



УДК 547.454'913.3'118+577.15.08

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ПОЛИПРЕНИЛФОСФОСАХАРОВ
В САЛМОНЕЛЛАХ СЕРОГРУППЫ C₁Дружинина Т. Н., Розальева В. В., Шубаев В. Н.,
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

Показано, что мембранные препараты из салмонелл серогруппы C₁ — *Salmonella thompson* и *S. montevideo* — катализируют включение радиоактивности во фракцию липидолигосахаридов из UDP-[¹⁴C]Glc и UDP-[¹⁴C]GlcNAc. Методами ТСХ и хроматографии на ДЭАЕ-целлюлозе радиоактивные производные идентифицированы как 1-полипренилпирофосфат N-ацетилглюкозамина (GlcNAc-PPPr) и полипренилмонофосфатные производные N-ацетилглюкозамина и глюкозы. Пирофосфатное производное GlcNAc1PPPr служит акцентором остатков маннозы из GDP-Man с образованием Man₁₋₂GlcNAc1PPPr. Образование аналогичного производного наблюдали при введении в мембраны синтетического производного GlcNAc1PPMr.

O-специфические полисахариды салмонелл серогруппы C₁ построены из остатков N-ацетилглюкозамина, маннозы и глюкозы [1] и иммунологически характеризуются серофакторами O₆ и O₇ [2]. Из O-специфического полисахарида *Salmonella thompson* IS40 после его обработки фаговой эндо-α-маннозидазой группой шведских исследователей был выделен и идентифицирован декасахарид Man(β1-2)Man(α1-3)GlcNAc(β1-2)Man(α1-2)Man(α1-2)Man(β1-2)Man(α1-3)GlcNAc(β1-2)Man(α1-2)Man с активностью детерминанты O₇. На основании этих данных, а также результатов иммунологических исследований [3] предполагается, что углеводная цепь O-антигенов салмонелл серогруппы C₁ состоит из пентасахаридных повторяющихся звеньев Man(α1-2)Man(α1-2)Man(β1-2)Man(α1-3)-GlcNAc. Остаток глюкозы, по-видимому, присоединен в виде разветвления к одному из остатков маннозы, образуя детерминанту O₆, которая проявляется также в O-специфическом полисахариде салмонелл серогруппы C₂ [3].

Биосинтез O-специфических полисахаридов салмонелл серогруппы C₁ не исследован. Генетические данные показывают, что ген *rfc*, кодирующий полимеразу O-антигена в серогруппах B, D, E, не функционирует в клетках салмонелл серогруппы C₁, и для образования O-антигена в этом случае необходим ген *rfe*, конкретные продукты функционирования которого не идентифицированы [1, 4].

В качестве первого шага в установлении механизма биосинтеза O-специфических полисахаридов салмонелл серогруппы C₁ мы решили выяснить, способны ли эти микроорганизмы синтезировать полипренилфосфосахара, которые могут служить предшественниками O-антигена, как это происходит при биосинтезе O-специфических полисахаридов салмонелл серогрупп B, D, E, C₂ и C₃ [5-7].

Поскольку известно, что ферменты биосинтеза O-специфических полисахаридов салмонелл локализованы в цитоплазматической мембране [8], в качестве источника ферментов использовали мембранные препараты, полученные из двух штаммов салмонелл серогруппы C₁ — *S. thompson* и *S. montevideo*. Получение мембранных препаратов, инкубацию с ну-

Принятые сокращения: PPPr — фосфат бактериального полипренола, MPr — C₅₅-полипренол из листьев шелковицы, Glc, Man, GlcNAc — остатки сахаров D-конфигурации.

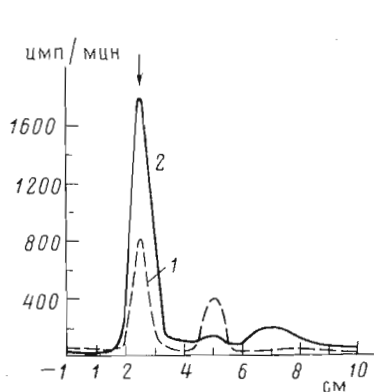


Рис. 1

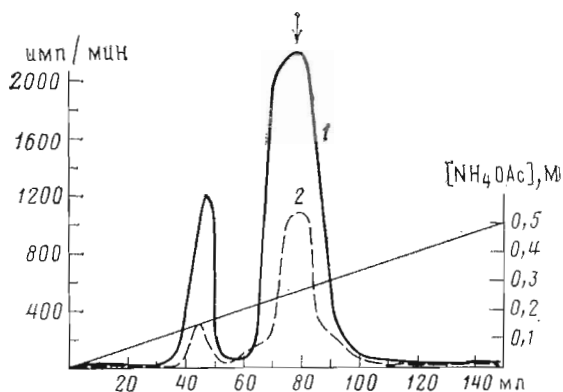


Рис. 2

Рис. 1. Распределение радиоактивности при ТСХ органических фаз, полученных при инкубации UDP-[^{14}C]GlcNAc с мембранами из клеток *S. thompson* (1) или *S. montevideo* (2). Стрелкой указана подвижность синтетического производного GlcNAc(α)PPMpr

Рис. 2. Распределение радиоактивности в элюате при хроматографии на DEAE-целлюлозе продуктов, полученных из UDP-[^{14}C]GlcNAc с мембранами из клеток *S. thompson* (1) или *S. montevideo* (2). Стрелкой указано место выхода GlcNAc(α)PPMpr

клеозиддифосфатсахарами и фракционирование продуктов реакции проводили так же, как при изучении биосинтеза O-специфического полисахарида *S. bredeney* (серогруппа B) [7].

При инкубации с мембранными препаратами из *S. thompson* и *S. montevideo* одного из радиоактивных нуклеотидсахаров наблюдали включение в органическую фазу радиоактивного сахара из UDP-[^{14}C]GlcNAc и UDP-[^{14}C]Glc (таблица).

Анализ методом ТСХ радиоактивного продукта, полученного с мембранами из клеток *S. thompson* из UDP-[^{14}C]GlcNAc, показал наличие двух производных — соединения с R_f 0,25, совпадающего по подвижности с синтетическим пирофосфатом GlcNAc(α)PPMpr [9], и вещества с R_f 0,5, характерным для монофосфатных производных полипренолов (рис. 1) [10]. В инкубационной смеси с мембранами из клеток *S. montevideo* обнаружили только производное с R_f 0,25. Хроматография этих радиоактивных продуктов на DEAE-целлюлозе также показала образование производного полипренилмонофосфата (элюция 0,15 M ацетатом аммония) и полипренилпирофосфата (элюция 0,25 M раствором соли); последнее соединение совпадает по элюционной характеристике с синтетическим производным GlcNAc(α)PPMpr (рис. 2). При таком анализе радиоактивное производное полипренилмонофосфата было обнаружено и в продук-

Включение радиоактивности (имп/мин) в органическую фазу при инкубации нуклеотидсахаров и синтетических производных морапренола с мембранными препаратами из клеток *S. thompson* (A) и *S. montevideo* (B)

Компоненты инкубационной смеси (нмоль) *	A	B
UDP-[^{14}C]GlcNAc (25)	3700	6590
UDP-[^{14}C]GlcNAc (25), MprP (50)	5200	8400
UDP-[^{14}C]Glc (25)	13 600	5790
GDP-[^{14}C]Man (25)	200	290
GDP-[^{14}C]Man (25), UDP-GlcNAc (25)	1500	1900
GDP-[^{14}C]Man (25), UDP-GlcNAc (25), MprP (50)	2700	3200
GDP-[^{14}C]Man (25), GlcNAc(α)PPMpr (13)	2100	2800
GDP-[^{14}C]Man (25), GlcNAc(α)PPMpr (26)	5700	6100
GDP-[^{14}C]Man (25), GlcNAc(α)PPMpr (65)	18 200	22 300

* Удельная радиоактивность 10 Ки/моль.

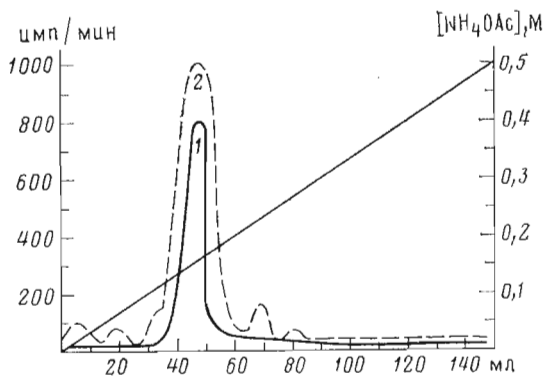


Рис. 3. Распределение радиоактивности в элюате при хроматографии на DEAE-целлюлозе продуктов, полученных из UDP-[^{14}C]Glc с мембранами из клеток *S. thompson* (1) или *S. montevideo* (2)

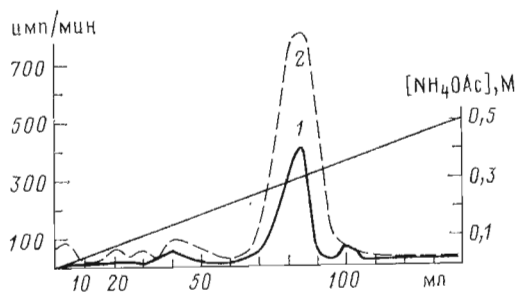


Рис. 4. Распределение радиоактивности при хроматографии на DEAE-целлюлозе продуктов, полученных из UDP-GlcNAc + GDP-[^{14}C]Man (1) или GlcNAc(α)PPMP + GDP-[^{14}C]Man (2) с мембранами из клеток *S. thompson*. (С мембранами из клеток *S. montevideo* наблюдалось аналогичное распределение)

липидолигосахарида, образованного из UDP-GlcNAc и GDP-[^{14}C]Man.

Мы имели возможность проследить за образованием полипренилфосфосахаров с использованием в качестве акцептора остатков маннозы синтетического радиоактивного производного [^{14}C]GlcNAc(α)PPMP [9]. Инкубация этого акцептора с GDP-Man и мембранным препаратом из клеток *S. thompson* приводила, как и в случае нерадиоактивного акцептора, к переносу 1–2 остатков маннозы, что видно из анализа углеводного фрагмента гель-хроматографией на сефадексе G-15 (рис. 5, 3).

Результаты этой серии экспериментов говорят о том, что с введенными в мембраны синтетическими производными морапренола протекают реакции, аналогичные реакции (4).

Проведенные эксперименты показали, что в клетках салмонелл серогруппы C, *S. thompson* и *S. montevideo* может происходить образование полипренилфосфосахаров, содержащих остатки моносахаридов, входящих в состав O-антигенных полисахаридов этой группы — глюкозы, N-ацетилглюкозамина и маннозы. Остатки глюкозы и N-ацетилглюкозамина являются компонентами не только основной цепи O-специфических полисахаридов салмонелл серогруппы C, но и олигосахарида кора, однако биосинтез этого олигосахарида, как известно, происходит без участия полипренильных переносчиков и непосредственным донором моносахаридных остатков служат нуклеотидсахара [1]. Обнаруженные нами реакции образования полипренилпирофосфатных производных, содержащих остатки N-ацетилглюкозамина и маннозы (реакции 2, 4), могут представлять начальные стадии сборки основной цепи O-специфических полисахаридов этих салмонелл. Полипренилмонофосфатное производное глюкозы, образование которого показано нами также в мембранах из клеток *S. thomp-*

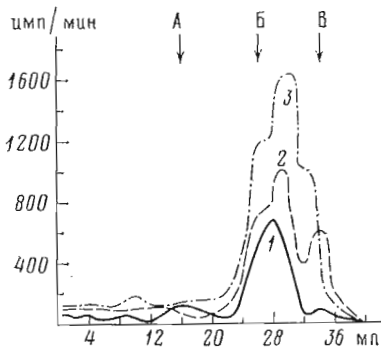


Рис. 5. Распределение радиоактивности при гель-хроматографии на сефадексе G-15 углеводного фрагмента продукта, полученного из UDP-GlcNAc+GDP- ^{14}C Man (1), UDP- ^{14}C GlcNAc+GDP-Man (2) или ^{14}C GlcNAc(α)PPMrg+GDP-Man (3) с мембранами из клеток *S. thompson*. Стрелками обозначены объемы выхода стандартов: А — декстран, Б — раффиноза, В — GlcNAc

son и *S. montevideo*, может служить донором остатка глюкозы при введении разветвлений, как это известно для O-специфических полисахаридов салмонеллы серогруппы C₂ и C₃ [6]. Остаток N-ацетилглюкозамина помимо полипрешилпирофосфатного производного образует также 1-полипрешилмонофосфат N-ацетилглюкозамина (реакция 1); это соединение находили ранее в клетках других микроорганизмов [11], но роль его пока не выяснена.

В наших экспериментах мы не наблюдали образования полипрешилпирофосфатного производного пентасахарида, соответствующего полному повторяющемуся звену O-специфического полисахарида, и полимерных продуктов. Их отсутствие в использованных нами условиях, вероятно, можно объяснить тем, что в бесклеточной системе легко протекают лишь первые стадии биосинтеза O-антигена, а для последующих нужны дополнительные факторы.

Экспериментальная часть

В работе применяли культуры штаммов *S. thompson* (O : 6,7 H : k 1,5) и *S. montevideo* (O : 6,7 H : gm1), полученные из коллекции Всесоюзного центра по салмонеллезам. Выращивание микроорганизмов и получение препаратов мембран проводили как описано для *S. bredeney* [7]. Использовали GDP- ^{14}C Man, UDP- ^{14}C GlcNAc и UDP- ^{14}C Glc (Amersham, Англия), разбавленные соответствующими нерадиоактивными нуклеотидсахарами (Sigma, США) до 10 Ки/моль (2,5 мМ). α -Морапрешилпирофосфат N-ацетилглюкозамина получен как описано в работе [9].

Хроматографию в тонком слое проводили на силикагеле Kieselgel G-60 (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол — вода, 65 : 25 : 4, ионообменную — на колонке (1,5×17 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 (Whatman, Англия), промытой перед анализом последовательно 100 мл уксусной кислоты, 100 мл метанола и 100 мл смеси хлороформ — метанол, 2 : 1. Элюцию продуктов осуществляли в линейном градиенте концентрации ацетата аммония (0–0,5 М, 150 мл) в 99% метаноле. Собирали фракции по 5 мл, высушивали под лампой и считали радиоактивность в диоксановом сцинтилляторе на счетчике Delta-300 (Tracor, Голландия). Колонку калибровали синтетическим производным GlcNAc(α)PP-Mrg, фракции анализировали по содержанию фосфора [12].

Полипрешилфосфосахара гидролизovali в 0,1 н. HCl в 50% пропаноле 15 мин при 100° С.

Гель-фильтрацию углеводных фрагментов проводили на колонке (42×1,5 см) с сефадексом G-15 в воде.

Стандартная инкубационная смесь содержала в 100 мкл: 1 М трис-ацетат, pH 8,5 (20 мкл), 0,1 М MgCl₂ (10 мкл), 0,1 М EDTA, pH 7,5 (5 мкл), нуклеотидсахара по 25 нмоль и 50–100 мкг белка препарата мембран (20–30 мкл). Синтетические производные морапрешилфосфата уларивали в токе воздуха, добавляли 15 мкл 0,5% твина-85 и остальные компоненты. Смесь инкубировали 40 мин (с нуклеотидсахарами) или 2 ч (с синтетическими акцепторами) при 28° С, реакцию останавливали добавлением 2 мл смеси хлороформ — метанол (2 : 1) и дальше фракционировали как описано для *S. bredeney* [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Jann K., Jann B. In: Handbook of Endotoxin/Ed. Rietschel E. T. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. B. V. 1984, p. 138–185.
2. Fuller N. A., Staub A. M. Eur. J. Biochem., 1968, v. 4, № 1, p. 286–300.
3. Lindberg A. A., Wollin R., Bruse G., Ekwall E., Svenson St. B. In: Bacterial lipopolysaccharides/Eds Anderson L., Unger F. M. A. C. S. Symposium series 231. Washington, 1983, p. 83–118.

4. Mäkelä R. H., Jahnkola M., Lüderitz O. J. Gen. Microbiol., 1970, v. 60, № 1, p. 91-106.
5. Nikaido H. In: Bacterial membranes and walls/Ed. Leive L. N. Y.: M. Decker, 1973, p. 131-208.
6. Shibaev V. N., Druzhinina T. N., Popova A. N., Rozhnova S. Sh., Kilessó V. A. Eur. J. Biochem., 1979, v. 101, № 2, p. 309-316.
7. Дружинина Т. Н., Гозилашвили Л. М., Шибает В. П., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1074-1081.
8. Osborn M. J. In: Structure and function of biological membranes/Ed. Rothfield L. J. N. Y.: Acad. Press, 1971, p. 343-377.
9. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибает В. Н. Биооргани. химия, 1986, т. 12, № 7, с. 934-939.
10. Дружинина Т. Н., Данилов Л. Л., Шибает В. П., Кочетков П. К., Панкрушина А. Н., Себякин Ю. Л., Волкова Л. В., Евстигнеева Р. П. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 5, с. 760-767.
11. Yamamoto S., Murazumi N., Araki Y., Ito E. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 6, p. 6516-6522.
12. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1981, v. 88, № 2, p. 203-211.

Поступила в редакцию
17.I.1986

ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLYPRENYL PHOSPHOSUGARS IN SALMONELLA SEROGROUP C₁

DRUZHININA T. N., ROSAL'VA V. V., SHIBAEV V. N.,
ROZHNÓVA S. Sh. *, KILESSÓ 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*

The cell envelopes of serogroup C₁ Salmonella, viz. *S. thompson* and *S. montevideo*, catalyze the transfer of radiolabeled sugars from UDP-[¹⁴C]Glc and UDP-[¹⁴C]GlcNAc into the lipid-linked sugars. Using TLC and DEAE-cellulose chromatography, the radio-labeled products were identified as polyprenyl pyrophosphate N-acetylglucosamine (I), polyprenyl monophosphate N-acetylglucosamine and polyprenyl monophosphate glucose. The derivative (I) served as an acceptor for mannose transfer from GDP-Man with formation of Man₁₋₂GlcNAc1PPPre. A similar reaction was observed after addition of synthetic GlcNAc1PPPre to the cell envelopes.