



УДК 579.222.7'124.5 : 547.366'118.057 : 579 : 842.14

© 1991 г.

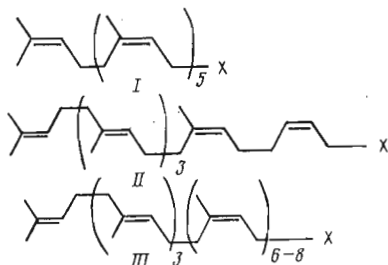
Н. А. Калинин, Л. Л. Данилов, Т. Н. Дружинина,
С. Д. Мальцев, В. Н. Шибанов, О. Н. Юдина,
Н. Я. Григорьева, А. М. Моисеенков

**ФОСФОРИЛИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЛНОСТЬЮ-Z- И
3-ДЕЗМЕТИЛ-ТРИ-ТРАНС, ДИ-ЦИС-ГЕКСАПРЕНОЛОВ КАК
СУБСТРАТЫ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕННОГО
ПОЛИСАХАРИДА *SALMONELLA ANATUM***

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

Описан синтез фосфатов полностью-Z- и 3-дезметил-три-транс, ди-цис-гексапренолов и исследовано их взаимодействие с ферментами биосинтеза О-специфического полисахарида *Salmonella anatum*. Показано, что присутствие метильной группы в α -концевом звене остатка пренола важно для эффективного фермент-субстратного взаимодействия, а наличие E-изопреновых звеньев вблизи ω -конца цепи остатка пренола не имеет существенного значения.

Настоящая работа — продолжение проводимых нами структурно-функциональных исследований производных полипренолов. Фосфорные эфиры этих соединений играют ключевую роль в биосинтезе ряда бактериальных полисахаридов, выступая в качестве связанного с мембраной акцептора для переноса углеводных остатков [1]. Природными субстратами ферментов в этих реакциях служат производные бактериального ундекапренола $WT_2C_5-OH^*$. Ранее нами было показано [2, 3], что в системе биосинтеза О-специфического полисахарида *Salmonella anatum* последние могут быть эффективно заменены на производные синтетического гексапренола WT_2C_3-OH . С использованием фосфатов ряда синтетических и полусинтетических пренолов было продемонстрировано существенное значение Z-стереохимии α -концевого изопренового звена остатка полипренола для сохранения субстратных свойств его производных [4, 5]. Также высказано предположение о важной роли метильной группы α -концевого звена остатка пренола для эффективного фермент-субстратного взаимодействия [5].

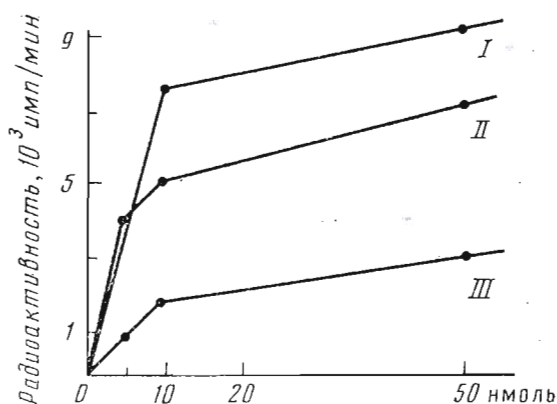


а) $X=OH$; б) $X=OP$; в) $X=D-Gal(\alpha)POPO-$; г) $X=D-Man(\beta 1-4)-L-Rha(\alpha 1-3)-D-Gal(\alpha)POPO-$

Цель настоящей работы — экспериментальная проверка этого предположения, а также выяснение вопроса о значении стереохимии удаленных от фосфатной группы изопреновых звеньев для субстратных свойств про-

* Обозначения пренолов — по рекомендациям номенклатурной комиссии IUPAC — IUB: Eur. J. Biochem. 1987. V. 167. P. 181—184.

Зависимость скорости образования полипренилдифосфат[^{14}C]галактозы от содержания полипренилфосфатов (I) — (III) в инкубационной смеси



изводных полипренолов. Это исследование было выполнено с помощью гексапренолов (Ia) и (IIa), синтез которых был недавно описан [6, 7]. Мы сообщаем о превращении этих соединений в соответствующие фосфаты (Iб; IIб), способности последних служить субстратами для галактозил-фосфаттрансферазы из *S. anatum* (превращение «б» → «в») и других гликозилтрансфераз, участвующих в сборке трисахаридного повторяющегося звена О-специфического полисахарида (превращение «б» → «г»), и, наконец, о влиянии структуры остатка пренола в производных (Iг, IIг) на эффективность ферментативной поликонденсации трисахаридных звеньев, приводящей к образованию полисахарида. В качестве стандарта при исследовании всех ферментативных реакций были использованы соответствующие производные морапренола $\text{WT}_3\text{C}_{6-8}\text{-OH}$ (IIIa), полипренола из листьев шелковицы, свойства которых хорошо известны (ср. [2—5]).

Для получения фосфатов (Iб, IIб) был использован недавно разработанный нами метод фосфорилирования полипренолов действием моно-(тетра-*n*-бутиламмоний)фосфата и трихлорацетонитрила [5, 8]. После проведения реакции в хлороформе, удаления не содержащих пренильного радикала фосфатов экстракцией и окончательной очистки с помощью хроматографии на DEAE-целлюлозе аммониевые соли гексапренилфосфатов были получены с выходом 82 и 70% соответственно. Продукты были хроматографически однородны (ТСХ), отношение гексапренол — фосфат было близко к теоретически ожидаемому. Данные спектров ЯМР подтверждают приписываемую структуру. В спектрах ^{31}P -ЯМР имеется единственный сигнал (вблизи +2,0 м. д.), соответствующий фосфомоноэфиру. Интегральная интенсивность сигналов метильных групп внутренних изопреновых звеньев в спектрах ^1H -ЯМР, а также химический сдвиг и мультиплетность сигналов протонов α -концевого изопренового звена (см. «Экспериментальную часть») подтверждают сохранение структуры остатка гексапренолов в условиях фосфорилирования и присоединение остатка фосфата по первичной ОН-группе.

Методики, использованные для контроля за протеканием ферментативных реакций, были ранее описаны [3, 5]. Для оценки скорости превращения монофосфатов (ряд «б») в галактозилдифосфатные производные (ряд «в») исходные соединения инкубировали с «препаратом растворимых гликозилтрансфераз» и $\text{UDP-}[^{14}\text{C}]\text{Gal}$, количество полипренилдифосфатсахара определяли по радиоактивности после его выделения с помощью колонки гидрофобизированного силикагеля SEP-PAK C18 (для соединений (Iв и IIв) или экстракцией органическим растворителем (для фосфата (IIIв)). Продукты реакции были идентифицированы с помощью ТСХ; их хроматографическая подвижность (в системе Б для фосфатов (Iв и IIв) $R_f = 0,23$, для фосфата (IIIв) — 0,31) соответствует ожидаемой для этого класса соединений. Как видно из полученных результатов (рисунок), эффективность ферментативной реакции для фосфата полностью *Z*-гексапренола (Iб) заметно выше, чем для морапренилфосфата (IIIб); в случае же 3-дезметилпроизводного (IIб) происходит, напротив, снижение эффективности реакции.

Таблица 1

Эффективность полипренилфосфатов при сборке трисахаридного звена О-специфического полисахарида (образование производных ряда г)

Пренилфосфат	Относительная эффективность *
Iб	2,3
IIб	0,57

* Отношение скорости для исследуемого фосфата и морапренилфосфата (50 нмоль в инкубационной смеси).

Таблица 2

Влияние структуры остатка полипренола на выход полимерных продуктов при образовании О-специфического полисахарида

Субстрат реакции	Выход полимерных продуктов, %
Iг	41,5
IIг	3,4
IIIг	42,0

Качественно аналогичная картина наблюдается и при протекании трех последовательных ферментативных реакций, приводящих к превращению полипренилмонофосфатов в трисахариддифосфатные производные ряда «г» (табл. 1), хотя различие между производными (I и III) в этом случае более ярко выражено. Инкубационная смесь помимо монофосфатов пренолов и препарата растворимых гликозилтрансфераз содержала UDP-Gal, dTDP-Rha и GTP-[¹⁴C]Man, продукты выделяли и определяли аналогично вышеописанной процедуре. Включение [¹⁴C] маннозы в состав полипренилдифосфатолигосахарида подтверждено идентификацией трисахарида после мягкого кислотного гидролиза продуктов реакции с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-15 в условиях, обеспечивающих четкое разделение моно- и трисахаридов.

Выделенные соединения ряда «г» с различной структурой остатка пренола были использованы в качестве субстратов ферментативной поликонденсации, приводящей к образованию О-специфического полисахарида. Источником фермента служил препарат бактериальных мембран, продукты реакции после мягкого кислотного гидролиза анализировали с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-15. Как видно из данных табл. 2, эффективность поликонденсации не различается существенно для производных (Iг, IIIг); в то же время отсутствие метильной группы в α-концевом звене остатка полипренола приводит к резкому уменьшению выхода полимерных продуктов для производного (IIг).

Результаты, полученные в настоящей работе, показывают, таким образом, что присутствующие *E*-изопреновых звеньев вблизи ω-конца цепи в природных полипренолах не является необходимым для взаимодействия их производных с ферментами биосинтеза О-специфического полисахарида *S. anatum*. Более того, на первых стадиях процесса, при сборке трисахаридного звена, производные *полностью-Z*-пренола (I) — более эффективные субстраты реакций, чем производные природных полипренолов.

Можно далее сделать вывод, что метильная группа в составе α-концевого *Z*-изопренового звена остатка полипренола вносит некоторый вклад во взаимодействие производных полипренола с ферментами. Это следует из заметно меньшей субстратной эффективности производных гексапренола (II) по сравнению с природными субстратами; различие особенно значительно на последней стадии процесса, при образовании полисахаридной цепи из полипренилдифосфаттрисахаридов.

Авторы благодарны МНТК «Биоген» за финансовую поддержку настоящей работы.

Экспериментальная часть

Использованные в работе методики подробно описаны в статье [5]. Для тонкослойной хроматографии применены пластинки с силикагелем 60 (Merck) и системы растворителей хлороформ — метанол — вода, 60 : 25 : 4 (А) и 60 : 30 : 6 (Б). При ферментативном синтезе соединений (Iв—IIIв) инкубацию проводили, как в работе [5], в течение 15 мин, для выделения и определения производных (I и II) использовали процедуру В,

в случае производного (III) — процедуру А. Аналогичные процедуры использовали при ферментативном синтезе соединений (Iг—IIIг), состав инкубационной смеси — как в статье [5], но содержание dTDP-Rha — 25 нмоль. При ферментативной поликонденсации состав инкубационной смеси — как в сообщении [5], инкубацию проводили при 37° С в течение 60 мин, продукты определяли по процедуре с использованием колонки (1,2 × 41 см) с сефадексом G-15.

3-Дезметилгексапренилфосфат (IIб). К раствору 44 мг (108 мкмоль) 3-дезметилгексапренола (IIа) и 400 мкмоль моно(тетра-*n*-бутиламмоний)-фосфата в 0,8 мл хлороформа прибавляли 60 мкл (600 мкмоль) трихлорацетонитрила. Через 2 ч реакционную смесь разбавляли толуолом (2 мл) и упаривали, от остатка отгоняли толуол (2 × 1 мл). Остаток растворяли в 3 мл верхней фазы уравновешенной смеси *n*-бутанол — вода. Раствор промывали нижней фазой (4 × 0,5 мл) и упаривали досуха. От остатка отгоняли *n*-пропанол (2 × 2 мл), толуол (3 × 2 мл) и вновь *n*-пропанол (2 × 2 мл) и растворяли его в смеси *n*-пропанол — вода — 25% водный аммиак (10 : 15 : 0,4). Раствор пропускали через колонку (1 × 8 см) с дауэксом 50 × 8 (аммониевая форма), промывали колонку тем же растворителем до резкого падения электропроводности элюата, элюат упаривали. От остатка отгоняли *n*-пропанол (3 × 3 мл), растворяли его в 30 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 3). Раствор наносили на колонку (1 × 12 см) DEAE-целлюлозы DE-52 (ацетатная форма, Whatman). Колонку промывали 30 мл той же смеси и 30 мл метанола, элюировали продукт 100 мл 30 мМ раствора ацетата аммония в метаноле (рН 7,0). Выход аммонийной соли (IIб) 75 мкмоль (70%), отношение полипренол — кислотолабильный фосфат 1 : 1,10, R_f 0,40 (А).

Полученный раствор хранили при 5° С и использовали для биохимических исследований. Перед получением спектров ЯМР раствор упаривали, ацетат аммония удаляли распределением между фазами равновесной смеси *n*-бутанол — вода, как описано выше. После упаривания бутанольной фазы от остатка отгоняли *n*-пропанол, растворяли его в бензоле и раствор лиофильно высушивали. Спектр ^{31}P -ЯМР (CHCl_3 — CH_3OH , 4 : 1): +2,0 м. д. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3): 5,58 (дт, 1H, $J_{2,3}$ 11,0 Гц, $J_{2,1}$ 6,2 Гц, 2-H), 5,49 (дт, 1H, $J_{2,3}$ 11,0 Гц, $J_{3,4}$ 6,4 Гц, 3-H), 5,10 (м, 5H, $\text{HC}=\text{C}$), 4,43 (дд, 2H, $J_{\text{H,H}}$ 6,2 Гц, $J_{\text{H,P}}$ 7,0 Гц, 1-H₂), 2,1—1,9 (м, 2OH, CH_2), 1,67 (с, 6H, *цис*- CH_3), 1,62 (с, 12H, *транс*- CH_3).

полностью *-Z*-Гексапренилфосфат (Iб) получен аналогично из 27 мг (63 мкмоль) гексапренола (Iа), 240 мкмоль моно(тетра-*n*-бутиламмоний)-фосфата и 30 мкл (300 мкмоль) трихлорацетонитрила в 0,6 мл хлороформа. Выход аммониевой соли фосфата (Iб) 82%, отношение полипренол — кислотолабильный фосфат 1 : 0,94, R_f 0,41 (А). Спектр ^{31}P -ЯМР (CHCl_3 — CH_3OH , 4 : 1): +1,9 м. д. Спектр ^1H -ЯМР (CDCl_3 — CD_3OD , 1 : 1): 5,35 (т, 1H, $J_{2,1}$ 7,0 Гц, 2-H), 5,10 (м, 5H, $\text{HC}=\text{C}$), 4,40 (т, 2H, $J_{\text{H,H}}$ 7,0 Гц, $J_{\text{H,P}}$ 7,0 Гц, 1-H₂), 2,10—1,90 (м, 2OH, CH_2), 1,72 (с, 3H, 3- CH_3), 1,68 (с, 15H, *цис*- CH_3), 1,56 (с, 3H, *транс*- CH_3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shibaev V. N. // Adv. in Carbohydr. Chem. Biochem. 1986. V. 44. P. 277—339.
2. Данилов Л. Л., Калинин Н. А., Дружинина Т. Н., Шибеев В. Н., Полунин Е. В., Новикова М. А., Торгова С. И., Моисеенков А. М., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 271. № 2. С. 357—361.
3. Калинин Н. А., Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Шибеев В. Н., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 219—226.
4. Веселовский В. В., Лозанова А. В., Новикова М. А., Аврутов И. М., Григорьева Н. Я., Моисеенков А. М., Калинин Н. А., Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Шибеев В. Н., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 280. № 4. С. 885—887.
5. Danilov L. L., Druzhinina T. N., Kalinchuk N. A., Maltsev S. D., Shibaev V. N. // Chem. Phys. Lipids. 1989. V. 51. № 3—4. P. 191—203.
6. Григорьева Н. Я., Юдина О. Н., Даева Е. Д., Моисеенков А. М. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1990. № 1. С. 89—97.

7. Григорьева Н. Я., Юдина О. Н., Черепанова Е. Г., Моисеенков А. М. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1990. № 4. С. 803—806.
8. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибает В. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1287—1289.

Поступила в редакцию
17.V.1990

N. A. KALINCHUK, L. L. DANILOV, T. N. DRUZHININA, S. D. MALTSEV,
V. N. SHIBAEV, O. N. YUDINA, N. Ya. GRIGORIEVA, A. M. MOISEENKOV

PHOSPHORYLATED DERIVATIVES OF *ALL-Z*- AND
3-DEMETHYL-TRI-*TRANS*, DI-*CIS*-HEXAPRENOLS AS ENZYME
SUBSTRATES OF THE *SALMONELLA ANATUM* O-ANTIGEN POLYSACCHARIDE
BIOSYNTHESIS

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

Phosphates of *all-Z*- and 3-demethyl-tri-*trans*, di-*cis*-hexaprenols have been prepared and studied as substrates for enzymes of the *Salmonella anatum* O-specific polysaccharide biosynthesis. Methyl group in α -isoprenic unit proved to be essential for the enzyme-substrate interaction, whereas the presence of *E*-isoprenic units near the ω -end of the poly-prenol is not significant.