



УДК 547.458'418'363.07+576.851.49

**ПОДТВЕРЖДЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИПИДНЫХ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БИОСИНТЕЗА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ САЛМОНЕЛЛ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИПРЕНИЛПИРОФОСФАТСАХАРОВ***Шибав В. Н., Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н.,  
Торгов В. И., Гоголашвили Л. М., Уткина Н. С.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

Первые стадии биосинтеза О-специфических полисахаридов салмонелл серологических групп А, В, D и Е включают в себя сборку повторяющегося звена полисахарида на полипренилфосфатном акцепторе [1, 2] с образованием GalppR (I), Rha-GalppR (II) и Man-Rha-GalppR-производных (R — остаток бактериального полипренола, pp — пирофосфатная группа, Gal, Rha и Man — остатки D-галактозы, L-рамнозы и D-маннозы соответственно). Структура олигосахаридной цепи в этих соединениях не была ранее однозначно доказана, хотя вывод о ней можно сделать на основании результатов структурного анализа соответствующих полисахаридов. С помощью разработанного нами метода химического синтеза полипренилпирофосфатсахаров [3] было осуществлено получение пирофосфата (Ia), содержащего остаток морапренола (Mpr) — растительного полипренола [4], близкого по структуре к бактериальному полипренолу и способного заменять его в реакциях биосинтеза О-специфического полисахарида в *S. anatum* [5, 6], а также аналогичных производных (IIa) и (IIб) дисахаридов  $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1→3)-D-галактопиранозы и  $\beta$ -L-рамнопиранозил-(1→3)-D-галактопиранозы [7]. Структура производного (IIa) отвечает предполагаемой структуре промежуточного соединения при биосинтезе О-специфических полисахаридов в салмонеллах серологических групп А, D и Е.

Для О-специфического полисахарида салмонелл серогруппы В в литературе имеются противоречивые данные о конфигурации рамнозилгалактозидной связи в составе полимерной цепи [8—11], поэтому промежуточное соединение при биосинтезе может иметь как структуру (IIa), так и структуру (IIб).

В настоящей работе мы сообщаем о результатах оценки способности синтетических морапренилпирофосфатов (Ia), (IIa), (IIб) выступать в качестве акцепторов моносахаридных остатков при биосинтезе О-специфических полисахаридов с препаратами ферментов из ряда салмонелл серологических групп В и Е, что позволяет однозначно установить структуру дисахаридного фрагмента в липидных промежуточных соединениях биосинтеза в этих штаммах.

Ранее мы показали [6], что синтетическая морапренилпирофосфатгалактоза (Ia) может выступать в качестве акцептора остатка рамнозы при реакции, приводящей к соединению (II) под действием препарата ферментов из *S. anatum*. В настоящее время мы провели опыты по инкубации пирофосфата (Ia) с dTDP-Rha и GDP-[<sup>14</sup>C]Man в присутствии ферментных препаратов из целого ряда штаммов салмонелл.

Получение препаратов клеточных мембран и растворимых гликозилтрансфераз проводили аналогично методике [12]. Для проведения ферментативных реакций аликвоты растворов морапренилпирофосфатсахаров в метаноле упаривали, добавляли 15 мкл 0,5% раствора твина-85, встряхивали до гомогенности, вводили 5 мкмоль трис-ацетата (рН 8,5), 1 мкмоль

Таблица 1

Включение радиоактивности в гликолипидную фракцию после инкубации препарата растворимых гликозилтрансфераз с морапренилпирофосфатом GalppMpr (Ia) (2 нмоль), dTDP-Rha (25 нмоль) и GDP-[<sup>14</sup>C]Man (25 нмоль)

Источник фермента	Серогруппа	Радиоактивность, 10 <sup>3</sup> имп/мин
<i>S. anatum</i>	E <sub>1</sub>	7,8
<i>S. newington</i>	E <sub>2</sub>	8,7
<i>S. senftenberg</i>	E <sub>4</sub>	8,6
<i>S. typhimurium</i>	B	7,8
<i>S. bredeney</i>	B	7,7

Таблица 2

Включение радиоактивности в гликолипидную фракцию после инкубации препаратов растворимых гликозилтрансфераз с морапренилпирофосфатами Rha $\alpha$ 1-3GalppMpr (IIa) или Rha $\beta$ 1-3GalppMpr (IIб) (11 нмоль) и GDP-[<sup>14</sup>C]Man (13 нмоль)

Источник фермента	Серогруппа	Радиоактивность, 10 <sup>3</sup> имп/мин	
		(IIa)	(IIб)
<i>S. anatum</i>	E <sub>1</sub>	9,80	0,30
<i>S. senftenberg</i>	E <sub>4</sub>	8,90	0,80
<i>S. typhimurium</i>	B	9,40	0,20
<i>S. bredeney</i>	B	4,76	0,08

хлористого магния, 25 нмоль необходимых нуклеотидсахаров и препарат фермента (общий объем смеси 0,1 мл). После инкубации в течение 30 мин при 25° С радиоактивные морапренилпирофосфатсахара определяли как описано в работе [12].

Полученные результаты (табл. 1) показывают, что во всех исследованных случаях при добавлении соединения (Ia) наблюдается эффективное стимулирование включения радиоактивности в гликолипидную фракцию за счет последовательного присоединения остатков рамнозы и [<sup>14</sup>C]маннозы и образования производного [<sup>14</sup>C]Man-Rha-Gal. При мягком кислотном гидролизе (0,01 н. HCl в 50% водном *n*-пропаноле, 15 мин, 100° С) полученного радиоактивного продукта образуется маннозил-рамнозил-галактоза, идентичная заведомому образцу [13] по данным хроматографии на бумаге (*R*<sub>Gal</sub> 0,60, бутанол-пиридин-вода, 6:4:3). Таким образом, синтетическое соединение (Ia) может служить эффективным субстратом в реакциях биосинтеза O-специфических полисахаридов во всех изученных микроорганизмах.

При инкубации соединений (IIa) или (IIб) с GDP-[<sup>14</sup>C]Man в присутствии препаратов растворимых гликозилтрансфераз (табл. 2) интенсивное включение радиоактивности в гликолипидную фракцию происходит только при использовании первого из этих соединений. Такая картина наблюдается как при работе с ферментами из микроорганизмов, относящихся к серологической группе E (что соответствует заключению о структуре дисахаридного звена в промежуточном соединении биосинтеза, полученному на основе анализа структуры полисахаридов), так и в случае микроорганизмов серологической группы B. Таким образом, с помощью синтетических полипренилфосфатсахаров удается получить однозначный вывод об  $\alpha$ -конфигурации рамнозилгалактозной связи в дисахаридном фрагменте промежуточного продукта биосинтеза и, следовательно, в O-специфическом полисахариде. Такой подход, очевидно, может быть полезен и при исследовании структуры других промежуточных продуктов при биосинтезе полисахаридов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Robbins P. W., Wright A. In: Microbial Toxins/Eds Weinbaum G., Kadis S., Aje J. J. New York — London: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 351—368.
2. Nikaido H. In: Bacterial Membranes and Walls/Ed. Leive L. 1973, p. 131—208.
3. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 88, p. 203—211.
4. Вергунова Г. И., Глухобед И. С., Данилов Л. Л., Елисеева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И., Шашков А. С., Шibaев В. Н. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 11, с. 1484—1492.
5. 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.
6. Кусов Ю. Ю., Киселева Е. В., Данилов Л. Л., Шibaев В. Н., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1863—1872.
7. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шibaев В. Н., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 11, с. 1718—1722.
8. Lüderits O. L., Westphal O., Staub A. M., Nikaido H. In: Microbial Toxins/Eds Weinbaum G., Kadis S., Aje J. J. New York — London: Acad. Press, 1971, v. 4, p. 145—223.
9. Kita H., Nikaido H. J. Bacteriol., 1973, v. 113, p. 672—679.
10. Iwashita S., Kanegasaki S. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 45, p. 403—409.
11. Eriksson V., Lindberg A. A. J. Gen. Virol., 1977, v. 34, p. 207—221.
12. Osborn M. J., Cynkin M. A., Gillbert J. M., Muller L., Singh M. In: Methods in Enzymol., 1972, v. 28, p. 583—601.

Поступило в редакцию  
24.XI.1981

### USE OF SYNTHETIC POLYPRENYL PYROPHOSPHATE SUGARS FOR CONFIRMATION OF STRUCTURES OF LIPID INTERMEDIATES OF SALMONELLA O-ANTIGEN BIOSYNTHESIS

SHIBAЕV V. N., DANILOV L. L., DRUZHININA T. N., TORGOV V. I.,  
GOGILASHVILI L. M., UTKINA N. S.

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

The synthetic derivatives of moraprenyl pyrophosphate, which contain  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (I),  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1→3)- $\alpha$ -D-galactopyranose (IIa) or  $\beta$ -L-rhamnopyranosyl(1→3)- $\alpha$ -D-galactopyranose (IIb) were tested as substrates for biosynthesis of O-antigen polysaccharide (III) repeating units with the enzymes from *S. anatum*, *S. senftenberg*, *S. typhimurium* and *S. bredeney*. Derivatives (I) and (IIa) were involved in biosynthesis of (III), whereas (IIb) proved inactive. The data obtained show the absence of  $\beta$ -rhamnosyl disaccharide fragments in compound (III) of the studied *Salmonella* strains.