

УДК: 577.151.35:572.152.9:577.125.5:616.993.161

Метаболизм D-арабинозы: характеристика бифункциональной арабинокиназы/ пирофосфорилазы *Leishmania major*

Н.М. Новожилова*, Н.В. Бовин

Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: nnovogilov@gmail.com

РЕФЕРАТ Арабиноза входит в состав биологически важных гликоконъюгатов клеточной поверхности многих бактерий, простейших и растений. В составе природных соединений этот моносахарид находится преимущественно в виде L-арабинофуранозы, в то время как форма D-арабинопиранозы (D-Агар) встречается крайне редко. Только паразитирующие простейшие рода *Leishmania* (возбудители лейшманиоза – заболевания кожи и внутренних органов млекопитающих, в т.ч. и человека), на определенных стадиях жизненного цикла используют D-Агар в качестве важного компонента гликоконъюгатов, необходимых для их вирулентности [1]. Биосинтез D-Агар практически не изучен, и, так как этот сахар отсутствует в клетках млекопитающих, его изучение может дать ключ к созданию лекарств против лейшманиоза. Известно, что донором D-Агар в биосинтезе гликоконъюгатов *Leishmania* и *Crithidia* является GDP-D-Агар [2]. Настоящая работа направлена на изучение биосинтеза D-Агар на стадии активации моносахарида до GDP-D-Агар и характеристики необычного фермента из *L.major*, который оказался арабинокиназой-пирофосфорилазой, т.е. способен синтезировать GDP-D-Агар из D-Агар через промежуточный D-арабино-1-фосфат в присутствии АТФ и ГТФ. В данной работе также сделана попытка установить, какой из белков-переносчиков транспортирует GDP-D-Агар в люмен аппарата Гольджи, где происходит синтез арабинозосодержащих гликоконъюгатов клеточной поверхности *Leishmania*.

Ключевые слова: D-арабинопираноза, *Leishmania*, бифункциональный фермент, киназа, пирофосфорилаза, липофосфогликан.

Список сокращений: D-Агар – D-арабинопираноза; L-Фус – L-фукоза; K_m – константа Михаэлиса-Ментен; V_{max} – максимальная скорость реакции.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что бактерии (род *Bacteriodes*) и растения (род *Arabidopsis*) могут синтезировать GDP-L-Fuc из L-фукозы (L-Fuc) через промежуточный L-фукозо-1-фосфат с помощью бифункционального фермента L-фукокиназы/GDP-L-фукозопирофосфорилазы [3,4]. Т.к. D-Агар и L-Fuc являются структурно родственными моносахаридами, представлялось логичным, что биосинтез GDP-D-Агар у *Leishmania* может протекать по механизму, схожим с биосинтезом GDP-L-Fuc у других организмов. Чтобы проверить это предположение, геном *L.major* был изучен на наличие открытых рамок считывания, гомологичных участкам генов фукокиназы и GDP-L-фукозопирофосфорилазы. В результате были обнаружены два почти идентичных гена (*lmjF16.0440* и *lmjF16.0480*), обладающие высокой схожестью с генами *fkp Bacteriodes fragilis* и *at1g01220 Arabidopsis thaliana*, кодирующими L-фукокиназы/GDP-L-фукозопирофосфорилазы [3, 4].

Открытые рамки считывания *lmjF16.0440* и *lmjF16.0480* соответствуют предполагаемым полипептидам, состоящим из 1187 аминокислот, с расчетной молекулярной массой 126.5 кДа. Единственным различием (три аминокислотных остатка) между двумя белками является участок 196–199,

а именно PheGlnAsnHis для *lmjF16.0480* и LeuGlnAspGyr для *lmjF16.0440*. На N-концах этих белков находится высококонсервативный участок Val100–Lys117, который обладает высоким сходством с консервативным мотивом пирофосфорилаз, Lys(X)₂GlyXThrXMet(X)₄Lys [5]. На C-концах также находится консервативный участок Gly950–Phe958, гомологичный мотиву GlyXGly(X)₂Gly(Ser)₂Gly, формирующему АТФ-связывающий карман у многих киназ [6]. Присутствие этих консервативных последовательностей дало основание предполагать наличие киназной и пирофосфорилазной активностей на C- и N-концах белков, соответственно.

Таблица 1. Кинетические параметры сродства к субстрату рекомбинантных ферментов *lmjF16.0440* и *lmjF16.0480*

Фермент	Субстрат	K_m (mM)	V_{max} (μM/L/min)
<i>lmjF16.0440</i>	D-арабиноза	1.23	0.35
	D-арабинозо-1-фосфат	–	–
<i>lmjF16.0480</i>	D-арабиноза	2.90	0.50
	D-арабинозо-1-фосфат	67.0	160.0

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для тестирования активности предполагаемых ферментов гены *lmjF16.0440* и *lmjF16.0480* были клонированы в плазмидный вектор pET16b. Рекомбинантные LmjF16.0440 и LmjF16.0480 были экспрессированы в клетках *E.coli* BL21 (DE3)-RIPL и протестированы на наличие ферментативной активности, результаты представлены на рис. 1. Белок LmjF16.0480 катализировал образование D-Arap-фосфата и GDP-D-Arap, в то время как LmjF16.0440 синтезировал только D-Arap-фосфат. Когда в реакционной смеси присутствовали только неспецифические белки, полученные из клеток *E.coli*, трансформированных пустым вектором pET 16b, образование продуктов реакции не наблюдалось. Полученные данные позволяют заключить, что продукт гена *lmjF16.0480* действительно действует как бифункциональная арабинокиназа-пирофосфорилаза, т.е. обладает D-арабинокиназной и GDP-D-Arap-пирофосфорилазной активностями, в то время как рекомбинантный белок LmjF16.0440 обладает только D-арабинокиназной активностью.

Чтобы подтвердить необходимость АТФ для киназной и GTP для пирофосфорилазной активностей изучаемых белков, ферментативные реакции проводили в присутствии только одного из трифосфатов. В отсутствие как АТФ, так и GTP образования продуктов реакции не наблюдалось. В присутствии только АТФ реакция шла не полностью, и приводила только к арабинозо-фосфату. Когда в реакционной смеси находился только GTP, образовывались небольшие количества GDP-D-Arap, по-видимому, благодаря тому, что фермент был способен частично утилизировать GTP вместо АТФ. Однако в присутствии только GTP реакция шла медленно, и выход продуктов реакций был низким, по сравнению с реакцией в присутствии АТФ + GTP. Таким образом, для протекания полноценной реакции необходимо присутствие в реакционной среде обоих трифосфатов: АТФ для киназной и GTP для пирофосфорилазной активности исследуемых бифункциональных ферментов.

Для рекомбинантных LmjF16.0440 и LmjF16.0480 были измерены кинетические параметры, а именно константы Михаэлиса-Ментен (K_m) и максимальная скорость реакции (V_{max}). В табл. 1 приведены параметры для каждой реакции с участием обоих ферментов. Как киназы, оба фермента ведут себя схожим образом. Обращает на себя внимание необычно большое значение $K_m = 67$ мМ для пирофосфорилазной реакции, катализируемой LmjF16.0480. Такое низкое сродство к арабинозо-фосфату может свидетельствовать о том, что в ферменте оба каталитических центра связаны между собой, и D-Arap-1-фосфат из киназного центра сразу попадает в пирофосфорилазный. Поэтому, для того чтобы «внешний» арабинозо-фосфат достиг пирофосфорилазного активного центра, потребовалось добавление его значительных количеств, что и отразилось на значении K_m .

Геном человека содержит гены, обладающие частичной гомологией с бифункциональным ферментом *Leishmania*. Например, локус NP 659496 кодирует белок, состоящий из 1185 аминокислотных остатков и обладающий 44 % гомологии на киназном С-конце, однако его N-конец не имеет значимой схожести с пирофосфорилазными доменами. Ген

был клонирован, и рекомбинантный продукт гена был проверен на способность синтезировать GDP-D-Arap. Результаты тестирования показали отсутствие активности у человеческого белка. Учитывая низкую степень гомологии N-конца человеческого белка с пирофосфорилазными доменами, отсутствие у него пирофосфорилазной активности не удивительно. Способность активировать D-арабинозу также не выявлена, несмотря на большое сходство киназного С-конца с LmjF16.0440 и LmjF16.0480.

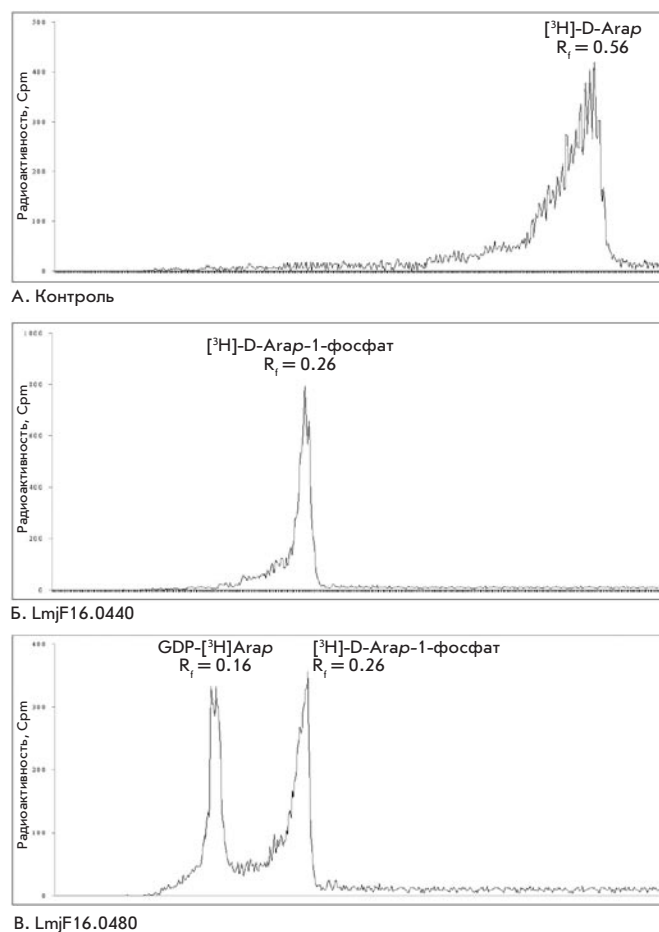


Рис. 1. Анализ продуктов ферментативной реакции. Штамм *E.coli* BL21 (DE3)-RIPL трансформировали плазмидами pET16b-LmjF16.0440(His)₆ и pET16b-LmjF16.0480(His)₆, индуцированные клетки лизировали, белки солиubilizировали 0.1 % Tween 20 и иммобилизовали на аффинном сорбенте TALON за счет гистидинового тэга на N-концах. Связанные с TALON рекомбинантные LmjF16.0440 и LmjF16.0480 тестировали на наличие ферментативной активности. Реакционная среда содержала 5 мМ АТФ, 5 мМ GTP, 5 мМ MgSO₄ и 0.15 мкCi [³H]D-Arap в качестве субстрата. Реакционную смесь инкубировали в течение ночи при 37 °С и продукты реакции разделяли на силикагельных ТСХ пластинках (1-бутанол/уксусная кислота/вода, 2 : 1 : 1). Положение тритированных продуктов реакции выявляли с помощью радиохроматографического сканера Bio Scan System 200. В контрольной смеси, содержащей только неспецифические белки, продуктов реакции не наблюдается (А). При добавлении в реакционную смесь белка LmjF16.0440 образовывался только D-Arap-фосфат (Б), в то время как фермент LmjF16.0480 синтезировал D-Arap-фосфат и GDP-D-Arap (В)

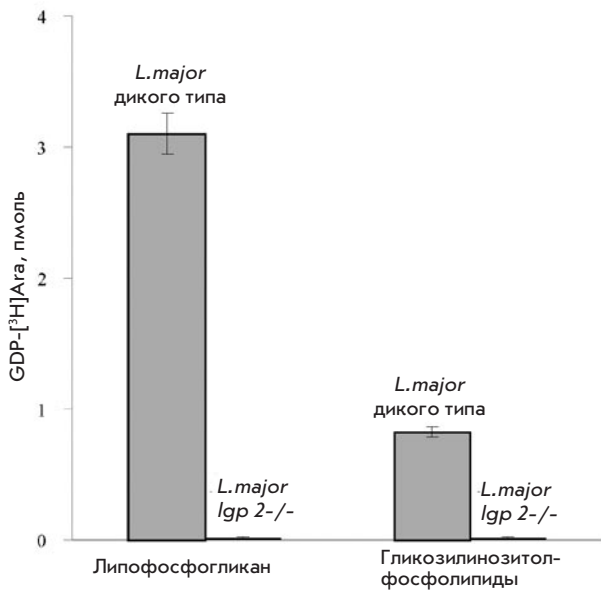


Рис. 2. Идентификация белка, ответственного за перенос GDP-D-Arap в аппарат Гольджи. Культуры *L. major* дикого типа и нокаутной по гену *lpg2* (*L. major lpg2-/-*) были метаболически мечены [³H]-D-Arap. Липофосфогликан и гликозилинозитолфосфолипиды клеточной поверхности меченых клеток были экстрагированы, как описано в [8], после чего измерено количество включенной [³H]-D-Arap. Нокаутирование гена *lpg2*, кодирующего мультиспецифичный белок-транспортёр LPG2, предотвращало включение D-Arap в состав фосфогликанов клеточной поверхности *L. major*

ВЫВОДЫ

В большинстве случаев активированные формы углеводов синтезируются в цитоплазме и затем переносятся в люмен аппарата Гольджи, где они используются соответствующими гликозилтрансферазами как доноры субстратов в реакциях гликозилирования. Ранее было доказано существование в аппарате Гольджи *Leishmania* мультиспецифичного белка-транспортёра LPG2, способного, помимо GDP-Man, также переносить GDP-D-Arap и GDP-L-Fuc [7]. Чтобы показать, что LPG2 является единственным

транспортёром, ответственным за перенос GDP-D-Arap в аппарат Гольджи, клетки *L. major* дикого типа и нокаутные по гену *lpg2* (*L. major lpg2-/-*) растили в присутствии [³H]-арабинозы, после чего измеряли количество [³H]Ara включенной в гликоконъюгаты клеточной поверхности (рис. 2). Из приведенных данных видно, что у клеток *L. major*, нокаутных по гену *lpg2*, не происходит включения [³H]-арабинозы. Отсутствие арабинозы в липофосфогликане *L. major lpg2-/-* вполне объяснимо, т.к. потеря LPG2 приводит к прекращению транспорта GDP-Man в аппарат Гольджи и, соответственно, прекращению синтеза углеводной части молекулы [9]. Таким образом, даже при наличии GDP-Arap, транспортируемой в люмен Гольджи другим белком, у арабинозил-трансфераз нет акцепторных сайтов для переноса арабинозы на липофосфогликан. Этого нельзя сказать о гликозилинозитолфосфолипидах. Гликозилирование этих молекул происходит по другому биосинтетическому пути, с использованием долихол-фосфат-маннозы в качестве донора [10], поэтому отсутствие арабинозы в составе гликозилинозитолфосфолипидов *L. major lpg2-/-* можно объяснить прекращением транспорта GDP-Arap в аппарат Гольджи в клетках, лишенных гена *lpg2*.

Таким образом, полученные данные позволяют с высокой долей вероятности предположить, что синтезируемый в цитоплазме GDP-D-Arap транспортируется в люмен аппарата Гольджи мультифункциональным белком-переносчиком LPG2. Также установлено, что находящийся в геноме *L. major* ген *lmjF16.0480* кодирует бифункциональную арабинокиназу-пирофосфорилазу, способную синтезировать GDP-D-Arap из D-Arap через промежуточную стадию D-арабино-1-фосфата при одновременном наличии ATP и GTP.

Авторы выражают свою признательность Х. Гуо (Университет Вашингтона, США) за помощь в идентификации и клонировании генов *Leishmania major* и человека, и С. Турко (Университет Кентукки, США) за помощь в обсуждении результатов. ●

Финансирование исследований осуществлялось с помощью Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McConville M., Turco S., Ferguson M., Sacks D. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 3593–3600.
- Schneider P., McConville M., Ferguson M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 18332–18337.
- Coyne M., Reinap B., Lee M., Comstock L. // Science. 2005. V. 307. P. 1778–1781.
- Kotake T., Hojo S., Tajima N., Matsuoka K., Koyama T. et al // JBC. 2008. V. 283. P. 8125–8135.
- Peneff C., Ferrari P., Charrier V., Taburet Y., Monnier C. et al // EMBO J. 2001. V. 20. P. 6191–6202.
- Hanks S., Quinn A., Hunter T. // Science. 1988. V. 241. P. 42–52.
- Hong K., Ma D., Beverley S., Turco S. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 2013–2022.
- McConville M.J., Bacic A. // JBC. 1989. V. 264. P. 757–766.
- Späth G., Lye L., Segawa H., Sacks D., Turco S. et al // Science. 2003. V. 301. P. 1241–1243.
- Ilgoutz S.C., Zawadzki J.L., Ralton J.E., McConville M.J. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 2746–2755.