



УДК 547.458'148'915.5.057:579.842.14:577.124.5

СИНТЕЗ МОРАПРЕНИЛПИРОФОСФАТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3-О- α -L-РАМНОПИРАНОЗИЛ-(4-О- α -D- ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)- α -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗЫ И 3-О- α -L-РАМНОПИРАНОЗИЛ-(4-О- β -D- ГЛЮКОПИРАНОЗИЛ)- α -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗЫ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ В РЕАКЦИЯХ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

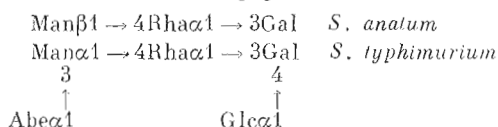
SALMONELLA TYPHIMURIUM
и *SALMONELLA ANATUM*

Торгов В. И., Дружинина Т. Н., Нечаев О. А.,
Жубаев В. Н.

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

Осуществлены синтез трисахаридов Rha α 1 \rightarrow 3(Glc α 1 \rightarrow 4)Gal и Rha α 1 \rightarrow 3(Glc β 1 \rightarrow 4)Gal и их превращение в соответствующие α -гликозилфосфаты и морапренилпирофосфаттрисахариды. Показано, что последние способны служить субстратами в реакции маниозилирования с ферментами из *Salmonella typhimurium* и *Salmonella anatum*, а образующиеся полипренилпирофосфаттетрасахариды вступают в реакцию ферментативной полимеризации, приводящую к соответствующим полисахаридам.

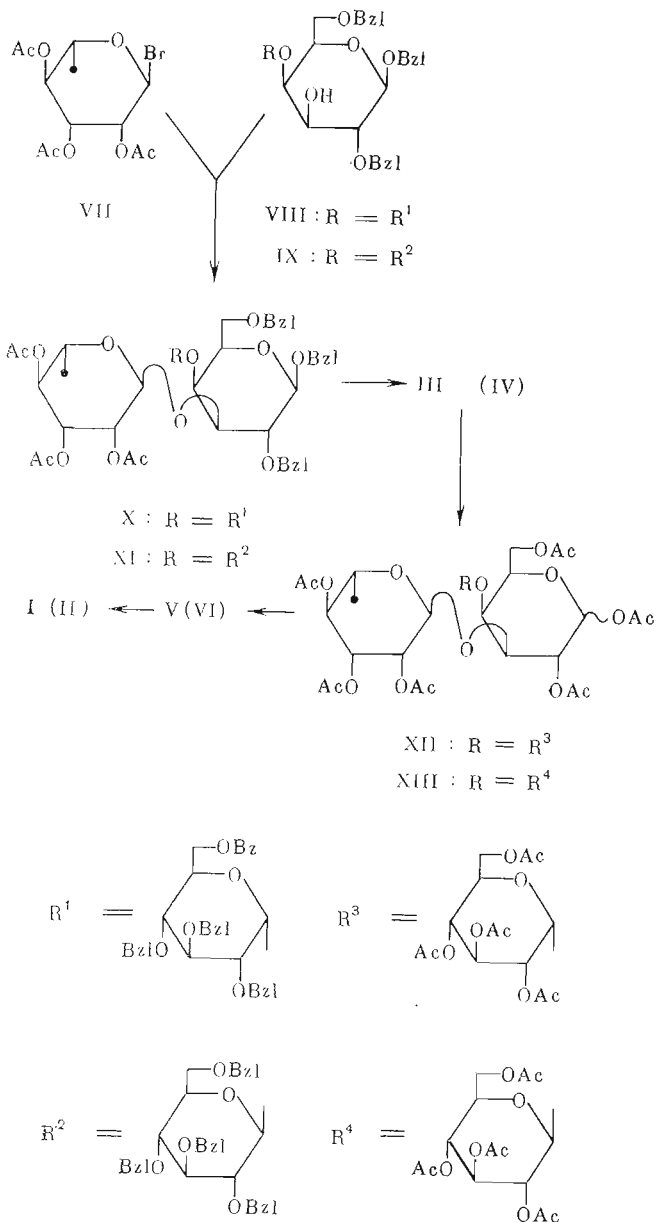
О-Антигенные полисахариды грамотрицательных бактерий *Salmonella anatum* и *S. typhimurium* построены соответственно из три- и пентасахаридных повторяющихся звеньев, связанных α 1 \rightarrow 6- и α 1 \rightarrow 2-связями между остатками D-галактозы и D-маннозы [1]:



Было показано [2], что в обоих штаммах сборка цепи при биосинтезе начинается с образования полипренилпирофосфатгалактозы, к которой далее последовательно присоединяются остатки рамнозы и маннозы. Образовавшиеся полипренилпирофосфаттрисахариды далее полимеризуются до соответствующих линейных полисахаридов. По имеющимся данным [3], введение остатков α -D-глюкозы в боковые цепи полисахарида из *S. typhimurium* происходит после реакции ферментативной полимеризации и полипренилпирофосфаттрисахарид, соответствующий повторяющемуся звену линейного полимера, не способен служить субстратом реакции глюкозилирования.

Ранее, при исследовании биосинтеза О-специфического полисахарида *S. senftenberg*, главная цепь которого идентична полимеру из *S. anatum*, но остаток галактозы замещен по С-6 остатком α -D-глюкозы, мы обнаружили [4], что в бесклеточной системе ферментативное глюкозилирование может протекать и до реакции полимеризации. Было показано далее, что синтетический полипренилпирофосфаттрисахарид Rha α 1 \rightarrow 3(Glc α 1 \rightarrow 6)-Gal(α)-PPMrg способен подвергаться ферментативному маниозилированию, а продукт этой реакции превращаться далее в полностью глюкозилированный полисахарид [5].

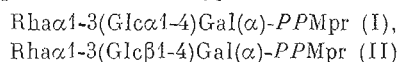
Для исследования вопроса, возможны ли подобные реакции в случае производных разветвленных олигосахаридов, содержащих остаток глюкозы при С-4 остатка галактозы, мы осуществили синтез соединения (I) —



Rhaα1-3Galα-PPMPr

XIV

морандренилпирогосфатного производного трисахаридного фрагмента полисахарида *S. typhimurium*, а также его изомера (II), содержащего β1→4-связь между остатками глюкозы и галактозы, и исследовали их субстратные свойства для ферментов из *S. typhimurium* и *S. anatum*:



Синтез целевых производных (I) и (II) состоял из трех этапов: синтез олигосахаридов Rhaα1-3(Glcα1-4)Gal (III) и Rhaα1-3(Glcβ1-4)Gal (IV), их превращение в гликозилфосфаты Rhaα1-3(Glcα1-4)Galα-P (V) и Rhaα1-3(Glcβ1-4)Galα-P (VI) и пирофосфатный синтез.

Гликозирование бензил-2,6-ди-О-бензил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил-α-D-глюкопиранозил)-β-D-галактопиранозид (VIII) [6] ацетобромрамной (VII) в ацетонитриле в присутствии Hg(CN)₂ с применением вакуум-

¹³C-ЯМР-спектры соединений (III)–(VI) *

Соединение	Остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
III	α -D-Glc	101,58 (α) 101,44 (β)	73,43	73,90	70,62	73,43	61,61
	α -L-Rha	102,94 (β) 102,87 (α)	71,36 ^a	71,44 ^a	73,43	70,62	48,03
	α -D-Gal	93,73	70,12	75,88	79,73	72,79	61,92
	β -D-Gal	97,88	73,63	78,51 ^b	79,11 ^b	76,58	61,79
IV	β -D-Glc	103,59	74,56	76,83	70,93	76,83	61,80
	α -L-Rha	102,69	71,31	71,31	73,08	70,59	17,86
	α -D-Gal	93,61	69,80	76,90 ^b	76,83 ^b	72,50	61,94
	β -D-Gal	97,58	73,32	80,02	76,50	75,59	61,94
V	α -D-Glc	101,39	73,36	73,86	70,43	73,36	61,54
	α -L-Rha	102,74	71,32	71,32	73,23	70,59	17,88
	α -D-Gal	95,13	70,72 **	76,32	79,59	73,36	61,90
VI	β -D-Glc	103,72	74,62	76,88 ^a	70,92	76,88 ^a	61,97
	α -L-Rha	102,75	71,21 ^c	71,28 ^c	73,15	70,67	17,93
	α -D-Gal	95,22	70,84 ***	77,28 ^a	76,78 ^a	72,19	62,16

* Для сигналов отмеченных буквенными индексами, отнесение может быть обратным.

** $J_{C2, P} = 7,5$ Гц.

*** $J_{C2, P} = 6,3$ Гц.

ной техники привело к защищенному производному трисахарида (X) с 80% выходом (схема). Строение тримера (X) следовало из данных спектра ¹³C-ЯМР, в котором присутствовали сигналы трех аномерных атомов углерода: 102,7 м.д. ($J_{C, H}$ 164 Гц, C-1 остатка β -D-Gal), 99,55 м.д. ($J_{C, H}$ 171 Гц, C-1 остатка α -L-Rha) и 99,18 м.д. ($J_{C, H}$ 166 Гц, C-1 остатка α -D-Glc). Таким образом, положение сигналов и значения констант спин-спинового взаимодействия C-1 остатка Rha однозначно указывают на образование α -рамнозилгалактозной связи.

Взаимодействие бромида (VII) с бензил-2,6-ди-О-бензил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил- β -D-глюкопиранозил)- β -D-галактопиранозидом (IX) в условиях синтеза (X) привело к трисахаридному производному (XI) с 74% выходом. Анализ спектра ¹³C-ЯМР трисахарида (XI) показал наличие сигналов C-1 остатков α -L-Rha (98,86 м.д., $J_{C, H}$ 173 Гц), β -D-Gal (102,62 м.д., $J_{C, H}$ 161 Гц) и β -D-Glc (102,84 м.д., $J_{C, H}$ 156 Гц).

Омыление соединений (X) и (XI) с последующим гидрогенолизом бензильных групп привело к свободным трисахаридам (III) и (IV), выделенным с выходом 80%. Строение свободных олигосахаридов подтверждено данными спектров ¹³C-ЯМР (табл. 1). При анализе спектров ¹³C-ЯМР использована недавно разработанная нами программа для анализа структуры олигосахаридов по данным спектров (описание программы будет опубликовано отдельно).

Отличительной чертой спектра ¹³C-ЯМР трисахарида (III) является присутствие в области резонанса аномерных атомов углерода трех пар сигналов, что позволяет предполагать, что в данной структуре химический сдвиг сигналов C-1 остатков L-рамнопиранозы и D-глюкопиранозы заметно изменяется в зависимости от конфигурации при C-1 остатка галактозы. Для отнесения этих сигналов были измерены соответствующие величины $J_{C, H}$; значения J 166 и 173,3 Гц однозначно указывают на α -конфигурацию при C-1 остатков глюкозы и рамнозы. Идентификация остальных сигналов этих моносахаридных звеньев при сравнении со спектрами α -метил-D-глюкопиранозиды и α -метил-L-рамнопиранозиды не вызывает затруднений: можно отметить лишь некоторый сдвиг в слабое поле сигнала C-5 остатка рамнозы по сравнению с соответствующим сигналом в спектре α -метил-L-рамнопиранозиды. Химический сдвиг сигнала C-1 остатка рамнозы свидетельствует об $\alpha 1 \rightarrow 3$ -связи между остатками L-рамнозы и D-галактозы (ср. [7]). Наличие слабых пар сигналов (75,88

и 79,74 м.д. для остатка β -галактозы, 78,51 и 79,11 м.д. для остатка β -галактозы) указывает на замещение при С-3 и С-4; сигналы остальных углеродных атомов остатка галактозы легко идентифицируются при сравнении с известными спектрами ^{13}C -ЯМР дисахаридов $\text{Glc}\alpha\text{-1-4Gal}$ [8] и $\text{Rha}\alpha\text{-1-3Gal}$ [9].

Аналогичный анализ спектра ^{13}C -ЯМР трисахарида (IV) однозначно подтверждает его строение. В этом случае С-1 остатков глюкозы и рамнозы дают в спектре по одной линии при 103,59 и 102,69 м.д. соответственно. Сравнение со спектрами β -метил-*D*-глюкопиранозид, α -метил-*D*-рамнопиранозид, дисахаридов $\text{Glc}\beta\text{-1-4Gal}$ [10] и $\text{Rha}\alpha\text{-1-3Gal}$ позволяет легко идентифицировать все сигналы в спектре; сигналы С-5 остатков рамнозы и α -галактозы несколько смещены в слабое поле.

Ацетилирование трисахаридов (III) и (IV) уксусным ангидридом в пиридине с количественным выходом приводило к их октаацетатам (XII) и (XIII); их строение подтверждено спектрами ^1H -ЯМР, в которых присутствовали сигналы протонов 10 ацетильных групп.

Сплавление ацетатов (XII) и (XIII) с безводной P_2O_5 в условиях реакции МакДональда, как описано в работе [11], с последующим омылением и ионообменной хроматографией привело к гликозилфосфатам (V) и (VI) с 40 и 48% выходами соответственно. Строение гликозилфосфатов (V) и (VI) следовало из анализа их спектров ^{13}C -ЯМР (табл. 1).

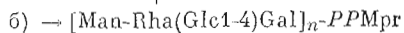
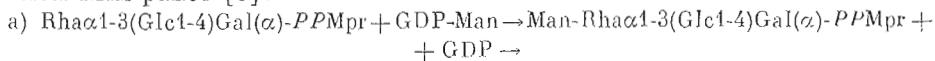
При сравнении спектра гликозилфосфата (V) со спектром трисахарида (III) легко идентифицируются сигналы остатка 3,4-дизамещенной α -*D*-галактозы: 79,59 (С-4), 76,32 (С-3) и 73,36 м.д. (С-5). Как и в других гликозилфосфатах — производных олигосахаридов (ср. [12]), сигнал С-1 остатка галактозилфосфата (95,13 м.д.) смещен в слабое поле по сравнению с сигналом соответствующего моносахарида. Его расщепление за счет спин-спинового взаимодействия с атомом фосфора мало и не проявляется в спектре, в то же время константа спин-спинового взаимодействия С-2 и атома фосфора имеет обычную величину (7,5 Гц). Сопоставление остальных сигналов в спектре (V) с таковыми в спектре (III) указывает на неизменность углеводного скелета в процессе реакции фосфорилирования.

Аналогичное сравнение спектров соединений (VI) и (IV) подтверждает α -конфигурацию галактозилфосфатной связи в (VI) и неизменность углеводного скелета.

Морапренилпирофосфаттрисахариды (I) и (II) были получены фосфомидазольным методом [13] и выделены ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте ацетата аммония в метаноле с 16 и 18% выходами соответственно. Строение продуктов (I) и (II) следовало из результатов фенольной и щелочной деградации [13], соотношение фосфор — двойные связи соответствует ожидаемой величине.

Полученные морапренилпирофосфатолигосахариды (I) и (II) были исследованы далее как субстраты ферментов, участвующих в биосинтезе О-антигенных полисахаридов *S. anatum* и *S. typhimurium*.

Углеводный фрагмент производного (I) с остатком α -глюкозы соответствует неполному повторяющемуся звену О-антигена *S. typhimurium*. Такое производное не обнаружено в клетках, поскольку, как уже отмечалось, в процессе сборки повторяющегося звена маннозилрование происходит до введения разветвления. Морапренилпирофосфатолигосахарид (II) содержит изомер фрагмента повторяющегося звена О-антигена *S. typhimurium*, а для *S. anatum* обе олигосахаридные структуры в производных (I) и (II) являются чужеродными. Использование синтетических производных (I) и (II) в реакции маннозилрования (а) с ферментными системами из клеток указанных штаммов позволяет выяснить чувствительность маннозилтрансфераз к наличию разветвления у остатка галактозы, а также к конфигурации гликозилгалактозной связи. Реакцию маннозилрования проводили с препаратом гликозилтрансфераз в условиях, аналогичных описанным ранее [5].



Субстратные свойства синтетических производных (I), (II) и (XIV) в реакциях маннозилрования (а) и полимеризации (б) с ферментами из клеток *S. typhimurium* и *S. anatum*

Производное мореприроде, нмоль	Реакция (а)		Реакция (б)
	радиоактивность во фракции липид- олигосахаридов, имп/мин	R_{G1} и олигосаха- рида в системе А	выход поли- мера, %
Источник ферментов — <i>S. typhimurium</i>			
(I), 4	2400	0,36	35
20	2900	—	—
(II), 4	3300	0,31	40
20	4200	—	—
(XIV), 4	5400	0,54	60
20	14 400	—	—
Источник ферментов — <i>S. anatum</i>			
(I), 4	1400	0,36	52
20	2200	—	—
(II), 4	1700	0,31	40
20	2500	—	—
(XIV), 4	10 200	0,54	60
20	21 000	—	—

Для проведения реакции (а) производное (I) или (II) инкубировали с GDP-[14 C]Man в присутствии препарата «растворимых гликозилтрансфераз» [14] и за ходом реакции следили по включению [14 C]маннозы в полипренилпирофосфатолигосахариды, которые экстрагировали смесью хлороформ — метанол. Результаты показывают (табл. 2), что остаток маннозы переносится на оба синтетических производных, но эффективность включения различается для исследованных штаммов. Для сравнения было использовано дисахаридное производное (XIV) [15], по структуре соответствующее нормальному предшественнику повторяющегося звена O-антигенов *S. anatum* и *S. typhimurium*.

С ферментной системой из клеток *S. typhimurium* разветвленные производные при малой концентрации маннозилируются приблизительно в 2 раза хуже, чем дисахаридный акцептор (XIV). Близкая акцепторная эффективность была отмечена нами ранее для производного с α -1-6-связанной глюкозой [5]. При 5-кратном повышении концентрации акцепторов уровень включения [14 C]маннозы в гликозилированные производные меняется незначительно, в то время как с дисахаридным производным образование радиоактивного продукта возросло почти в 3 раза. Эти данные позволяют классифицировать (I) и (II) как малоэффективные субстраты.

Для гликозилтрансфераз из клеток *S. anatum* большая разница в эффективности маннозилрования гликозилированного и дисахаридного акцепторов проявляется как при низких, так и при высоких концентрациях производных. На фоне низкого уровня маннозилрования для производных (I) и (II), различающихся по конфигурации при C-1 остатка глюкозы, не обнаруживается разница в их акцепторных свойствах.

Продуктами маннозилрования соединений (I) и (II) являются тетрасахаридные производные, что следует из анализа их олигосахаридных фрагментов с помощью хроматографии на бумаге в системе А (табл. 2). Разветвленные олигосахариды имели подвижность, близкую к подвижности синтетического тетрасахарида Man β 1-4Rha α 1-3(Glc α 1-6)Gal [16]; трисахарид, полученный из продукта маннозилрования дисахаридного акцептора (XIV), имел более высокую подвижность.

Тетрасахаридные производные, полученные из соединений (I) и (II), инкубировали далее с препаратами мембран из клеток *S. anatum* или *S. typhimurium* в условиях ферментативной полимеризации [15]. За образование полимерного продукта следили с помощью хроматографии на колонке с TSK HW-40 углеводного фрагмента после отщепления от него

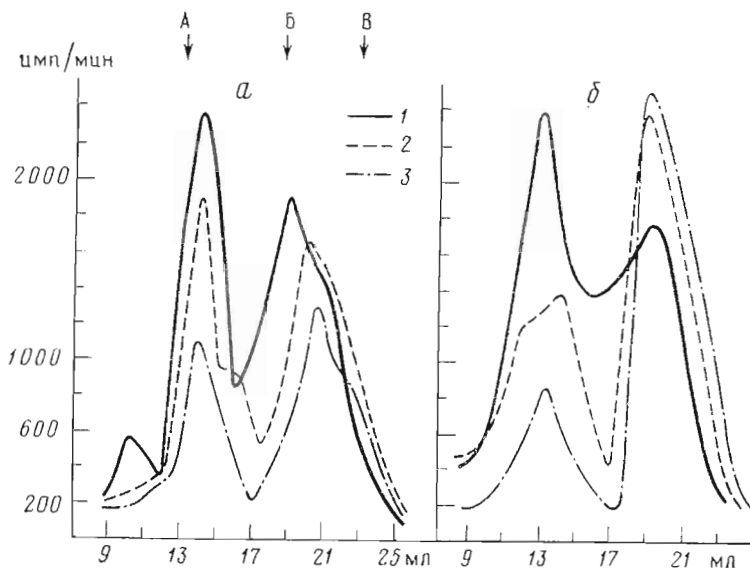


Рис. 1. Распределение радиоактивности при гель-хроматографии на TSK HW 40 (1×49 см) углеводных фрагментов продуктов ферментативной полимеризации $[^{14}\text{C}]\text{Man-Rha-Gal}(\alpha)\text{-PPMpr}$ (1), $[^{14}\text{C}]\text{Man-Rha}(\text{Glc } \alpha 1\text{-4})\text{-Gal}(\alpha)\text{-PPMpr}$ (2), $[^{14}\text{C}]\text{Man-Rha}(\text{Glc } \beta 1\text{-4})\text{Gal}(\alpha)\text{-PPMpr}$ (3) с мембранами из клеток *S. anatum* (а) и *S. typhimurium* (б). Стрелками указано место выхода декстрана (А), раффинозы (Б), маннозы (В)

полипренольного акцептора мягким кислотным гидролизом. Радиоактивные продукты, элюирующиеся в зоне выхода полимера (декстран Т-10), были обнаружены с обоими штаммами сальмонелл как с α -, так и с β -глюкозилированными производными (рис. 1). Доля радиоактивности полимерной фракции от всей нанесенной на колонку радиоактивности отражает эффективность полимеризации: в случае разветвленных субстратов полимеризации, полученных из акцепторов (I) и (II), выход полимера несколько ниже, чем для трисахаридного производного, полученного из дисахаридного акцептора (XIV), однако на стадии полимеризации влияние заместителя у С-4 остатка галактозы выражено слабее, чем на процесс маннозилрования.

Использование синтетических акцепторов позволило показать, что реакция маннозилрования, необходимая для сборки повторяющегося звена О-антигенов *S. anatum* и *S. typhimurium*, сильно замедляется при наличии остатка глюкозы в виде заместителя субтерминального остатка сахара. В *S. typhimurium* это свойство маннозилтрансферазы может служить одним из факторов, регулирующих последовательность реакций гликозилрования. С другой стороны, благодаря малой чувствительности полимеразы к наличию заместителя у остатка галактозы, с помощью синтетических глюкозилированных производных можно получить полностью глюкозилированный полисахарид как с ферментами из клеток *S. typhimurium*, продуцирующих в нормальных условиях частично глюкозилированный О-антиген, так и с ферментами из клеток *S. anatum*, О-антиген которых вообще не содержит остатков глюкозы. Интересно, что указанный подход позволяет получать полисахариды с остатком β -D-глюкозы в боковой цепи, который не характерен ни для полисахарида *S. typhimurium*, ни для полисахарида *S. anatum*.

Экспериментальная часть

В работе использовали культуры штаммов *S. anatum* (0:3, 10 Н:е, h, 1, 6) и *S. typhimurium* (0:1, 4, 5, 12 Н:i, 1, 2), полученные из музея Государственного института контроля и стандартизации медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Выращивание штаммов, получение мембран и растворимых гликозилтрансфераз проводили как описано в работе [14].

Использовали GDP-[¹⁴C]Man (10 мКи/ммоль), полученную разбавлением GDP-[¹⁴C]Man (308 мКи/ммоль, Amersham, Англия) нерадиоактивной GDP-Man (Calbiochem, Швейцария).

Хроматографию на бумаге Whatman 1 проводили в системе *n*-бутанол – пиридин – вода, 6 : 4 : 3 (А). Хроматографию продуктов полимеризации осуществляли на Fractogel TSK HW-40 (Merck, ФРГ) в воде (0,32 мл/мин). Полисахарид отщепляли от липидного фрагмента обработкой 0,5 н. уксусной кислотой (30 мин, 100° С).

Радиоактивные вещества определяли с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика Delta 300 (Tracor, Голландия) с использованием толуольного сцинтиллятора для локализации радиоактивных зон на бумаге и диоксанового сцинтиллятора для водных растворов.

¹H-ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker WM-250 (Bruker, ФРГ) при частоте 250 МГц с Me₄Si в качестве внутреннего стандарта. Спектры ¹³C-ЯМР снимали на приборе Bruker WM-250 (Bruker, ФРГ) при частоте 62,89 МГц в CDCl₃ с Me₄Si в качестве внутреннего стандарта и в D₂O с MeOH в качестве внутреннего стандарта. Химические сдвиги приведены в миллионных долях. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin – Elmer 141 (Швеция).

Для колоночной хроматографии применяли силикагель Silpearl (Chemapol, СССР) и следующие хроматографические системы: бензол – этилацетат, градиентное элюирование (Б), бензол – бензол/этилацетат, 2/1, градиентное элюирование (В). Хроматографию в тонком слое проводили на пластинках с закрепленным слоем силикагеля Kieselgel G-60 (Merck, ФРГ) в следующих системах растворителей: бензол – этилацетат, 4 : 1 (Г), метанол – этилацетат, 1 : 1 (Д), этилацетат (Е), хлороформ – метанол – вода, 60 : 25 : 4 (Ж). Моно- и олигосахаридные производные обнаруживали опрыскиванием пластинок 25% H₂SO₄ и последующим нагреванием при 125° С, эфирные фосфорной кислоты – с помощью реактива [17].

Ионообменную хроматографию гликозилфосфатов проводили на колонке (0,5 × 13 см, колонка 1) со смолой AG×8-400 меш (Bio-Rad, США) в HCO₃⁻-форме в линейном градиенте концентрации бикарбоната аммония (0–0,2 М, по 150 мл) со скоростью 1 мл/мин, фракции по 10 мл; на колонке (0,5 × 9 см, колонка 2) со смолой DA×4 (Durrum, США) в HCO₃⁻-форме в 0,1 М бикарбонате аммония со скоростью 0,5 мл/мин, детектор – рефрактометр Knauer (Knauer, ФРГ). Гликозилфосфаты переводили в триоктиламмониевую форму на колонке (1 × 8 см, колонка 3) с дауэксом 50W×8 в H⁺-форме (Serva, ФРГ), элюируя водой (контроль по электропроводности) и собирая элюат в эквимлярный раствор триоктиламмина в смеси MeOH – *n*-бутанол, 1 : 1. Морапренилфосфата сахара выделяли на колонке (1 × 8 см, колонка 4) с DEAE-целлюлозой D-52 (Whatman, Англия) в ацетатной форме (линейный градиент MeOH – 0,125 М ацетат аммония в MeOH, по 100 мл), скорость элюирования 0,5 мл/мин, объем фракций 5 мл. Гликозилфосфаты обессоливали на колонке (1,6 × 90 см, колонка 5) с Fractogel TSK HW-40, superfine (Merck, ФРГ), элюируя водой, со скоростью 1 мл/мин, контроль рефрактометрический. Кислотолабильный фосфат определяли по методике [18].

При проведении колоночной хроматографии среднего давления использовали модульную систему: насос 302, манометрический модуль 802C (Gilson, Франция), кран Rheodine 7125 (Alltech, США), аналитический рефрактометр 98.00 (Knauer, ФРГ), самописец (Knauer, ФРГ).

Электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN-16 (ГДР) в 0,05 М триэтиламмоний-бикарбонатном буфере, pH 8,5, обнаруживая фосфаты реагентом [19], определяя электрофоретическую подвижность относительно α -D-глюкозо-1-фосфата (E_{GLUC1P}).

Бензол, ацетонитрил, пиридин перегоняли над гидридом кальция. Растворы упаривали в вакууме при 40° С.

Общая методика гликозидного синтеза. Синтез проводили на вакуумной стеклянной установке [20] при рабочем давлении 5 · 10⁻³ мм рт. ст. Рабочую часть установки собирали из T-образных элементов с краном и реакционного сосуда (рис. 2) в следующем порядке: к гребенке, собранной из четырех T-образных элементов, присоединяли последовательно колбу с абс. бензолом, колбу с абс. ацетонитрилом, мерную пробирку с делениями и реакционный сосуд. В колено А реакционного сосуда помещали стержень магнитной мешалки, Hg(CN)₂ и алкилоновый компонент (в виде кристаллов или раствора в абс. бензоле), в колено Б – раствор бромидов в абс. бензоле. Компоненты реакции дважды лиофилизировали из бензола (по 1 мл перегнанного бензола в колена А и Б), растворяли в ацетонитриле (по 1 мл перегнанного ацетонитрила в оба колена). После полного растворения углеводных компонентов реакции реакционный сосуд помещали на магнитную мешалку, колено Б плавно поворачивали на 180° (при этом раствор бромидов переносится по каплям в колено А) и оставляли при перемешивании на 36 ч при 20° С. По окончании реакции давление в реакционном сосуде уравнивали с атмосферным, реакционную смесь разбавляли хлороформом (50 мл), промывали водой (2 × 50 мл), растворитель отгоняли, остаток хроматографировали.

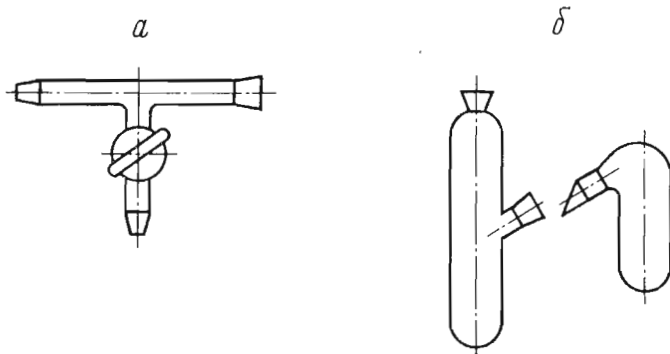


Рис. 2. Детали установки для гликозирования в вакууме:
а — Т-образный элемент с краном; б — реакционный сосуд

Бензил-2,6-ди-О-бензил-3-О-(2,3,4-три-О-ацетил- α -L-рамнопиранозил)-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил- α -D-глюкопиранозил)- β -D-галактопиранозид (X). Гликозилирование бензил-2,6-ди-О-бензил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил- α -D-глюкопиранозил)- β -D-галактопиранозид (VIII) [6] (240 мг, 0,24 ммоль) ацетобромрамнозой (VII) (176 мг, 0,5 ммоль) в присутствии $\text{Hg}(\text{CN})_2$ (120 мг, 0,48 ммоль) с последующей хроматографией в системе В приводило к соединению (X) (224 мг, 80%), $[\alpha]_D^{20} +17,2^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,49 (система Г). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): δ 102,70 (C-1, Gal), 99,55 (C-1, Rha), 99,18 (C-1 Glc), 20,78 ($\text{C}_\text{H}_3\text{CO}$), 17,70 (C-6 Rha).

Бензил-2,6-ди-О-бензил-3-О-(2,3,4-три-О-ацетил- α -L-рамнопиранозил)-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил- β -D-глюкопиранозил)- β -D-галактопиранозид (XI). Гликозилирование бензил-2,6-ди-О-бензил-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-бензил- β -D-глюкопиранозил)- β -D-галактопиранозид (IX) [6] (350 мг, 0,36 ммоль) ацетобромрамнозой (VII) (220 мг, 0,6 ммоль) в присутствии $\text{Hg}(\text{CN})_2$ (200 мг, 0,8 ммоль) с последующей хроматографией в системе В приводило к соединению (XI) (330 мг, 74%), $[\alpha]_D^{20} -17,2^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,49 (система Г). Спектр ^{13}C -ЯМР (CDCl_3): δ 102,84 (C-1 Glc), 102,62 (C-1 Gal), 98,86 (C-1 Rha), 20,69 ($\text{C}_\text{H}_3\text{CO}$), 17,81 (C-6 Rha).

3-О- α -L-Рамнопиранозил-(4-О- α -D-глюкопиранозил)-D-галактопираноза (III). К раствору производного (X) (242 мг, 0,19 ммоль) в 5 мл абс. Me OH прибавляли 0,6 мл 2 н. MeONa в MeOH, оставляли на 16 ч при 20°С, добавляли 50 мл хлороформа, промывали 50 мл воды, органический слой отделяли, водный слой экстрагировали 50 мл хлороформа, объединенные хлороформные экстракты упаривали, хроматографией остатка в системе Б выделяли продукт с R_f 0,8 (система Е), растворяли в 20 мл этанола и гидрировали при 36°С над Pd/C (контроль ТСХ, система Е). Катализатор отделяли центрифугированием, супернатант отделяли и упаривали. Получали продукт (III) (75 мг, 80%), $[\alpha]_D^{20} +74,0$ (с 1, вода), R_f 0,48 (система Д). Спектр ^{13}C -ЯМР (D_2O) приведен в табл. 1.

3-О- α -L-Рамнопиранозил-(4-О- β -D-глюкопиранозил)-D-галактопираноза (IV). Омыление и гидронолиз соединения (XI) (170 мг, 0,136 ммоль) аналогично получению (III) приводило к трисахариду (IV) (55 мг, 81%), $[\alpha]_D^{20} +3,2^\circ$ (с 1, вода), R_f 0,48 (система Д). Спектр ^{13}C -ЯМР (D_2O) приведен в табл. 1.

1,2,6-Три-О-ацетил-3-О-(2,3,4-три-О-ацетил- α -L-рамнопиранозил)-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- α -D-глюкопиранозил)-D-галактопираноза (XII). К раствору трисахарид (III) (75 мг, 0,15 ммоль) в 1 мл пиридина прибавляли 1 мл уксусного ангидрида, оставляли на 16 ч при 20°С, добавляли 1 мл MeOH, упаривали, соупаривали с толуолом. Хроматографией остатка в системе Г получали ацетат (XII) (130 мг, 94%), $[\alpha]_D^{20} +54,5^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,82 (система Е). Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): δ 2,22–1,98 (30 H, 10 Ac), 1,34 (д, 3H, $\text{C}_\text{H}_3\text{CN}$, $J_{5,6}$ 6 Гц).

1,2,6-Три-О-ацетил-3-О-(2,3,4-три-О-ацетил- α -L-рамнопиранозил)-4-О-(2,3,4,6-тетра-О-ацетил- β -D-глюкопиранозил)-D-галактопираноза (XIII).

Ацетилирование трисахарида (IV) (50 мг, 0,1 ммоль) аналогично получению (XII) приводило к ацетату (XIII) (87 мг, 95%), $[\alpha]_D^{20} +8,0^\circ$ (с 1, хлороформ), R_f 0,66 (система E). Спектр $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 2,22–1,92 (30 H, 10 Ac), 1,30 (д, 3H, CH_3CH , $J_{5,6}$ 6 Гц).

Общая методика синтеза гликозилфосфатов. Ацетат трисахарида (100 мкмоль) лиофилизовали из абс. бензола, добавляли 8-кратный избыток безводной H_3PO_4 , сплавляли в вакууме при 60°C в течение 2 ч, смесь охлаждали, добавляли по каплям при перемешивании 1 н. LiOH до pH ~11, оставляли при перемешивании на 16 ч при 20°C , осадок Li_3PO_4 отделяли центрифугированием, супернатант обрабатывали дауэксом-50 (Pu^+ -форма) до pH 8, смолу отделяли фильтрованием, фильтрат хроматографировали на колонке 1 (контроль разделения по кислотолабильному фосфату). Фракции, содержащие гликозилфосфат, упаривали, соупаривали с водой, метанолом, рехроматографировали на колонке 2. Фракции, содержащие гликозилфосфат, обессоливали на колонке 5. После упаривания водного раствора получали гликозилфосфат в виде аммонийной соли.

3-O- α -L-Рамнопиранозил-(4-O- α -D-глюкопиранозил)- α -D-галактопиранозил-1-фосфат (V). Из ацетата (XII) (120 мг, 132 мкмоль) получали гликозилфосфат (V) (53 мкмоль, 40%), $[\alpha]_D^{20} +74,5^\circ$ (с 1, вода), E_{GICLIP} 0,7. Спектр $^{13}\text{C-NMR}$ приведен в табл. 1.

3-O- α -L-Рамнопиранозил-(4-O- β -D-глюкопиранозил)- α -D-галактопиранозил-1-фосфат (VI). Из ацетата (XIII) (80 мг, 88 мкмоль) получали гликозилфосфат (VI) (42 мкмоль, 48%), $[\alpha]_D^{20} +26,0^\circ$ (с 1, вода), E_{GICLIP} 0,66. Спектр $^{13}\text{C-NMR}$ приведен в табл. 1.

Общая методика синтеза морапренилпирофосфатолигосахаридов. Аммониевую соль гликозилфосфата (10–12 мкмоль) переводили в триоктил-аммониевую форму на колонке 3. Элюат упаривали, соупаривали с толуолом, остаток растворяли в смеси бензол–метанол, 10:1, переносили в колбу с магнитной мешалкой, лиофилизовали, повторно лиофилизовали из абс. бензола (1 мл).

К раствору имидазола (54 мг) в 0,8 мл абс. тетрагидрофурана прибавляли 0,01 мл хлористого тионила, раствор перемешивали и оставляли на 1 ч при 20°C (при этом выпадали кристаллы хлоргидрата имидазола). Полученный раствор сульфинилдимидазола (супернатант) использовали для активации морапренилфосфата.

Раствор 5–6 мкмоль морапренилфосфата [21] в 0,1–0,2 мл смеси хлороформ–метанол (2:1) пропускали через колонку (1×60 см) с сефадексом LH-20 (Pharmacia, Швеция) в той же системе (контроль по электропроводности), собирая первый пик. Элюат упаривали, обессоленный морапренилфосфат лиофилизовали из бензола (1 мл), добавляли 0,1 мл раствора сульфинилдимидазола, оставляли на 1 ч при 20°C (контроль ТСХ, система Ж). К реакционной смеси добавляли 0,03 мл абс. метанола, перемешивали, растворители отгоняли в вакууме при 20°C . Полученный морапренилфосфоимидазолид растворяли в 0,1 мл абс. тетрагидрофурана, прибавляли к раствору 10–12 мкмоль триоктил-аммониевой соли гликозилфосфата в 0,1 мл абс. диметилсульфоксида, перемешивали 1 ч при 40°C , оставляли на 16 ч при 37°C . Реакционную смесь разбавляли 30 мл системы хлороформ–метанол (2:1), наносили на колонку 4, элюировали 30 мл системы, 30 мл метанола и продолжали хроматографию в градиенте концентрации ацетата аммония в метаноле. Контроль разделения—по кислотолабильному фосфату и по ТСХ (система Ж).

P¹-(3-O- α -L-Рамнопиранозил-(4-O- α -D-глюкопиранозил)- α -D-галактопиранозил)-P²-(морапренил)пирофосфат (I). Из 10 мкмоль триоктил-аммониевой соли гликозилфосфата (V) получали 0,96 мкмоль (16%) производного (I), R_f 0,1 (система Ж). Соотношение кислотолабильный фосфат—двойные связи 1:4,95.

P¹-(3-O- α -L-Рамнопиранозил-(4-O- β -D-глюкопиранозил)- α -D-галактопиранозил)-P²-(морапренил)пирофосфат (II). Из 12 мкмоль триоктил-

аммониевой соли гликозилфосфата (VI) получали 1,1 мкмоль (18%) производного (II), R_f 0,1 (система Ж). Соотношение кислотолабильный фосфат — двойные связи 1 : 5,03.

Фенольную деградацию производных (I) и (II) проводили аналогично [13]. С помощью электрофореза идентифицированы трисахаридпирофосфаты с E_{G1c1P} 0,59 для (II) и E_{G1c1P} 0,61 для (I).

Щелочную деградацию производных (I) и (II) осуществляли по методике [13]. В органической фазе с помощью ТСХ идентифицирован фосфат морапрезола (система Ж). В водном слое идентифицированы 1,2-циклофосфаты трисахаридов с E_{G1c1P} 0,27 для (II) и E_{G1c1P} 0,28 для (I).

Для проведения ферментативного маннозилрования аликвоту раствора синтетического акцептора упаривали в токе азота, суспендировали в 20 мкл 0,5% водного раствора твина-85, добавляли 5 мкл 1 М трис-ацетата (рН 8,5), 10 мкл 0,1 М $MgCl_2$, 25 нмоль $GDP-[^{14}C]Man$ и препарат растворимых гликозилтрансфераз из клеток *S. anatum* или *S. typhimurium* (общий объем 0,1 мл). После инкубации в течение 30 мин при 25°С добавляли 2 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и экстрагировали полипреципированные олигосахариды как описано в работах [14, 22].

Для ферментативной полимеризации упаренный полипреципированный фосфат $[^{14}C]Man$ -тетрасахарид суспендировали в 30 мкл твина-85, добавляли 30 мкл 1 М трис-малеата (рН 6,0), 20 мкл 0,1 М $MgCl_2$, 30 мкл препарата мембран и инкубировали 1 ч при 25°С.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nikaido H.* // Bacterial membranes and walls/Ed. Lieve L. N. Y.: Dekker, 1973. P. 131–208.
2. *Robbins P. N., Wright A.* // Microbial toxins. V. IV/Eds Weinbaum G., Kadis S., Ajl S. J. N. Y.: Acad. Press, 1971. P. 351–368.
3. *Nikaido H., Nikaido K., Nakae T., Makela R. N.* // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 12. P. 3902–3911.
4. *Шибасев В. Н., Дружинина Т. Н., Попова А. Н., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А.* // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. № 7. С. 1071–1082.
5. *Шибасев В. Н., Дружинина Т. Н., Гоголашвили Л. М., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А.* // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270. № 4. С. 897–899.
6. *Торгов В. И., Паносян Р. А., Шибасев В. Н.* // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 562–564.
7. *Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S.* // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 1. P. 173–182.
8. *Kochetkov N. K., Torgov V. I., Malysheva N. N., Shashkov A. S., Klimov E. M.* // Tetrahedron. 1980. V. 36. № 9. P. 1227–1230.
9. *Торгов В. И., Шибасев В. Н., Шашков А. С., Кочетков Н. К.* // Биоорганическая химия. 1980. Т. 6. № 2. С. 1860–1871.
10. *Torgov V. I., Panossian C. A., Shibaev V. N.* // Carbohydr. Res. 1987. V. 161. № 1. P. 97–112.
11. *Danilov L. L., Troitzky M. F., Ulkina N. S., Shibaev V. N., Kochetkov N. K.* // Carbohydr. Res. 1980. V. 87. № 1. P. 141–146.
12. *Торгов В. И., Паносян Р. А., Шибасев В. Н.* // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 559–561.
13. *Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибасев В. Н., Кочетков Н. К.* // Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 11. С. 1718–1722.
14. *Шибасев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш.* // Биоорганическая химия. 1978. Т. 4. № 1. С. 47–56.
15. *Дружинина Т. Н., Гоголашвили Л. М., Шибасев В. Н., Рожнова С. Ш., Килессо В. А.* // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 8. С. 1074–1081.
16. *Kochetkov N. K., Malysheva N. N., Torgov V. I., Klimov E. M.* // Carbohydr. Res. 1977. V. 54. № 1. P. 269–274.
17. *Vaskovsky V. E., Kostelsky E. Y., Vasendin J. M.* // J. Chromatogr. 1975. V. 114. № 1. P. 129–141.
18. *Hess H. H., Derr J. E.* // Anal. Biochem. 1975. V. 63. № 2. P. 607–613.
19. *Hanes C. S., Isherwood F. A.* // Nature. 1949. V. 164. № 4183. P. 1107–1109.
20. *Вайрамова Н. Э., Бакиновский Л. В., Кочетков Н. К.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1985. № 5. С. 1140–1145.
21. *Danilov L. L., Shibaev V. N., Kochetkov N. K.* // Synthesis. 1984. № 5. P. 404–406.
22. *Osborn M. J., Cynkin N. A., Gilbert J. M., Muller L., Singh M.* // Meth. Enzymol., Complex Carbohydrates. Part B. V. 28B/Eds Colowick C. P., Kaplan N. O. N. Y.—L.: Acad. Press, 1972. P. 583–601.

Поступила в редакцию
24.XI.1986

SYNTHESIS OF MORAPRENYLPYROPHOSPHATE DERIVATIVES
OF 3-O- α -L-RHAMNOPYRANOSYL-(4-O- α -D-GLUCOPYRANOSYL)-
 α -D-GALACTOPYRANOSE AND 3-O- α -L-RHAMNOPYRANOSYL-
(4-O- β -D-GLUCOPYRANOSYL)- α -D-GALACTOPYRANOSE
AND INVESTIGATION OF THEIR SUBSTRATE PROPERTIES
IN THE REACTIONS OF BIOSYNTHESIS OF O-ANTIGENIC
POLYSACCHARIDES FROM *SALMONELLA TYPHIMURIUM*
AND *SALMONELLA ANATUM*

TORGOV V. I., DRUZHININA T. N., NECHAEV O. A., SHIBAEV V. N.

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

Trisaccharides Rha α 1 \rightarrow 3(Glc α 1 \rightarrow 4)Gal (I) and Rha α 1 \rightarrow 3(Glc β 1 \rightarrow 4)Gal (II) have been synthesised. Acetylation of the trisaccharides followed by the McDonald reaction gave rise to α -glycosyl phosphates. The latter were converted via coupling with moraprenyl phosphoimidazolidate into polyprenyl pyrophosphate derivatives of (I) and (II), which both serve as substrates for mannosylation and polymerisation reactions with enzymes from the *Salmonella anatum* and *S. typhimurium* membranes.