-бутанол — вода (86 : 14). Помимо нуклеотидов (0,2  $\mu$ моля), смесь содержала в 0,2 мл: 1,0  $\mu$ моль гидрохинона, 0,15  $\mu$ моля цистеина, 0,15  $\mu$ моля трилона Б, 2,1 мг ферментного белка и 0,1  $\mu$ моля трис-малеатного буфера рН 6,5. После выдерживания в течение 30 мин. при 37° добавляли 0,5 мл спирта, осадок отделяли центрифугированием, надосадочную жидкость концентрировали в вакууме и количественно наносили на хроматограмму. Вещества обнаруживали с помощью реактива Фолина. При реакции с

Таблица 1

Взаимодействие УДФ-глюкозы и ее аналогов с сахарозинтетазой из проростков гороха

Нуклеотид	Концентрация, $\mu$ мол.	Оптическая плотность при 432 м $\mu$
УДФ-глюкоза	3,85	1
УДФ-6-дезоксиглюкоза	4	0,13
УДФ-4-дезоксиглюкоза	3,70	0,20
УДФ-3-дезоксиглюкоза	4,10	~0,01
То же	6	~0,01

УДФ-6-дезоксиглюкозой происходит образование значительных количеств гликозида, подвижность которого на бумаге соответствует ожидаемой подвижности для моно- (6-дезоксиглюко-пиранозил)-гидрохинона ( $R_{\text{гидрохинона}} = 0,5$ ). При использовании в качестве субстратов УДФ-4-дезоксиглюкозы и УДФ-3-дезоксиглюкозы ожидаемый продукт реакции не был обнаружен.

Гликогенсинтетаза была получена по методу работы (<sup>12</sup>); протекание реакции контролировалось по накоплению УДФ, определяемого с помощью фосфоенолпируваткиназы (<sup>12</sup>). Инкубационную смесь, содержащую в 0,2 мл, помимо нуклеотида, 5 мг гликогена, 0,5  $\mu$ моля глюкозо-6-фосфата, 670  $\mu$ г белка ферментного препарата и 0,75  $\mu$ моля глицинового

Таблица 2

Взаимодействие УДФ-глюкозы и ее аналогов с гликогенсинтетазой из печени крыс

Нуклеотид	Концентрация, $\mu$ мол.	Оптическая плотность при 520 м $\mu$	Относительная скорость
УДФ-глюкоза	4,90	1,340	1,00
УДФ-6-дезоксиглюкоза	4,00	0,400	0,28
УДФ-4-дезоксиглюкоза	4,95	0,010	~0,01
УДФ-3-дезоксиглюкоза	4,10	0,010	~0,01

буфера рН 8,75, выдерживали 15 мин. при 37°. Нагревали 2 мин. при 100°, добавляли 0,025 мл 0,01 *M* раствора циклогексиламмониевой соли фосфоенолпировиноградной кислоты в 0,4 *M* растворе KCl, затем 0,025 мл раствора фосфоенолпируваткиназы (<sup>12</sup>) в 0,1 *M* растворе сульфата магния. Через 15 мин. при 37° добавляли 0,2 мл 0,1% раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 *N* HCl, через 5 мин. 0,4 мл 10 *N* раствора NaOH и 2,2 мл этанола. Измеряли оптическую плотность при 520 м $\mu$ .

Из данных табл. 2 можно видеть, что УДФ-6-дезоксиглюкоза способна в заметной степени участвовать в наращивании углеводной цепи полисахарида, в то время как для УДФ-4-дезоксиглюкозы и УДФ-3-дезоксиглюкозы заметного переноса остатка сахара не происходит. Суммируя полученные результаты, можно отметить существование некоторой общности в специфичности к остатку гексозы различных ферментов глюкозилрования.

По-видимому, наиболее важное значение для взаимодействия УДФ-глюкозы с ферментами этого класса имеет гидроксильная группа у C<sub>(3)</sub>-остатка сахара. Удаление ее полностью лишает аналог субстратных

свойств. Интересно, что подобные же требования к структуре субстрата предъявляют УДФ-глюкоза-4-эпимеразы из печени телят и проростков маша (<sup>12</sup>). Гипотеза о вторичной структуре нуклеозиддифосфатсахаров (<sup>13</sup>) (согласно которой необходимой предпосылкой для взаимодействия этих соединений с ферментами является образование специфической скрученной конформации нуклеозиддифосфатсахара) предсказывает существенное значение гидроксильных групп у C<sub>(2)</sub>- и C<sub>(3)</sub>-остатка гексозы для субстратных свойств. Это предсказание не оправдалось (<sup>2-4</sup>) в случае гидроксильной группы у C<sub>(2)</sub>, однако весьма существенное значение гидроксила у C<sub>(3)</sub> кажется полностью соответствующим этой концепции.

Наименьшее значение для взаимодействия УДФ-глюкозы с ферментами гликозилирования имеет гидроксильная группа у C<sub>(6)</sub>-остатка гексозы, так как ни в одной из исследованных реакций удаление этой гидроксильной группы не приводило к полной потере субстратных свойств аналога. УДФ-6-дезоксиглюкоза является также субстратом для УДФ-глюкоза-4-эпимеразы из проростков маша, но не для одноименного фермента из печени телят (<sup>13</sup>). Гидроксильная группа у C<sub>(4)</sub>-остатка гексозы имеет различное значение для различных ферментов. УДФ-4-дезоксиглюкоза является довольно хорошим субстратом сахарозосинтетазы, однако неспособна вступать не только в реакцию, катализируемую гликогенсинтетазой (как можно было ожидать, так как включение остатка 4-дезоксиглюкозы в полисахаридную цепь блокирует дальнейшее наращивание этой цепи), но и в реакцию синтеза фенольных гликозидов.

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

Поступило  
29 I 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> W. Z. Hassid, *Science*, **165**, 137 (1969). <sup>2</sup> V. Farkaš, P. Biely, S. Bauer, *Biochim. et biophys. acta*, **165**, 63 (1968). <sup>3</sup> P. Biely, V. Farkaš, S. Bauer, *Biochim. et biophys. acta*, **158**, 487 (1968). <sup>4</sup> V. Farkaš, S. Bauer, J. Zemek, *Biochim. et biophys. acta*, **184**, 77 (1969). <sup>5</sup> Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1969**, 1136. <sup>6</sup> Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1970**, 404. <sup>7</sup> В. Н. Шibaев, Ю. Ю. Кусов и др., *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1969**, 2522. <sup>8</sup> Н. Д. Габриэлян, Н. Б. Козлова, *Биохимия*, **31**, 760 (1966). <sup>9</sup> F. Percheron, *C. R.*, **255**, 2521 (1962). <sup>10</sup> T. Yamaha, C. E. Cardini, *Arch. Biochem. and Biophys.*, **86**, 127 (1960). <sup>11</sup> Н. Д. Габриэлян, А. В. Венкина, *ДАН*, **165**, 439 (1965). <sup>12</sup> L. F. Leloir, S. H. Goldemberg, *J. Biol. Chem.*, **235**, 919 (1960). <sup>13</sup> Т. Н. Дружинина, М. А. Новикова, В. Н. Шibaев, *Биохимия*, **34**, 518 (1969). <sup>14</sup> Н. К. Кочетков, Э. И. Будовский, В. Н. Шibaев, *Биохимия*, **28**, 741 (1963).