



УДК 577.15.062

## ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *SALMONELLA ANATUM* И ЕГО АНАЛОГОВ С ПОМОЩЬЮ ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА ПОЛИМЕРАЗЫ

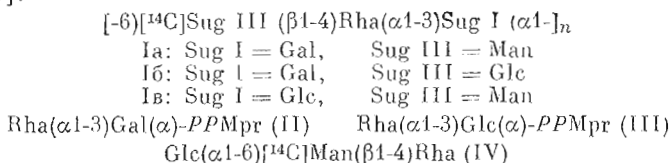
*Дружинина Т. Н., Калинин Н. А., Шибанов В. Н., Кочетков Н. К.*

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

Химико-ферментативный подход к синтезу углеводных цепей биополимеров и их фрагментов получает все большее распространение и кажется весьма перспективным для решения этой сложной задачи [1]. В наших предыдущих исследованиях [2—4] была продемонстрирована возможность использования этого подхода для получения О-специфических полисахаридов сальмонелл и модифицированных производных этих полимеров. Ключевой стадией синтеза является ферментативная поликонденсация олигосахаридных звеньев, входящих в состав полипренилпирофосфатолigosахаридов, под действием связанного с бактериальными мембранами фермента — полимеразы О-антигенных полисахаридов. Для препаративного использования последней реакции существенно, чтобы используемый препарат фермента был свободен от эндогенных полисахаридных примесей; недавно нам удалось разработать методику получения такого препарата из *Salmonella anatum* [5].

Мы хотим сообщить об успешном использовании частично очищенного препарата полимеразы для получения О-специфического полисахарида этого микроорганизма (Ia) и аналогов этого полимера (Iб) и (Iв).

Исходным веществом для синтеза полимера (Ia) служил полипренилпирофосфаттрисахарид, полученный ферментативным гликозилированием дисахаридного производного (II) [6] с помощью GDP- $^{14}\text{C}$ Man. Предварительные данные о его превращении в полимер (Ia) были приведены в работе [5].



При более детальном исследовании оптимальных условий реакции было найдено, что наилучшие результаты достигаются в случае ее проведения при pH 6,0 в течение 90 мин при 37° С или 150—200 мин при 15° С. Для оценки препаративных возможностей реакции было выполнено исследование зависимости выхода полимера от концентрации исходного субстрата (рис. 1). Полученные результаты показывают, что концентрация продукта линейно зависит от концентрации исходного производного трисахаридов (т. е. выход остается постоянным) приблизительно до концентрации 0,4 мМ. Таким образом, с помощью ферментативной реакции можно эффективно получать полисахарид в микромолярных количествах.

После проведения ферментативной поликонденсации препарат фермента и связанные с ним полипренилпирофосфатные производные отделяли центрифугированием и экстрагировали осадок 5% раствором трихлоруксусной кислоты для удаления примеси липополисахарида. Методика выделения полисахарида включает в себя обработку осадка разбавленной

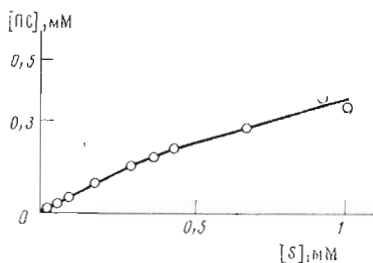


Рис. 1. Образование полимера (Ia) в зависимости от концентрации [S] исходного морапренилпирофосфаттрисахарида

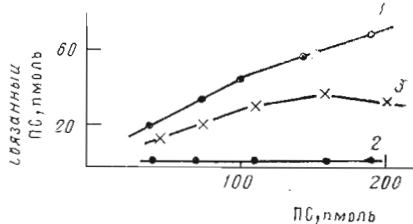


Рис. 2. Связывание радиоактивных полисахаридов (PC) Ia (1), Ib (2), Ic (3) с анти-О-сывороткой-3,10 из кролика

кислотой (0,5 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 30 мин,  $100^\circ\text{C}$ ) для отщепления остатка полипренола и инкубацию полученного раствора с фосфомоноэстеразой для полного удаления фосфатных групп. Нейтральные продукты были очищены от заряженных примесей на колонке с DEAE-целлюлозой, а затем полисахарид (Ia) очищен с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-15.

Строение синтетического полисахарида (Ia) ранее было доказано с помощью распада по Смуту и действием специфических гликозидаз [3]; в настоящее время мы провели дополнительную характеристику этого полимера с помощью метода метилирования и иммунохимических реакций.

Метилирование полимера было выполнено с помощью микроварианта методики Хакомори [7]. После очистки метилированного полисахарида с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-15 и кислотного гидролиза (2 M  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $120^\circ\text{C}$ , 1 ч) метилированные моносахариды были идентифицированы с помощью ТСХ на силикагеле (см. [8]). Основным радиоактивным продуктом был идентичен 2,3,4-три-О-метил-*D*-маннозе ( $R_f$  0,53 в системе бензол — ацетон — вода — аммиак, 50 : 200 : 3 : 1,5), что подтверждает образование 1→6-связи при ферментативной поликонденсации. Наряду с ним обнаружена также 2,3,4,6-тетра-О-метил-*D*-манноза ( $R_f$  0,75). Количество последней соответствует средней степени полимеризации, равной 10 трисахаридным звеньям; этот результат хорошо согласуется с результатами определения степени полимеризации по отношению галактоза/дульцит, выполненному на полисахариде, содержавшем остаток [ $^{14}\text{C}$ ]Gal.

Иммунохимическая характеристика полимера (Ia) была выполнена с помощью анти-О-сыворотки-3,10 из плазмы кролика. После инкубации радиоактивного полимера с сывороткой комплекс полимер—антитело осаждали с помощью полиэтиленгликоля Р6000 или вторичных антител из сыворотки барана, специфичных к IgG кролика [9].

Полученные результаты (рис. 2) указывают на существование специфического связывания синтезированного полимера с антисывороткой. Это связывание ингибируется при добавлении О-специфического полисахарида, выделенного из *S. anatum* [10], причем результаты ингибирования указывают на идентичность антителосвязывающих участков в природном и синтетическом полимере.

Частично очищенный препарат полимеразы О-антигена был применен далее для получения модифицированных полисахаридов (Ib) и (Iv).

В первом случае исходным соединением служил полипренилпирофосфаттрисахарид, полученный из соединения (II) и  $\text{GDP}-[^{14}\text{C}]\text{Glc}$ . Выход полимера (Ib) составил 20%, доказательство его строения было недавно описано [11].

Для ферментативного синтеза полимера (Iv) в качестве исходного вещества было использовано трисахаридное производное, образующееся из морапренилпирофосфатдисахарида (III) [2] и  $\text{GDP}-[^{14}\text{C}]\text{Man}$ . Полисахарид был выделен с выходом 20%. Результаты его метилирования

подтверждали образование 1→6-связи между остатками глюкозы и маннозы; степень полимеризации, по данным метилирования, в этом случае оказалась более низкой и соответствовала трем трисахаридным звеньям. Трисахарид (IV), выделенный из продуктов мягкого кислотного гидролиза (0,2 н. HCl, 30 мин, 95° C) полимера (Iв), был устойчив к действию β-глюкозидазы из сладкого миндаля, но полностью расщеплялся под действием α-глюкозидазы из зерен риса, что подтверждает α-конфигурацию связи, образованной при ферментативной поликонденсации, подобно тому, как это имеет место при синтезе природного полисахарида (Iа).

Иммунохимическое исследование полимеров (Iб) и (Iв) (рис. 2) показало существенное различие в их поведении. Замена остатка D-галактозы в природном полистере на остаток D-глюкозы приводит к относительно небольшому (~в 2 раза) уменьшению связывания полисахарида с антителом, в то время как введение остатка D-глюкозы вместо остатка D-маннозы ослабляет это взаимодействие в значительно большей степени, так что полимер (Iб) оказывается иммунологически неактивным соединением (ср. [10]).

Эти результаты демонстрируют широкие возможности использования полисахаридов, полученных с помощью химико-ферментативного синтеза, в иммунохимических исследованиях.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шибаяев В. Н. // Прогресс химии углеводов/Ред. И. В. Торгов. М.: Наука, 1985. С. 149-173.
2. Кочетков Н. К., Шибаяев В. Н., Дружинина Т. Н., Гоголашвили Л. М., Данилов Л. Л., Торгов В. И., Мальцев С. Д., Уткина Н. С. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 262. № 6. С. 1393-1397.
3. Шибаяев 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. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 564-565.
4. Дружинина Т. Н., Шибаяев В. Н., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. // Биоорг. химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1548-1551.
5. Калинин Н. А., Дружинина Т. Н., Шибаяев В. Н. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 283. № 2. С. 480-482.
6. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1981. V. 88. № 2. P. 203-211.
7. Waeghe T. J., Darvill A. G., McNeil M., Albersheim P. // Carbohydr. Res. 1983. V. 123. № 1-2. P. 281-304.
8. Katial A., Prakash S., Vijay I. K. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 141. № 3. P. 521-526.
9. Чард Т. // Радиоиммунологические методы. М.: Мир, 1984. С. 18-34 и 106-129.
10. Тендегник Ю. Я., Овчарова Н. М., Черняк А. Я., Дмитриев Б. А. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 2. С. 250-258.
11. Дружинина Т. Н., Гоголашвили Л. М., Шибаяев В. Н. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1242-1249.

Поступило в редакцию  
13.VI.1988

#### CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF THE *SALMONELLA ANATUM* O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE AND ITS ANALOGUES WITH A PARTIALLY PURIFIED PREPARATION OF POLYMERASE

DRUZHININA T. N., KALINCHUK N. A., SHIBAEV V. N., KOCHETKOV N. K.

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

A partial purified polymerase from *S. anatum* was used for the synthesis of polysaccharide [-6] [<sup>14</sup>C]Man(β1-4)Rha(α1-3)Gal(α1-)<sub>n</sub> and its analogues containing D-glucose residue instead of D-galactose or D-mannose. Structures of these polymers were confirmed by methylation analysis and radioimmunochemical tests.