



УДК 547.458'118'363.057:579.8.42.14

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *Salmonella newington* И ЕГО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Дружинина Т. П., Шубаев В. Н., Кочетков Н. К.,
Рожнова С. Ш*, Килессо В. А.*

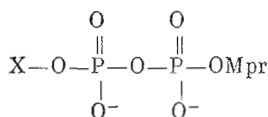
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва
* Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии
Министерства здравоохранения СССР, Москва

С препаратом мембран из *Salmonella newington* продемонстрирована полимеризация синтетического мореприенильного производного $DMan(\beta 1-4)LRha(\alpha 1-3)D[^3H]Gal$ с обращением конфигурации у C1 остатка галактозы. Продукт имеет степень полимеризации 8. Синтетические гликозилмореприенилпирофосфатные производные D -галактозы, 4-дезоксид- D -ксило-гексозы, $LRha(\alpha 1-3)DGlc$ и $LRha(\alpha 1-3)[DGlc(\alpha 1-6)]DGal$ способны участвовать в реакциях сборки повторяющегося звена и полимеризации.

Недавно в нашей лаборатории был разработан химико-ферментативный подход к синтезу О-специфических полисахаридов салмонелл [1] и их модифицированных производных [2-4]. Этот подход основан на получении предшественников полисахаридов — полипренилпирофосфатполисахаридов химическим синтезом или комбинацией химических и ферментативных методов и ферментативной полимеризации олигосахаридных звеньев предшественника. В использованных ранее штаммах салмонелл серогрупп В, Е₁ и Е₂, основная цепь О-специфического полисахарида которых построена из трисахаридных повторяющихся звеньев $Man(\alpha$ или $\beta 1-4)Rha(\alpha 1-3)Gal$ (см. обзор [5]), в процессе полимеризации образуются ($\alpha 1-2$)- или ($\alpha 1-6$)-связи между остатками галактозы и маннозы, т. е. α -конфигурация при C1 остатка галактозы повторяющегося звена в полипренилпирофосфатном производном сохраняется при полимеризации. В близкородственных штаммах салмонелл серогруппы Е₂ (например, *Salmonella newington*) О-специфический полисахарид построен из трисахаридных звеньев, идентичных звеньям полисахарида бактерий серогруппы Е₁, но полимеризация протекает с обращением конфигурации у C1 остатка галактозы и в результате ее образуется ($\beta 1-6$)-связь [5].

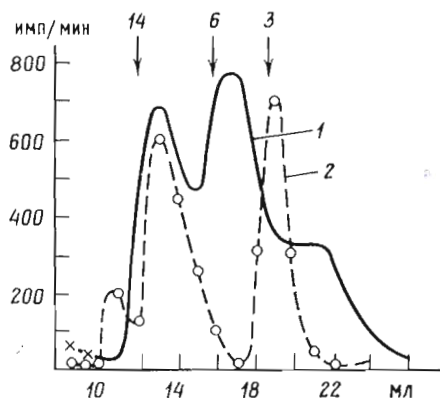
Важно было установить, сопровождается ли изменение стереонаправленности реакции полимеризации с помощью полимеразы *S. newington* изменением ее специфичности к структуре полипренилпирофосфаттрисахаридов — субстратов реакции.

В настоящей работе мы исследовали ферментативную полимеризацию олигосахаридного звена полипренилпирофосфаттрисахаридов (I), который соответствовал по структуре предшественнику О-специфических полисахаридов салмонелл серогруппы Е и был получен химическим синтезом [1]. Далее была изучена ферментативная полимеризация нескольких аналогов производного (I), для получения которых было использовано ферментативное гликозилирование синтетических полипренилпирофосфатсахаров (II) — (VI) [6-9], которые можно рассматривать как модифицированные производные моно- или дисахаридных предшественников (I).



- (I) X = $DMan(\beta 1-4)LRha(\alpha 1-3)D[^3H]Gal\alpha 1-$
- (II) X = $D4dGlc\alpha 1-$
- (III) X = $DGal\alpha 1-$
- (IV) X = $LRha(\alpha 1-3)DGlc\alpha-$
- (V) X = $LRha(\alpha 1-3)[DGlc(\alpha 1-6)]DGal\alpha 1-$
- (VI) X = $DGlc\alpha 1-$
- (VII) X = $DGal\alpha 1-$

Распределение радиоактивности при гель-фильтрации на сефадексе G-15 углеводного фрагмента продуктов полимеризации синтетического производного (I) (1) и (X) (2). Стрелками отмечены объемы выхода стандартных олигосахаридов с указанной степенью полимеризации



При инкубации производного (I), меченного тритием по остатку галактозы, с препаратом мембран из *S. newington* мы наблюдали превращение трисахаридного компонента в продукты полимеризации. По данным гель-фильтрации на сефадексе G-15 углеводных компонентов, полученных из морапренилпирофосфатных производных после мягкого кислотного гидролиза, продуктами полимеризации были гекса- и более высокомолекулярные олигосахариды (рисунок) с общим выходом 80%.

Для высокомолекулярной углеводной фракции определили степень полимеризации после ее восстановления NaBH_4 , полного кислотного гидролиза и разделения $[^3\text{H}]$ дульцита и $[^3\text{H}]$ галактозы. Отношение $[^3\text{H}]$ галактозы к $[^3\text{H}]$ дульциту оказалось равным 6,9, что соответствует полисахаридной цепи из 8 повторяющихся звеньев. Определение конфигурации при C1 остатка галактозы в полимерном продукте проводили по следующей схеме: полимерную фракцию, выделенную после гель-фильтрации на сефадексе G-15, подвергали частичному кислотному гидролизу, при котором расщепляются преимущественно рамнозидные связи. Повторной гель-фильтрацией выделяли из продуктов гидролиза фракцию трисахарида, который оказался устойчивым к действию α -галактозидазы, но расщеплялся β -галактозидазой. При этом единственным радиоактивным продуктом оказалась галактоза, идентифицированная хроматографией на бумаге в системе А. Следовательно, полимеризация синтетического трисахаридного производного (I) сопровождалась обращением конфигурации у C1 остатка галактозы при образовании полимерной цепи, характерной для *S. newington*.

Оценку способности синтетических производных (II)–(VI) служить субстратами в реакциях сборки повторяющегося звена с гликозилтрансферазами и далее в реакции полимеризации проводили в условиях, аналогичных описанным ранее [1, 2].

Производные (II)–(IV) при взаимодействии с нуклеотидсахарами под действием ферментов препарата растворимых гликозилтрансфераз достраивались до производных аналогов повторяющегося звена и превращались в соответствующие $[^{14}\text{C}]$ Man-содержащие морапренилпирофосфаттрисахариды (VIII)–(X) (табл. 1). Разветвленное производное (V) также оказалось способным служить акцептором остатка маннозы. Эффективность включения $[^{14}\text{C}]$ Man во фракцию полипренилпирофосфатолигосахаридов с производными (II)–(V) ниже, чем с производным (VII), содержащим природный сахар.

Эта серия экспериментов показывает, что ферменты сборки повторяющегося звена из *S. newington* мало чувствительны к конфигурации у C2 и наличию OH-группы у C4 остатка галактозы. Влияние конфигурации у C4 остатка галактозы различно для рамнозил- и маннозилтрансфераз. Полипренилпирофосфатсахар, содержащий остаток глюкозы в производном (VI), не может служить акцептором остатка маннозы, но, находясь в субтерминальном положении, как в дисахаридном фрагменте производного (IV), остаток глюкозы не мешает ферментативному маннозилрованию и глюкоза оказывается включенной в трисахаридное звено (X). Такие

Перенос [^{14}C]Man из GDP-[^{14}C]Man на морапренилпирофосфатгликозильные акцепторы в присутствии препарата растворимых гликозилтрансфераз из *S. newington*

Производное морапренола (20 нмоль)	Нуклеотидсахара в инкубационной смеси (по 25 нмоль)	Полученный морапренилпирофосфаттрисахарид *	Радиоактивность (имп./мин) липид-олигосахаридной фракции
(II)	dTDP-Rha, GDP-[^{14}C]Man	(VIII)	1400
(III)	dTDP-Rha, GDP-[^{14}C]Man	(IX)	1400
(IV)	GDP-[^{14}C]Man	(X)	3000
(V)	GDP-[^{14}C]Man	(XI)	3400
(VI)	dTDP-Rha, GDP-[^{14}C]Man	—	100
(VII)	dTDP-Rha, GDP-[^{14}C]Man		5000

* См. табл. 2.

Таблица 2'

Выход полимерных продуктов при ферментативной полимеризации морапренилпирофосфатолигосахаридов

Субстрат полимеризации		Радиоактивность, имп./мин	Выход полимерного продукта, % *
(I)	Man-Rha-[^3H]Gal-PP-Mpr	18 000	80
(VIII)	[^{14}C]Man-Rha-4dGlc-PP-Mpr	2 800	50
(IX)	[^{14}C]Man-Rha-Tal-PP-Mpr	4 700	60
(XI)	[^{14}C]Man-Rha-(Glc)Gal-PP-Mpr	6 500	50
(X)	[^{14}C]Man-Rha-Glc-PP-Mpr	2 000	60

* Выход полимерного продукта рассчитывали по данным гель-фильтрации на сефадексе как отношение радиоактивности фракций гексасахаридов и высших полимеров ко всей радиоактивности, обнаруженной в элюате.

же особенности акцепторной специфичности отмечались нами для ранее изученных штаммов салмонелл [2, 3].

Модифицированные олигосахаридные производные (VIII)–(XI), полученные с акцепторами (II)–(V), под действием препарата мембран превращались в полимерные продукты (рисунок) с выходом 50–80% (табл. 2). Для полимера (XII), полученного из субстрата (X) и содержащего вместо остатка *D*-галактозы остаток *D*-глюкозы, а также для разветвленного полимера (XIII), полученного из производного (XI), определены конфигурации при C1 остатков *D*-галактозы и *D*-глюкозы с помощью специфических гликозидаз по схеме, описанной выше для нормального полимера. Трисахаридный фрагмент Glc-[^{14}C]Man-Rha, образовавшийся при частичном гидролизе полисахарида (XII), не расщепляется под действием α -глюкозидазы. После обработки β -глюкозидазой хроматографией на бумаге обнаружили радиоактивный продукт с подвижностью, соответствующей подвижности дисахаридов Man-Rha. Тетрасахарид Glc(α 1-6)Gal-[^{14}C]Man-Rha, полученный из разветвленного полимера (XIII), под действием α -глюкозидазы превращался в трисахарид (R_{Gal} 0,63 в системе А), который, как и в случае нормального полимера, был устойчив к действию α -галактозидазы и расщеплялся β -галактозидазой. Эти результаты демонстрируют, что стереонаправленность ферментативной полимеризации не изменяется и при использовании аналогов природного трисахаридного повторяющегося звена.

Изложенные данные показывают, что химико-ферментативный подход к синтезу бактериальных полисахаридов и их модифицированных производных может быть применен и в тех случаях, когда реакция ферментативной полимеризации протекает с обращением конфигурации у C1 моносахаридного остатка, находящегося «в голове» повторяющегося звена; чувствительность полимеразы к модификации этого остатка не отличается заметно от ранее описанных случаев.

Экспериментальная часть

В работе использовали культуру штамма *S. newington* (0:3, 15, H:e, h, 1,6), полученную из музея Государственного института контроля и стандартизации медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Микробная взвесь штамма выращивалась на пептонной воде с дрожжевым экстрактом в течение 18 ч при 37° С [10]. Препараты мембран и растворимых гликозилтрансфераз получали как описано ранее [11].

Субстраты. Использовали GDP-[¹⁴C]Man (10 мКи/ммоль), полученную разбавлением GDP-[¹⁴C]Man (308 мКи/ммоль, Amersham, Англия) нерадиоактивной GDP-Man (Calbiochem, Швейцария), TDP-Rha, выделенную по методике [12], и мораренилфосфат, синтезированный по методу [13]. Синтез трисахаридного производного мораренола (I) описан в работе [4], модифицированных полипренилпирофосфатсахаров — в работах [6—9].

Хроматографию на бумаге Whatman I проводили в системе *n*-бутанол — пиридин — вода, 6:4:3 (система А). Гель-фильтрацию полисахаридов осуществляли на колонке (35×1,5 см) с сефадексом G-15 в воде. Полисахарид отщепляли от липидного фрагмента гидролизом в течение 30 мин в 0,5 н. уксусной кислоте при 100° С, частичный гидролиз полисахаридов проводили 30 мин в 0,2 н. HCl при 100° С. Восстановленный полимер, полученный из производного (I), гидролизовали 4 ч в 2 н. HCl при 100° С, [³H]дульцит и [³H]галактозу разделяли на ионообменной колонке (6,6×45 см) Durrum DA×4 в 0,5 М боратном буфере, pH 8,6, при 80° С. Использовали гликозидазы: α-галактозидазу из кофейных зерен (КФ 3.2.1.22, Sigma, США), β-галактозидазу из кишечника цыплят (КФ 3.2.1.23), α-глюкозидазу из риса (КФ 3.2.1.20, Serva, ФРГ) и β-глюкозидазу из сладкого миндаля (КФ 3.2.1.21, Serva, ФРГ).

Общие методики проведения ферментативных реакций с использованием препарата растворимых гликозилтрансфераз и препарата мембран были аналогичны описанным ранее для *S. anatum* [1, 2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Шibaев В. Н., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Мальцев С. Д., Данилов Л. Л., Торгов В. И., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 564—565.
2. Кочетков Н. К., Шibaев В. Н., Дружинина Т. Н., Гоглашвили Л. М., Данилов Л. Л., Торгов В. И., Мальцев С. Д., Уткина Н. С. Докл. АН СССР, 1982, т. 262, № 6, с. 1393—1397.
3. Shibaev V. N., Danilov L. L., Druzhinina T. N., Gogilashvili L. M., Maltsev S. D., Kochetkov N. K. FEBS Lett., 1982, v. 139, № 2, p. 177—180.
4. Шibaев В. Н., Дружинина Т. Н., Гоглашвили Л. М., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 4, с. 897—899.
5. Nikaido H. In: Bacterial membranes and walls/Ed. Leive L. N. Y.: M. Decker, 1973, p. 131—208.
6. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шibaев В. Н., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 109—113.
7. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 88, № 2, p. 203—211.
8. Мальцев С. Д., Юрченко Н. Н., Данилов Л. Л., Шibaев В. Н. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1097—1100.
9. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шibaев В. Н., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1718—1722.
10. Мейкел Дж., Мейкел Э. В кн.: Экспериментальная микробиология. М.: Мир, 1967, с. 63.
11. Шibaев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 1, с. 47—56.
12. Шibaев В. Н., Уткина Н. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1778—1781.
13. Вергунова Г. И., Глуходед И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 1, с. 1484—1492.

Поступила в редакцию
3.IV.1984

CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF *Salmonella newington*
O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE AND ITS MODIFIED DERIVATIVES

DRUZHININA T. N., 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 Public Health of the USSR, Moscow*

Treatment of the $DMan(\beta 1-4)LRha(\alpha 1-3)D[{}^3H]Gal$ -derivative of moraprenyl pyrophosphate with the cell envelope preparation from *S. newington* results in the formation of polysaccharide with $\beta 1-6$ linkage between the trisaccharide units (polymerization degree ~ 8). The synthetic derivatives of moraprenyl pyrophosphate which contain *D*-talose, 4-deoxy-*D*-xylo-hexose, $LRha(\alpha 1-3)DGlc$ or $LRha(\alpha 1-3)DGlc(\alpha 1-6)DGal$ were found to serve as substrates for the biosynthesis of the corresponding modified polysaccharides.