



УДК 579.222.7'124.5 : 579.842.14

© 1990 г.

Т. Н. Дружинина, О. В. Сизова, В. Н. Шибазов,
С. И. Рожнова *

ВВЕДЕНИЕ ОСТАТКА ПАРАТОЗЫ В О-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПОЛИСАХАРИДЫ САЛМОНЕЛЛ С ПОМОЩЬЮ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

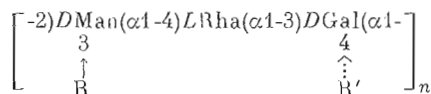
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва;

*Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии МЗ СССР,
Москва

Продемонстрирован блочный тип биосинтеза О-специфических полисахаридов салмонелл *Salmonella nitra* (серогруппа А) и *S. haifa* (серогруппа В). Используя синтетическую CDP-[¹⁴C]Par с препаратом мембран из *S. nitra*, получили полисахарид из 6 повторяющихся звеньев, содержащих остаток паратозы в боковой цепи. Показано, что гликозилтрансферазы из *S. nitra*, *S. typhimurium*, *S. haifa* и *S. kentucky* (серогруппа С₃) не обладают строгой специфичностью к структуре переносимого остатка 3,6-дидезокси-гексозы, что позволяет проводить ферментативное включение в полисахаридную цепь остатка паратозы вместо остатка абеквозы и наоборот.

Паратоза (3,6-дидезокси-*D*-рибо-гексоза) — характерный компонент О-специфического полисахарида салмонелл серогруппы А. Как и другие 3,6-дидезокси-гексозы, этот моносахарид иммунодоминантен и ответственен за серологический фактор 2, определяющий принадлежность микроорганизма к этой серогруппе.

Наиболее известный представитель салмонелл серогруппы А — высокопатогенный штамм *Salmonella paratyphi* А (серологическая формула 1, 2, 12), структуру О-специфического полисахарида которого отражает формула (Ia). Аналогичный полимер из микроорганизма *S. typhimurium*, относящегося к серогруппе В, имеет весьма близкую структуру (IIa), в которой остаток паратозы заменен на остаток ее эпимера по С₄ — абеквозы (3,6-дидезокси-*D*-ксило-гексозы) или 2-О-ацетильного производного последней. Такая замена приводит к замене фактора 2 в антигенной формуле на фактор 4 (в случае 2-О-ацетилабеквозы появляется дополнительно серологический фактор 5). Структура и иммунохимия О-специфических полисахаридов салмонелл обсуждена в ряде обзоров (см., например, [1]).



I: R = Par α 1-; R' = DGl α 1- (a) или H (б)

II: R = Abe α 1-; R' = DGl α 1- (a) или H (б)

III: R = R' = H

Путь биосинтеза О-специфических полисахаридов салмонелл хорошо известен для ряда микроорганизмов этого рода [2], в частности для *S. typhimurium* [3]. В то же время в литературе нет сведений об этом процессе для представителей серологической группы А. По аналогии с литературными данными для *S. typhimurium* можно ожидать, что и в этом случае сборка повторяющегося трисахаридного звена основной цепи полисахарида происходит путем последовательного переноса остатков α -*D*-галактозилфосфата, *L*-рамнозы и *D*-маннозы с соответствующих нуклеотид-сахаров на полипептилфосфатный акцептор, а последующие стадии вклю-

Включение [^{14}C]моносахаридов из нуклеотидсахаров в продукты, растворимые в смеси хлороформ – метанол (имп/мин)

Нуклеотидсахара в инкубационной смеси (25 нмоль)	Источник ферментного препарата		
	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. nitra</i>	<i>S. haija</i>
UDP- ^{14}C Gal	1500	3200	1800
UDP-Gal+dTDP- ^{14}C Rha	5200	7800	4600
UDP-Gal+dTDP-Rha+GDP- ^{14}C Man	750	500	700

чают в себя присоединение остатка 3,6-дидезоксигексозы с использованием в качестве донора гликозильного остатка CDP-производного моносахарида и превращение образовавшегося полипренилпирофосфаттетрасахарида в полимер (Iб), который может далее модифицироваться введением остатков глюкозы.

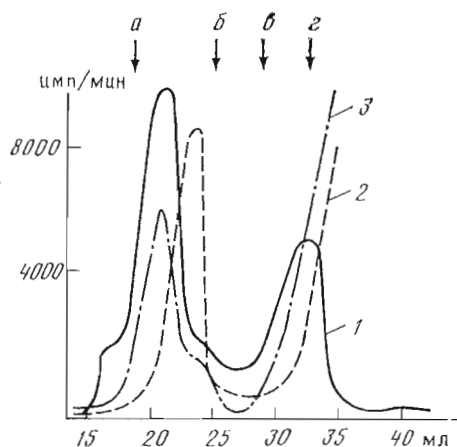
В задачу настоящего исследования входила экспериментальная проверка этого предположения. Мы интересовались также возможностью получения в условиях ферментативного синтеза *in vitro* модифицированных полисахаридов с заменой остатка абеквозы на остаток паратозы или наоборот.

В качестве объекта исследования был выбран условно-патогенный штамм *S. nitra*, идентичный по своей антигенной формуле микроорганизму *S. paratyphi*, что позволяло предполагать для его О-специфического полисахарида структуру (Ia).

Прежде всего мы убедились, что последовательность ферментативных реакций при сборке основной цепи изучаемого полисахарида идентична наблюдаемой в случае полимера из *S. typhimurium* (табл. 1): имеет место значительное включение радиоактивности во фракцию полипренилпирофосфатсахаров при инкубации мембранного препарата с UDP- ^{14}C Gal или UDP-Gal + dTDP- ^{14}C Rha. В том случае, когда в инкубационной смеси присутствуют UDP-Gal, dTDP-Rha и GDP- ^{14}C Man, содержание радиоактивности в полипренилпирофосфатсахарах заметно уменьшается за счет протекания ферментативной поликонденсации трисахаридного звена. Анализ продуктов реакции (после отщепления полипренилпирофосфатного остатка мягким кислотным гидролизом и последующей обработки щелочной фосфатазой) с помощью гель-фильтрации показывает образование полимера (III) (см. кривую 2 на рисунке). Эти результаты подтверждают, что сборка главной цепи О-специфического полисахарида в исследуемом микроорганизме происходит по обычному блочному механизму биосинтеза [2].

Потенциальный донор остатка паратозы при биосинтезе О-специфического полисахарида — CDP-Par — был выделен ранее из *S. paratyphi* A [4], образование этого нуклеотидсахара из CDP-Glc было продемонстрировано в ряде микроорганизмов, в том числе в салмонеллах серогруппы D [5—7]. Мы обнаружили, что бесклеточные экстракты *S. nitra* также катализируют превращения CDP-Glc в CDP-Par. Реакцию проводили с использованием CDP- ^{14}C Glc в условиях, аналогичных описанным для получения CDP- ^{14}C Abe с экстрактами *S. typhimurium* [3]. Радиоактивный продукт реакции, очищенный с помощью препаративной хроматографии на бумаге, был идентичен синтетическому образцу CDP-Par [8] по поведению при электрофорезе и хроматографии на бумаге. После мягкого кислотного гидролиза единственным радиоактивным продуктом остается ^{14}C Par, идентифицированная с помощью хроматографии на бумаге (R_{Gal} 1,9 в системе А).

Для исследования протекания ферментативного паратозицирования при биосинтезе О-специфического полисахарида *S. nitra* была использована процедура, аналогичная применявшейся нами ранее при изучении введения остатка абеквозы в О-специфический полисахарид *S. typhimu-*



Распределение радиоактивности при хроматографии на сефадексе G-15 углеводов фрагментов продуктов, полученных после инкубации ферментного препарата из клеток *S. nitra* с UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-Man и CDP-[14 C]Par (1), UDP-Gal, dTDP-Rha и GDP-[14 C]Man (2) или UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-Man и CDP-[14 C]Abe (3). Стрелками указаны объемы элюции стандартов: декстрин Т-10 (а), (Man-Rha-Gal) $_2$ (б), раффиноза (в), абеквон (г)

rium [9]. Препарат мембран инкубировали с UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-Man, CDP-[14 C]Par и после расщепления гликозил-фосфатной связи с помощью щелочной фосфатазы анализировали гель-фильтрацией (рисунок). При этом в зонах полимерных (16—21 мл) и олигомерных (22—28 мл) продуктов было обнаружено около 50% внесенной радиоактивности. Добавление к смеси эквимольного количества синтетической CDP-Par приводит к уменьшению включения радиоактивности в полимерные продукты в 2 раза, что еще раз подтверждает идентичность CDP-Par, полученной химическим и ферментативным синтезом. Объем элюции полимерных соединений, преобладавших в смеси, был несколько меньше, чем у аналогичных продуктов, образовавшихся при отсутствии донора остатка паратозы в инкубационной смеси (ср. кривые 1 и 2 на рисунке).

При анализе олигомерной фракции с помощью хроматографии на бумаге (система А) были обнаружены три радиоактивные зоны с R_{Gal} 0,66; 0,38 и ~ 0 . Первая соответствует по своей подвижности тетрасахариду [14 C]Par-Man-Rha-Gal (ср. R_{Gal} 0,64 для [14 C]Abe-Man-Rha-Gal [9]), вторая — по-видимому, его димеру (16) ($n = 2$). Более высокомолекулярные олигосахариды локализованы, очевидно, вблизи старта хроматограммы.

Для характеристики полимерных продуктов реакции были проведены две серии опытов, в которых сравнивались полимеры, образующиеся in vitro с препаратом мембран из *S. nitra* при наличии или в отсутствие в реакционной смеси доноров остатков паратозы.

В первой серии состав инкубационной смеси был аналогичен описанному выше, но в качестве единственного радиоактивного субстрата присутствовала UDP-[14 C]Gal. Одна из проб не содержала донора остатка паратозы, в другую была внесена нерадиоактивная CDP-Par. Полимерная фракция была обработана NaBH $_4$, после кислотного гидролиза было проведено разделение продуктов ионообменной хроматографией в описанных ранее [10] условиях, что позволило определить отношение [14 C]галактоза/[14 C]дульцит, т. е. среднюю степень полимеризации образующихся в результате ферментативной реакции углеводов цепей. В обоих случаях эта величина соответствовала приблизительно шести повторяющимся звеньям. Таким образом, включение остатка паратозы не приводит к повышению степени полимеризации продукта, а наблюдающиеся различия во времени элюции при гель-хроматографии полимерных продуктов, полученных в присутствии и при отсутствии CDP-Par, связаны, очевидно, с разной молекулярной массой повторяющегося звена.

Во второй серии опытов единственным радиоактивным субстратом служила GDP-[14 C]Man. Полученные полимерные соединения были подвергнуты распаду по Смитсу с последующим дополнительным восстановлением NaBH $_4$, обработкой специфическими гликозидазами и анализом образующихся продуктов с помощью хроматографии на бумаге.

В пробе, не содержавшей донора остатков паратозы, основной радиоактивный продукт после распада по Смитсу и дополнительного восстановления идентичен заведомому образцу галактозилглицерина (R_{Gal} 1.13

в системе А). Он расщепляется, превращаясь в радиоактивный глицерин ($R_{Gal} 1,9$) под действием α -галактозидазы, но не β -галактозидазы. Эти результаты соответствуют структуре (III) для продукта ферментативной реакции; можно считать доказанным присутствие в полимере остатка α -D-галактозы, замещенного по ОН-3 и связанного с ОН-2 (или ОН-6) остатка D-маннозы.

Полимер, полученный в присутствии CDP-Pag, дает после распада по Смиту и восстановления смесь радиоактивных продуктов. После мягкого кислотного гидролиза (0,5 н. HCl, 100° С, 1 ч), обработки α -галактозидазой и α -маннозидазой единственным радиоактивным продуктом остается [^{14}C]манноза, как и следует ожидать при структуре (16). Полученные результаты подтверждают присоединение остатка паратозы к остатку маннозы и α -конфигурацию при С1 последней.

Как уже упоминалось, паратоза и абеквоза — иммунодоминантные компоненты О-специфических полисахаридов, определяющие групповую принадлежность салмонелл серогрупп А и В. В связи с работой по химико-ферментативному синтезу О-антигенных полисахаридов значительный интерес представляет вопрос о том, насколько строго специфичность гликозилтрансфераз к структуре переносимого остатка 3,6-дидезоксигексозы и возможно ли использование ферментов из штамма серогруппы А для получения полисахарида, соответствующего серогруппе В (или наоборот).

Для выяснения этого вопроса были проведены опыты по ферментативному синтезу полисахарида с препаратом мембран из *S. nitra* с использованием CDP- $[^{14}C]$ Abe, полученной ферментативным синтезом с ферментным препаратом из *S. typhimurium* [9]. Наблюдалось небольшое, но заметное включение [^{14}C]абеквозы в полимерную фракцию (рисунок, кривая 3). Количественные данные, характеризующие способность паратозилтрансферазы из *S. nitra* использовать CDP-Abe вместо CDP-Pag при синтезе О-специфического полисахарида, приведены в табл. 2. Можно видеть, что включение в полимер остатка абеквозы происходит приблизительно в 5 раз менее эффективно, чем для природного субстрата реакции.

Сходные результаты получены при исследовании введения остатков двух 3,6-дидезоксисахаров в полисахарид с использованием препарата мембран из *S. typhimurium*: в этом случае более предпочтительным субстратом является производное абеквозы, а менее эффективным — производные паратозы (табл. 2). При использовании в качестве донора остатка 3,6-дидезоксисахара CDP-Pag заметно уменьшается эффективность ферментативной поликонденсации и основным продуктом реакции являются олигосахариды; их анализ с помощью хроматографии на бумаге дал результаты, аналогичные описанным выше для *S. nitra*.

Таким образом, специфичность гликозилтрансфераз, катализирующих перенос остатков паратозы и абеквозы, достаточно широка для того, чтобы осуществить химико-ферментативный синтез О-специфического полисахарида, относящегося к иной серологической группе, чем исследуемый штамм. Несмотря на довольно низкую эффективность реакции при такого рода «перекрестных» синтезах, этот вариант может быть полезен при необходимости получения полимера труднодоступного или высокопатогенного бактериального штамма.

Полученные нами данные о возможности использования CDP-Pag при синтезе О-специфического полисахарида с ферментным препаратом из *S. typhimurium* не соответствуют опубликованным в 1968 г. результатам Осборн и Вайнера [11]: по их данным, эффективность включения паратозы не превышает 1,5% от аналогичной реакции с производным абеквозы. Причины этого расхождения не вполне ясны. Нужно отметить только, что мы проводили инкубацию при более низкой температуре, что обеспечивает большую устойчивость абеквозилтрансферазы и применяли более чувствительный метод определения продуктов реакции.

Для проверки нашего заключения было проведено исследование ферментативного синтеза О-специфического полисахарида, содержащего остатки 3,6-дидезоксисахаров, с использованием еще одного штамма сал-

Таблица 2

Включение [^{14}C]дидезоксигексоз в полимер и олигосахариды *
в реакциях с мембранными препаратами из разных источников
Приведена доля внесенной радиоактивности, %

Источник препарата	CDP- ^{14}C Par		CDP- ^{14}C Abe	
	полимер	олигосахарид	полимер	олигосахарид
<i>S. nitra</i>	40	15	10	0
<i>S. typhimurium</i>	7	13	35	5
<i>S. haifa</i>	10	35	30	10
<i>S. kentucky</i>	5	15	15	25

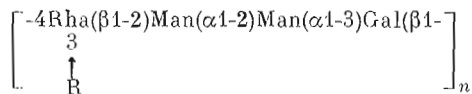
* При гель-фильтрации на сефадексе G-15 в использованных условиях объем элюции полимера 16—21 мл, олигосахаридов — 22—28 мл (см. рисунок).

монелл серогруппы В — *S. haifa*. Структура этого полисахарида не изучалась специально, однако на основании иммунохимических данных можно предполагать его идентичность полимеру (IIa). Данные табл. 1 указывают на протекание биосинтеза основной цепи полимера по блочному механизму. Результаты опытов по образованию полимеров, содержащих остатки абеквозы или паратозы, показанные в табл. 2, близки к картине, наблюдаемой для *S. typhimurium*.

Полимеры, полученные с ферментами из *S. typhimurium* и *S. haifa* при использовании CDP- ^{14}C Par в качестве донора остатка 3,6-дидезоксигексозы, были подвергнуты мягкому кислотному гидролизу в условиях отщепления остатков 3,6-дидезоксигексоз [11]. Образующийся радиоактивный моносахарид был, по данным хроматографии на бумаге, идентичен паратозе (R_{Gal} 1,9) и отличался от абеквозы (R_{Gal} 1,8). Таким образом, в условиях ферментативной реакции гликозилирования не происходило эпимеризации по C4 остатка 3,6-дидезоксисахара.

Возможность включения в О-специфический полисахарид остатка паратозы вместо остатка абеквозы при использовании модифицированного донора остатка 3,6-дидезоксисахара была продемонстрирована также на примере *S. kentucky* — штамма серологической группы C₃.

Введение остатка абеквозы из CDP-Abe в полимер этого штамма было недавно продемонстрировано нами [9]. Как видно из данных табл. 2, CDP-Par довольно эффективно включается в реакцию. Структура образующегося при этом полимера не была специально исследована; можно предполагать, что он имеет строение (IVб), аналогичное нормальному полисахариду этого штамма (IVa), возникающему при ферментативном синтезе полимера в отсутствие доноров остатка глюкозы [9].



(IV): R = Abe α 1- (а) и Par α 1- (б)

Экспериментальная часть

В работе использовали культуры штаммов салмонелл *Salmonella nitra* (O : 2, 12; H : g, m) (серогруппа А), *S. haifa* (O : 1, 4, 5, 12; H : z₁₀; 1, 2), *S. typhimurium* (O : 1, 4, 5, 12; H : i, 2) (серогруппа В), *S. kentucky* (O : 8; H : i, z₆), полученные из музея Государственного института стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов. Выращивание штаммов, получение мембран, растворимых гликозилтрансфераз, анализ радиоактивных продуктов проводили как описано в работе [12].

Использовали субстраты: UDP-Gal, GDP-Man (Calbiochem, США), UDP- ^{14}C Gal и GDP- ^{14}C Man (Amersham, Англия), dTDP-Rha и dTDP- ^{14}C Rha получены биосинтетически согласно [13]. CDP-Par синтезирована

по методу [8]. CDP-[¹⁴C]Par получали из CDP-[¹⁴C]Glc (ICN, Pharmaceuticals, США) по схеме, описанной для получения CDP-[¹⁴C]Abe [3], в качестве ферментов использовали бесклеточный экстракт из *S. nitra*.

Последовательность сборки цепи О-специфических полисахаридов *S. nitra* и *S. haifa* определяли в серии экспериментов, как описано для *S. kentucky* [14].

Ферментативное паратозилирование изучали в условиях, описанных для абеквозилирования О-специфического полисахарида *S. typhimurium* [9]. Препарат мембран инкубировали с набором нуклеотидсахаров (18° С, 2 ч), продукты реакции экстрагировали 0,1 н. уксусной кислотой (95° С, 25 мин), обрабатывали щелочной фосфатазой и анализировали с помощью гель-фильтрации. Гель-фильтрацию полисахаридов проводили на колонке (1 × 40 см) с сефадексом G-15 в воде.

Углеводные компоненты анализировали хроматографией на бумаге Whatman 1 в системе *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (А).

Распад полисахаридов по Смиту проводили как описано для полисахарида *S. anatum* [15]: окисляли периодатом с восстановлением NaBH₄, обессоливали гель-фильтрацией на сефадексе G-15, далее проводили мягкий кислотный гидролиз (0,5 н. HCl, 17 ч, 22° С) с повторным восстановлением NaBH₄.

Для ферментативного гидролиза продуктов деградации использовали α-галактозидазу из кофейных зерен, β-галактозидазу из *E. coli* (Boehringer, ФРГ) и α-маннозидазу из конских бобов (Sigma, США).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilkinson S. G. // Surface carbohydrates of the prokaryotic cell / Ed. Sutherland I. L. N. Y.: Acad. Press, 1977. P. 97—176.
2. Shibaev V. N. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1986. V. 44. P. 277—339.
3. Osborn M. J., Cynkin N. A., Gilbert J. M., Müller L., Singh M. // Meth. Enzymol. 1972. V. 28. P. 583—601.
4. Mayer R. M., Ginsburg V. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1964. V. 15. № 4. P. 334—337.
5. Matsuhashi S. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 18. P. 4275—4282.
6. Nikaido H., Nikaido K. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 6. P. 1376—1389.
7. Hey A. E., Elbein A. D. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 22. P. 5473—5478.
8. Уткина Н. С., Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Шибаев В. Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1375—1383.
9. Дружинина Т. Н., Сизова О. В., Шибаев В. Н., Рожнова С. Ш. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1419—1427.
10. Шибаев 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—566.
11. Osborn M. J., Weiner I. M. // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 10. P. 2631—2639.
12. Шибаев 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.
13. Шибаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Дружинина Т. Н., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 2. С. 249—256.
14. Shibaev V. N., Druzhinina T. N., Porova A. N. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 101. № 2. P. 309—316.
15. Шибаев В. Н., Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Мальцев С. Д., Данилов Л. Л., Торгов В. И., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 564—566.

Поступила в редакцию
6.X.1989

T. N. DRUZHININA, O. V. SIZOVA, V. N. SHIBAEV, S. Sh. ROZHNOVA *

THE ENZYMATIC INCORPORATION OF PARATOSE RESIDUES INTO O-SPECIFIC POLYSACCHARIDES OF SALMONELLA

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

The block mechanism of O-specific polysaccharides biosynthesis was demonstrated for *Salmonella nitra* (serogroup A) and *S. haifa* (serogroup B). Due to the moderate specificity of glycosyl transferases from *S. nitra*, *S. typhimurium*, *S. haifa* and *S. kentucky* (serogroup C₃) towards the 3,6-dideoxyhexose structure a paratose residue can be incorporated into the polysaccharide chain instead of an abequose residue, and vice versa.