



УДК 577.152.24.0

© 1990 г.

*Т. Н. Дружинина, О. В. Сизова, В. Н. Торгов,
В. Н. Шибанов*

ЧАСТИЧНАЯ ОЧИСТКА ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ, УЧАСТВУЮЩИХ В БИОСИНТЕЗЕ О-АНТИГЕНОВ *SALMONELLA ANATUM* И *S. KENTUCKY* С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

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

Обнаружено, что высокоэффективная гель-хроматография на колонке с суперозой 12 — удобный и быстрый метод для частичной очистки солиобилизованных детергентом гликозилтрансфераз, участвующих в биосинтезе О-специфических полисахаридов *Salmonella anatum* и *S. kentucky*. С помощью гель-хроматографии удалось разделить две различные маннозилтрансферазы из последнего штамма. Показана возможность использования препаратов этих ферментов для химико-ферментативного синтеза полипренилпирофосфаттрисахаридов Man₂Gal—PPMrg, в которых один из остатков D-маннозы заменен на остаток D-галакты.

Разнообразные углеводные последовательности О-специфических полисахаридов салмонелл собираются с участием гликозилтрансфераз, локализованных в цитоплазматической мембране [1]. Эти ферменты характеризуются высокой лабильностью, что затрудняет их выделение и очистку. Именно этим, очевидно, объясняется то, что до сих пор известна единственная публикация по очистке одной гликозилтрансферазы этой группы — галактозилфосфаттрансферазы из мембран *Salmonella anatum* [2]. В работе отмечается очень низкая стабильность очищенного фермента, приводящая к значительной инактивации через несколько часов.

Мы используем гликозилтрансферазы из клеток салмонелл различных серогрупп на определенных стадиях химико-ферментативного синтеза О-специфических полисахаридов — при достраивании синтетических предшественников — полипренилпирофосфатсахаров до полного повторяющегося звена [3—5]. Основным повторяющимся звеном О-специфического полисахарида *S. anatum* является трисахарид Man-Rha-Gal, а в случае *S. kentucky* — тетрасахарид Rha-Man-Man-Gal. Сборка этих олигосахаридов осуществляется гликозилтрансферазами, катализирующими последовательный перенос остатков α-D-галактозилфосфата, α-D-маннозы и α- (для *S. anatum*) или β-L-рамнозы (для *S. kentucky*) с соответствующих нуклеотидсахаров на ундекапренилфосфат.

Источником гликозилтрансфераз в химико-ферментативном синтезе служит смесь многочисленных белков, переходящих в раствор при обработке мембран салмонеллы неионным детергентом типа нонидета Polytergent S 305LF (Stamford, США). При электрофорезе в полиакриламидном геле [6] растворимой фракции белков из мембран *S. anatum*, *S. kentucky* и других штаммов салмонелл можно обнаружить более 30 белковых полос, расположенных по всей длине пробега. В целях повышения эффективности ферментативного гликозилирования синтетических акцепторов полезно иметь препарат гликозилтрансфераз (или одной гликозилтрансферазы), содержащий меньшее количество балластных белков и обладающий более высокой специфической активностью. Нас интересовал про-

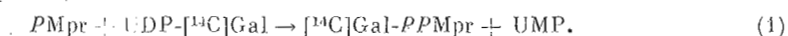
Сокращения: PPMrg, PPMrg — фосфат и пирофосфат; морапренола, PPPre — пирофосфат полипренола.

стой и быстрый метод фракционирования с максимальным сохранением активностей гликозилтрансфераз и получения стабильных ферментных препаратов, пригодных для многократного проведения реакций гликозилирования.

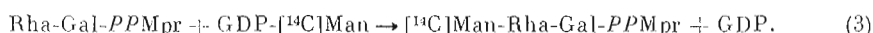
Одним из путей предотвращения денатурации ферментов может быть сокращение длительности процесса фракционирования, которое достигается применением методов высокоэффективной хроматографии. Мы выбрали наиболее мягкий способ фракционирования — высокоэффективную гель-хроматографию. Гель-хроматографию проводили на колонке с сулерозой-12 (Superose 12, LKB-Pharmacia, Швеция, предел разделения до 300 кДа).

Для определения во фракциях активностей гликозилтрансфераз использовали синтетические акцепторы — морапренилфосфат и его гликозильные производные, полученные в нашей лаборатории [7—10]; акцепторные свойства этих производных были продемонстрированы ранее [11, 12].

В качестве акцептора для галактозилфосфаттрансферазы из обоих штаммов использовали фосфат морапренола, ее активность оценивали по результатам реакции 1:

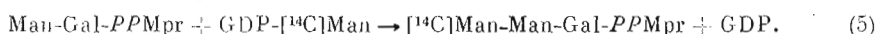
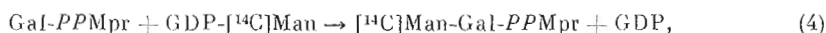


Для обнаружения рамнозил- и маннозилтрансфераз из *S. anatum* мы инкубировали синтетические полипренилпирофосфатные производные с соответствующим нуклеотидсахаром (реакции 2 и 3):



Образовавшиеся полипренилпирофосфатолigosахариды извлекали из инкубационной смеси органическими растворителями и считали радиоактивность органической фазы как описано [2].

Для отдельного определения переноса первого и второго остатков маннозы ферментами из *S. kentucky* мы использовали синтетические моно- и дисахаридные производные в реакциях 4 и 5:



Распределение белка во фракциях определяли по поглощению при 280 нм. Картины элюции белка обоих штаммов близки (рис. 1а, 2а). Галактозилфосфаттрансфераза из *S. anatum* элюировалась одним пиком и хорошо отделялась от рамнозил- и маннозилтрансфераз (рис. 1б). Обращает на себя внимание значительное возрастание общей активности трансферазы (табл. 1). Повышение суммарной активности наблюдали также для рамнозилтрансферазы. Наложением двух факторов (отделение балластных белков и возрастание общей активности) можно объяснить резкое повышение удельной активности этих гликозилтрансфераз и соответственно высокую кажущуюся степень очистки (табл. 1). Маннозилтрансфераза элюировалась не полностью или частично инактивировалась, и ее удельная активность возросла всего в 4 раза. Последние две активности не удалось полностью разделить, хотя рамнозилтрансфераза элюируется несколько раньше.

Важным условием использования частично очищенных фракций гликозилтрансфераз является стабильность ферментативных активностей. Для стабилизации ферментов во все фракции добавляли глицерин до 20% концентрации и фракции хранили при -40°C . В этих условиях галактозилфосфаттрансфераза и маннозилтрансфераза полностью сохраняли активность в течение по крайней мере 3 мес, выдерживая 2-кратное оттаивание-замораживание; рамнозилтрансфераза теряла до 80% активности через 2 сут.

Описанные условия гель-хроматографии позволяют в одну стадию за 1 ч получить частично очищенные стабильные препараты галактозилфос-

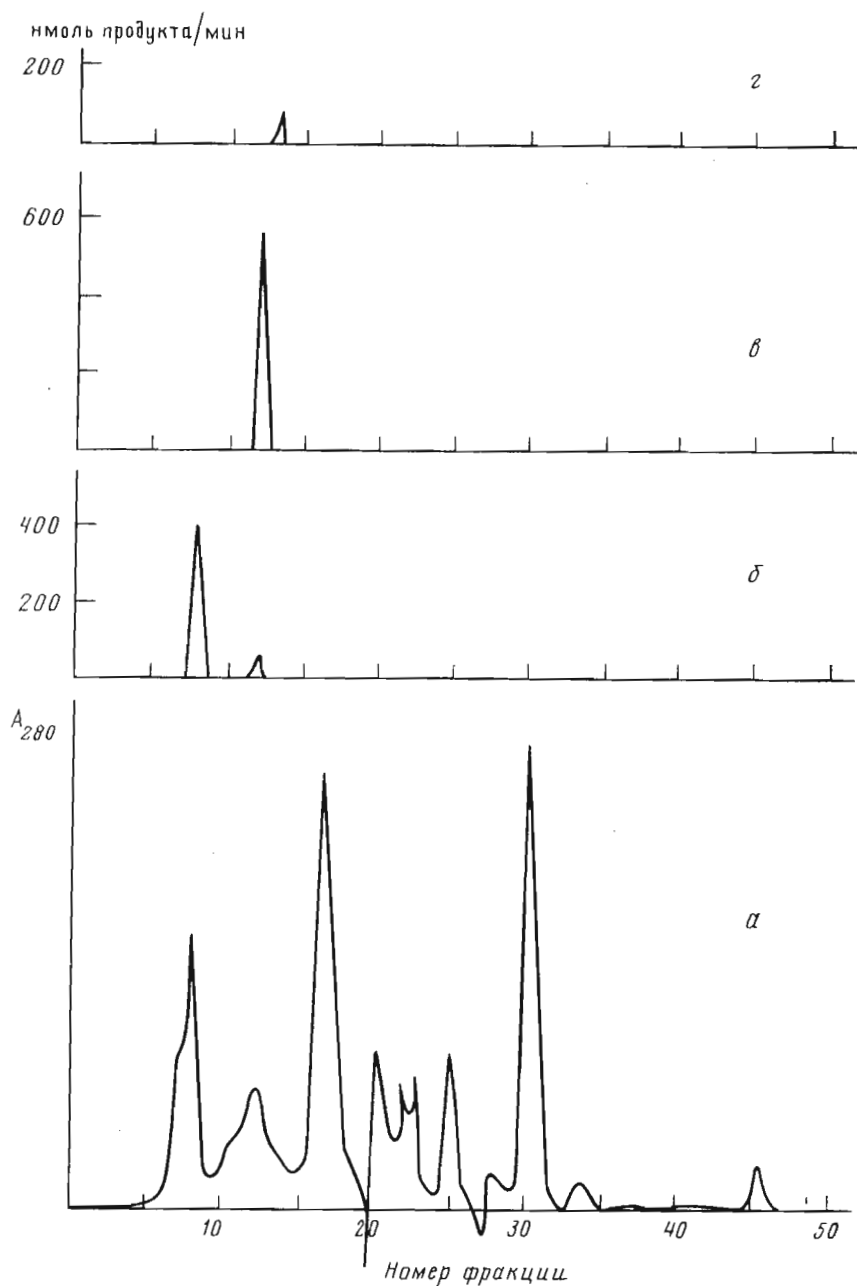


Рис. 1. Распределение белка (а), галактозилфосфаттрансферазной (б), рамнозилтрансферазной (в) и маннозилтрансферазной (г) активностей при гель-хроматографии на сулерозе-12 растворимых гликозилтрансфераз из *S. anatum*

фаттрансферазы и маннозилтрансферазы, катализирующих сборку повторяющегося звена О-гаптена *S. anatum*. Для рамнозилтрансферазы, очевидно, необходимы другие стабилизирующие условия.

Галактозилфосфаттрансферазы из *S. anatum* и *S. kentucky* катализируют одинаковые реакции — образование Gal-PPFe (см. реакцию 1), однако при гель-хроматографии эти трансферазы проявляют разные свойства. В случае *S. kentucky* основная активность галактозилфосфаттрансферазы распределяется в трех разных фракциях (рис. 2б). Суммарная активность трансферазы, как и в случае с ферментом из *S. anatum*, значительно возрастает (табл. 2). Степень очистки во фракциях различается незначительно.

В повторяющемся звене О-антигена *S. kentucky* к остатку галактозы присоединены последовательно два остатка маннозы. Особый интерес

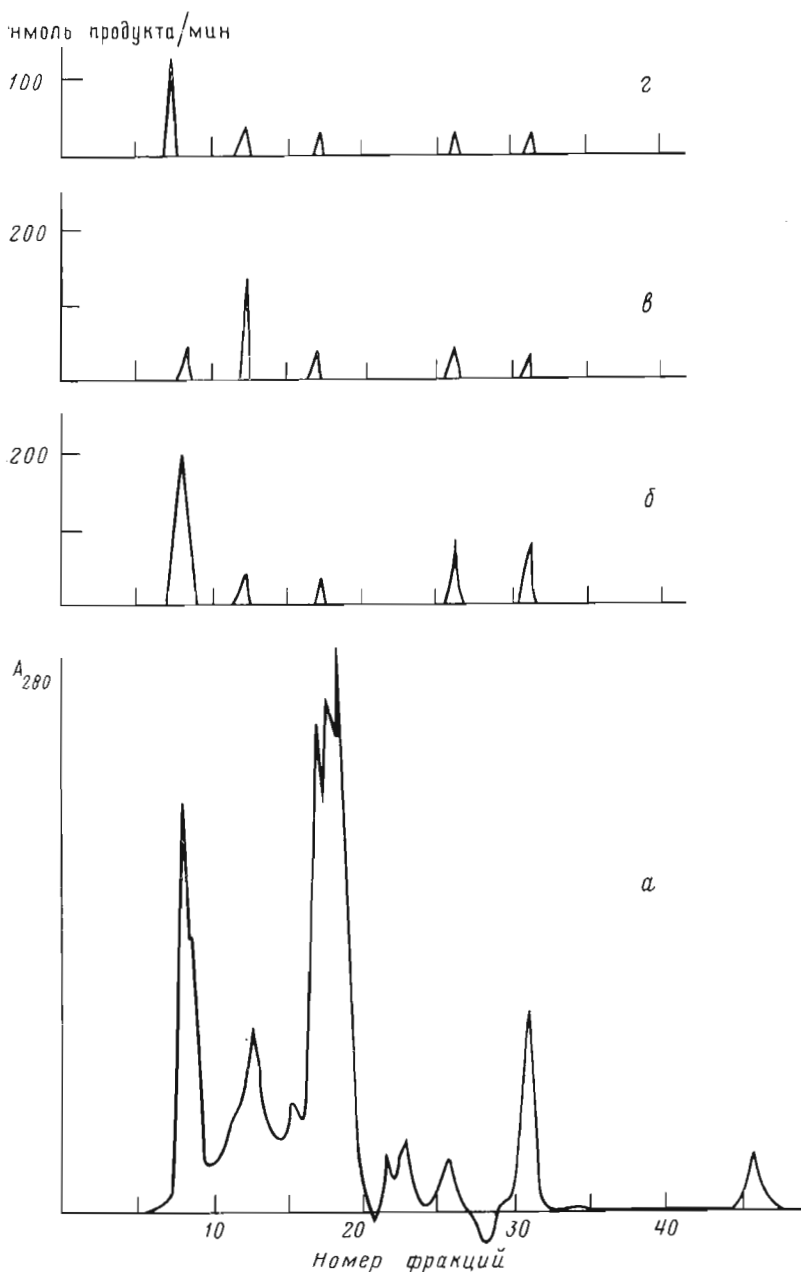


Рис. 2. Распределение белка (а), галактозилфосфаттрансферазной (б), маннозилтрансферазной I (в) и маннозилтрансферазной II (г) активностей при гель-хроматографии на суперозе-12 растворимых гликозилтрансфераз из *S. kentucky*

представляла для нас возможность разделения двух активностей, переносящих остатки маннозы. Мы обнаружили, что трансфераза, катализирующая маннозилрование производного Gal-PPMrg, элюируется с максимумом во фракции 12, маннозилрование производного Man-Gal-PPMrg катализируется ферментом из фракции 7, в этой фракции обнаруживаются лишь следы активности маннозилтрансферазы I. Эти результаты свидетельствуют о значительном, хотя и не полном разделении двух маннозилтрансфераз. В элюатах обнаруживается около 60% исходной активности маннозилтрансферазы I при возрастании удельной активности в 9,1 раза; активность маннозилтрансферазы II сохраняется полностью, а кажущаяся степень очистки составила 16. Частично очищенные маннозилтрансферазы, как и ферменты из *S. anatum*, сохраняли активность при хранении при -40°C по крайней мере в течение 3 мес.

Результаты гель-хроматографии на суперозе-12 гликозилтрансфераз из *S. ananini** (см. рис. 1)

Фермент	Активность				Степень очистки, <i>n</i> раз
	в исходном препарате		во фракции		
	общая, ед.	удельная, ед./мг белка	общая, ед.	удельная, ед./мг белка	
Галактозилфосфат-трансфераза	0,13	0,67	0,41	20,4	30
Рамнозилтрансфераза	0,12	0,57	0,57	40,7	71
Маннозилтрансфераза	0,15	0,67	0,11	2,67	4

* За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 моль гликозилированного продукта за 1 мин в стандартных условиях инкубации [12].

Таблица 2

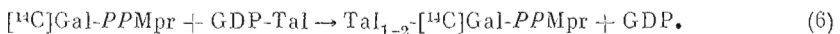
Результаты фракционирования гликозилтрансфераз из *S. kentucky** (см. рис. 2)

Фермент	Активность				Степень очистки, <i>n</i> раз
	в исходном препарате		во фракции **		
	общая, ед.	удельная, ед./мг белка	общая, ед.	удельная, ед./мг белка	
Галактозилфосфат-трансфераза	0,18	0,87	0,19	6,4	7,3
			0,09	9,0	10,3
			0,09	5,3	6,0
Маннозилтрансфераза I	0,32	1,6	0,14	14,7	9,1
Маннозилтрансфераза II	0,11	0,57	0,13	9,0	15,8

* См. примечание к табл. 1.

** Для галактозилтрансферазы данные (сверху вниз) соответствуют фракциям 8, 26, 31.

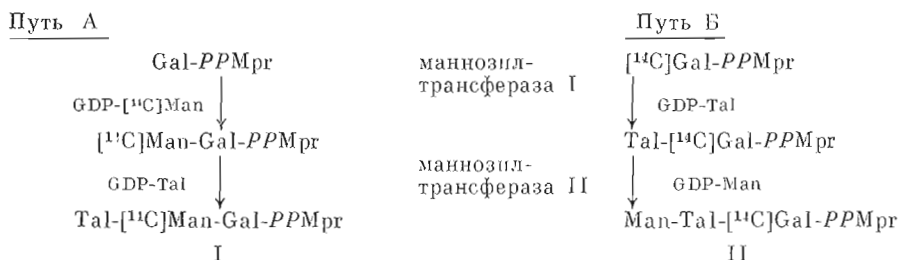
Разделение маннозилтрансфераз дало возможность их независимого применения в химико-ферментативном синтезе модифицированных олигосахаридных производных. С использованием суммарного препарата растворимых гликозилтрансфераз мы показали возможность замены обоих остатков манноз в полипренилпирофосфаттрисахариде на остатки *D*-талозы в реакции 6 при применении в качестве донора гликозильных остатков аналога GDP-Man — GDP-Tal [13]:



Моно- и диталозные олигосахариды с подвижностью R_{Gal} 0,51 и 0,36 соответственно разделялись при хроматографии на бумаге. Ранее при использовании препарата растворимых гликозилтрансфераз из *S. kentucky* и из близкородственного штамма *S. newport* было найдено, что в смеси, содержавшей нерадиоактивное производное Gal-PPMpr, GDP-Tal и dTDP-[¹⁴C]Rha, после инкубации с препаратом растворимых гликозилтрансфераз не происходило включения радиоактивной рамнозы во фракцию липидолигосахаридов [14]. Использованный тест отражает суммарное действие трех ферментов: двух маннозилтрансфераз и рамнозилтрансферазы. На основании последних данных можно заключить, что рамнозилтрансфераза не способна рамнозилировать остаток талозы вместо остатка маннозы, в то время как обе маннозилтрансферазы способны использовать в качестве донора остатка гексозы GDP-Tal.

Для избирательной замены одного из остатков маннозы и получения трисахаридных производных, содержащих одновременно остатки маннозы и талозы, мы воспользовались фракциями с маннозилтрансферазами I и II,

Получение с помощью маннозилтрансфераз I и II из *S. kentucky* модифицированных трисахаридных производных



проводя последовательную инкубацию с добавлением одного из нуклеотидсахаров — GDP-Man или GDP-Tal (см. пути А и Б на схеме). Трисахаридные фрагменты полученных производных I и II при хроматографии на бумаге имели подвижность $R_{\text{Gal}} 0,36$, близкую природному олигосахариду Ман-Ман-Гал ($R_{\text{Gal}} 0,34$). Обработкой трисахарида Tal-[¹⁴C]Ман-Гал α-маннозидазой не удается отщепить остаток маннозы. Это подтверждает то, что остаток [¹⁴C]маннозы экранирован остатком талозы. Необходимо подчеркнуть, что получение трисахаридных производных, в которых один из остатков маннозы избирательно заменен на остаток талозы, с помощью суммарного препарата гликозилтрансфераз практически неосуществимо: из-за невозможности остановить процесс гликозилирования на стадии дисахаридного производного при инкубации Gal-PPMpr с GDP-Man и GDP-Tal образуется смесь двух трисахаридных производных разного строения. Метод независимого использования маннозилтрансфераз I и II открывает новые возможности для получения олигосахаридов в рамках химико-ферментативного синтеза.

В результате проделанной работы показано, что высокоэффективная гель-хроматография позволяет провести предварительную очистку и частичное разделение суммы растворимых гликозилтрансфераз, растворенных из мембран клеток *S. anatum* и *S. kentucky* без потери активности. В случае *S. kentucky* удалось разделить две маннозилтрансферазы и направленно использовать их в химико-ферментативном синтезе модифицированных олигосахаридов.

Экспериментальная часть

Получение препаратов гликозилтрансфераз, определение радиоактивных веществ, общая методика проведения ферментативных реакций с использованием синтетических акцепторов, обработка α-маннозидазой (из конских бобов, Sigma, США) описаны ранее [12, 15]. Использовали препараты UDP-[¹⁴C]Gal, GDP-[¹⁴C]Man (Amersham, Англия); dTDP-[¹⁴C]Rha получена биосинтетически [16], синтез GDP-Tal описан в работе [13]. Хроматографию на бумаге проводили в системе *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3.

Гель-хроматографию гликозилтрансфераз осуществляли на колонке с суперозой (Superose 12 LKB-Pharmacia, Швеция) в 50 мМ трис-ацетатном буфере, pH 8,4, содержащем 0,1% Polytergent SL 305F (США) и 1 мМ дитиотреит (скорость элюции 0,5 мл/мин), собирали фракции по 1 мл и добавляли глицерин до конечной концентрации 20%. Для определения гликозилтрансферазных активностей отбирали 50 мкл фракции и проводили инкубацию с 10 нмоль синтетического акцептора и 25 нмоль радиоактивного нуклеотидсахара как описано [12].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nikaido H. // Bacterial membranes and walls. / Ed. Lieve L. NY: Dekker. 1973. p. 131—208.
2. Кусов Ю. Ю., Шibaев В. Н., Калинин Н. А., Курьянов В. В., Гоголашвили Л. М., Кочетков Н. К. // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. № 3. С. 438—448.
3. Дружинина Т. Н., Шibaев В. Н., Кочетков Н. К., Рожнова С. Ш., Килессо В. А. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 11. С. 1548—1552.

4. Кочетков Н. К., Шибает В. Н., Дружинина Т. Н., Гогилашвили Л. М., Данилов Л. Л., Торгов В. И., Мальцев С. Д., Уткина Н. С. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 262. № 6. С. 1393—1397.
5. Shibaev V. N., Danilov L. L., Druzhinina T. N., Gogilashvili L. M., Maltsev S. D., Kochetkov N. K. // FEBS Lett. 1982. V. 139. N 2. P. 177—180.
6. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. N 5259. P. 680—685.
7. Данилов Л. Л., Мальцев С. Д., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1484—1492.
8. Danilov L. L., Maltsev S. D., Shibaev V. N., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1981. V. 88. N 2. P. 202—211.
9. Торгов В. И., Паносян К. А., Смелянский А. Т., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 1. С. 83—90.
10. Данилов Л. Л., Уткина Н. С., Шибает В. Н., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 11. С. 1718—1722.
11. Шибает В. Н., Данилов Л. Л., Дружинина Т. Н., Торгов В. И., Гогилашвили Л. М., Уткина Н. С. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 4. С. 564—566.
12. Дружинина Т. Н., Гогилашвили Л. М., Сизова О. В., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1589—1596.
13. Шибает В. Н., Елисеева Г. И., Краевская М. А., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 7. С. 376—380.
14. Дружинина Т. Н., Гогилашвили Л. М., Шибает В. Н. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1242—1249.
15. Шибает 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.
16. Шибает В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Дружинина Т. Н., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 2. С. 249—256.

Поступила в редакцию
28.XII.1989

T. N. DRUZHININA, O. V. SIZOVA, V. I. TORGOV, V. N. SHIBAEV
GEL PERMEATION HPLC PARTIAL PURIFICATION OF GLYCOSYL
TRANSFERASES CATALYSING THE *SALMONELLA ANATUM*
AND *S. KENTUCKY* O-ANTIGENS BIOSYNTHESIS

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

The solubilized glycosyltransferases which catalyse the biosynthesis of *Salmonella anatum* and *S. kentucky* O-specific polysaccharides were partially purified by HPLC on Superose 12. Two mannosyl transferases from *S. kentucky* were separated by gel chromatography; these transferases were found useful for chemical-enzymic synthesis of polyripyrophosphate derivatives of trisaccharides Tal-Man-Gal and Man-Tal-Gal.