



УДК 542.91+577.15.154

БИОСИНТЕЗ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА  
*SALMONELLA SENFTENBERG*Шибасв В. Н., Дружинина Т. Н., Попова А. Н.,  
Кочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва  
Рожнова С. Ш., Килессо В. А.Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии  
Министерства здравоохранения СССР, Москва

Биосинтез О-специфического полисахарида *Salmonella senftenberg* протекает по блочному механизму с промежуточным образованием полипренилпирофосфатогликосахаридов, на восстанавливающем конце цепи которых находится остаток *D*-галактозы. С использованием препарата бактериальных мембран и растворимых гликозилтрансфераз продемонстрирован последовательный перенос остатков галактозилпирофосфата, *L*-рамнозы и *D*-маннозы с UDP-Gal, dTDP-Rha и GDP-Man на полипренилпирофосфат-акцептор. Процесс гликозилирования О-антигенного полисахарида протекает через образование полипренилмонофосфатглюкозы, с которой остаток глюкозы переносится на образующийся полипренилпирофосфатогликосахарид, причем акцепторами в реакции могут служить производные дисахарида и трисахарида. Препарат мембран из *S. senftenberg* катализирует полимеризацию полипренилпирофосфаттетрасахарида до полдсахарида с *M* 8000. Обсуждается сходство и различие механизма биосинтеза О-специфического полисахарида в *S. senftenberg* и изученных ранее *S. anatum* и *S. typhimurium*.

О-Специфические полисахариды салмонелл, относящихся к серологическим группам А, В, D и Е, имеют много общего в своей структуре (обзор — см. [1, 2]). Во всех случаях основная цепь полисахарида построена из повторяющихся трисахаридных звеньев *D*-маннозил-*L*-рамнозил-*D*-галактозы (-Man-Rha-Gal-). Различие антигенных свойств для разных микроорганизмов связано с тремя типами структурных различий в молекуле полисахарида: а) разными типами Man→Rha- и Gal→Man-связей в основной цепи полисахарида, б) присутствием разветвлений из остатков 3,6-дидезоксисахаров различной конфигурации, которые присоединены к остаткам маннозы основной цепи (штаммы серологических групп А, В и D), в) присутствием разветвлений из остатка α-*D*-глюкопиранозы, присоединенного к остаткам галактозы основной цепи 1→4- или 1→6-связями.

Целью настоящей работы было выяснение механизма биосинтеза О-специфического полисахарида *Salmonella senftenberg* — представителя серологической группы Е. Структура этого полисахарида, а также полисахаридов из некоторых штаммов, упоминаемых в данной статье, показана в табл. 1.

Биосинтез О-специфических полисахаридов был изучен ранее с использованием бесклеточных систем из *S. typhimurium* [3—6] и *S. anatum* [7—9]. Был показан блочный механизм биосинтеза, при котором повто-



Таблица 2

Включение радиоактивности (имп/мин) в органическую фазу при инкубации различных меченых нуклеотидсахаров с препаратами растворимых трансфераз (с добавлением морапренилфосфата) и мембран

Номер опыта	Состав нуклеотидсахаров инкубационной смеси	Радиоактивность органических фаз, имп/мин	
		для препарата мембран	для препарата растворимых трансфераз
1	UDP-[6- <sup>3</sup> H]Gal	7050	94 254
2	dTDP-[ <sup>14</sup> C]Rha	500	600
3	GDP-[ <sup>14</sup> C]Man	400	185
4	UDP-Gal, dTDP-[ <sup>14</sup> C]Rha	8070	57 750
5	UDP-Gal, GDP-[ <sup>14</sup> C]Man	—	285
6	UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-[ <sup>14</sup> C]Man	12 500	68 938
7	UDP-[ <sup>14</sup> C]Glc	14 200	11 563
8	UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-[ <sup>14</sup> C]Man	—	35 440
8a	UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-[ <sup>14</sup> C]Man, UDP-Glc	—	48 920

Таблица 3

Хроматографическая подвижность олигосахаридов (БХ, система А), полученных при инкубации растворимых трансфераз с различными смесями нуклеотидсахаров и морапренилфосфатом

Номер опыта	Состав нуклеотидсахаров инкубационной смеси	R <sub>Gal</sub>
1	UDP-Gal, dTDP-[ <sup>14</sup> C]Rha	0,90
2	UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-[ <sup>14</sup> C]Man	0,58
3	UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-[ <sup>14</sup> C]Man, UDP-Glc	0,40
4	UDP-Gal, dTDP-Rha, GDP-Man, UDP-[ <sup>14</sup> C]Glc	0,40
5	UDP-Gal, UDP-[ <sup>14</sup> C]Glc	1,18 *
6	UDP-Gal, dTDP-Rha, UDP-[ <sup>14</sup> C]Glc	0,55
7	UDP-[6- <sup>3</sup> H]Gal, dTDP-[ <sup>14</sup> C]Rha, GDP-[ <sup>14</sup> C]Man	0,58
7a	UDP-[6- <sup>3</sup> H]Gal, dTDP-[ <sup>14</sup> C]Rha, GDP-[ <sup>14</sup> C]Man, UDP-[ <sup>14</sup> C]Glc	0,40

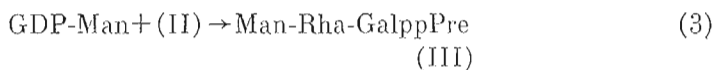
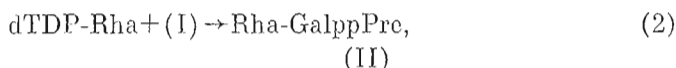
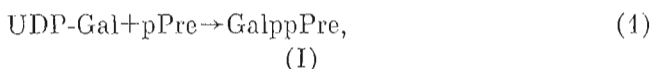
\* Продукт реакции устойчив к мягкой фенольной обработке [21] и сахар получен после кислотного гидролиза (0,01 н. HCl, 100°, 15 мин).

монстрировано, что в реакциях биосинтеза О-антигенного полисахарида с использованием ферментов препарата мембран и растворимых трансфераз из *S. anatum* фосфат бактериального полипренола может быть эффективно заменен фосфатом морапренола [20] вплоть до стадии полимеризации [11]. В настоящей работе мы использовали морапренилфосфат, а реакцию гликозилирования, ранее нами не изучавшуюся, для сравнения проводили и с бактериальным полипренилфосфатом.

Биосинтез повторяющегося звена основной цепи — маннозил-рамнозил-галактозы. Идентичность структуры основной цепи О-антигенных полисахаридов *S. anatum* и *S. senftenberg* позволяла предполагать одинаковый механизм их биосинтеза. Действительно, при внесении одного из меченых нуклеотидсахаров в систему, содержащую препарат бактериальных мембран или растворимые трансферазы и морапренилфосфат, мы наблюдали эффективное включение радиоактивности в органическую фазу (где обнаруживаются липидсвязанные производные) только для UDP-Gal (табл. 2,

опыты 1—3). Перенос рамнозы из dTDP-Rha происходил только после включения галактозы (ср. опыты 2 и 4), маннозы — из GDP-Man — после включения галактозы и рамнозы (ср. опыты 3, 5 и 6). Контроль за образованием олигосахаридов осуществляли также хроматографически после проведения гидролиза продуктов реакции под действием фенола. Выделение из инкубационных смесей дисахаридных и трисахаридных фрагментов (см. табл. 3), а также обнаружение переноса радиоактивности на эндогенный липид в присутствии препарата мембран (табл. 2) служило дополнительным доказательством того, что обнаруженные реакции связаны с биосинтезом O-антигенной цепи. Тот факт, что отщепление липида при обработке фенолом в мягких условиях (5 мин, 70°) [21] происходило, свидетельствовал об образовании полипренилпирофосфатных производных, так как для полипренилмонофосфатсахаров характерна большая стабильность в этих условиях (см. ниже).

Для определения молярных соотношений моносахаридов в олигосахаридном продукте реакции был проведен опыт с UDP-[6-<sup>3</sup>H]Gal, dTDP-[<sup>14</sup>C]Rha, GDP-[<sup>14</sup>C]Man. Жесткий кислотный гидролиз выделенного олигосахарида с последующей количественной БХ (контроль по радиоактивности) показал присутствие глюкозы, рамнозы и маннозы в соотношениях, близких к 1 : 1 : 1. Приведенные данные свидетельствуют, что под действием препарата растворимых гликозилтрансфераз и соответствующих субстратов могут происходить следующие реакции:



(Pre — остаток морапренола или бактериального полипренола). Следовательно, препарат растворимых трансфераз из *S. senftenberg* катализирует реакции, аналогичные продемонстрированным ранее для *S. anatum*, и можно сделать вывод, что и для изучаемого микроорганизма сборка повторяющегося звена происходит на полипренилфосфате, причем первым переносится остаток D-галактозилфосфата.

Проведенные эксперименты оказались интересными и в том отношении, что продемонстрировали высокую эффективность синтетического фосфата морапренола в качестве липидного акцептора с используемым штаммом салмоцелл, так же как и с *S. anatum* [14].

*Процесс гликозилирования. Идентификация полипренилфосфатглюкозы.* Как отмечалось выше, для построения боковых цепей O-специфических полисахаридов известны два пути: прямой перенос моносахаридного остатка с нуклеотидсахаров (в случае 3,6-дидезоксисахаров) и через образование полипренилмонофосфатсахара. При инкубации растворимых гликозилтрансфераз *S. senftenberg* и морапренилфосфата мы обнаружили включение радиоактивности в органическую фазу из UDP-[<sup>14</sup>C]Glc при отсутствии других нуклеотидсахаров (табл. 2, опыт 7). Для доказательства того, что включается именно остаток глюкозы, а не продукт ее ферментативной эвимеризации, липидсвязанный сахар гидролизовали (0,1 н. HCl, 100°, 30 мин) и продукты анализировали хроматографией на бумаге в системе А. Основной пик радиоактивности находился в зоне глюкозы, а в зоне галактозы заметной радиоактивности не обнаружено. Следовательно, в используемом препарате растворимых трансфераз практически не проявляется UDP-Glc-4-энимераза (КФ 5.1.3.2) и продукт реакции представляет собой производное глюкозы.

Устойчивость к различным обработкам морепренилсвязанной [<sup>14</sup>C]глюкозы и морепренилпирофосфат-[<sup>14</sup>C]галактозы, полученных с препаратом растворимых трансфераз

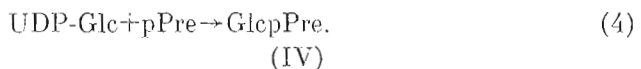
Тип липидного производного	Вид обработки			
	мягкий щелочной гидролиз		хроматография в системе Б	мягкая фенольная обработка
	радиоактивность, имп/мин			
	в органической фазе	в водной фазе	R <sub>f</sub> основного пика радиоактивности	радиоактивность, % к исходному, оставшаяся в феноле после обработки
[ <sup>14</sup> C]GalppPre (I)	100	5250	0,4	47
[ <sup>14</sup> C]GlcPPre (IV)	2215	1190	0,9	100

Образование липидсвязанной глюкозы наблюдали и в условиях, аналогичных описанным ранее для *S. typhimurium* [14] с препаратом мембран, когда акцептором остатка глюкозы служил эндогенный бактериальный липид. Для прямого сравнения акцепторной способности природного акцептора и растительного полипренилфосфата мы инкубировали препарат растворимых трансфераз с UDP-[<sup>14</sup>C]Glc при добавлении по 50 нмоль морепренилфосфата или бактериального полипренилфосфата. В органической фазе обнаружили 43 пмоль глюкозилморепренилфосфата и 220 пмоль производного бактериального полипренилфосфата, и, следовательно, в условиях определения фосфат бактериального полипрениола оказался более эффективным акцептором остатка глюкозы.

В полипрениолфосфосахарах остатки сахаров могут присоединяться к полипрениолу как пирофосфатной, так и монофосфатной связью. Для выбора между этими двумя возможностями мы воспользовались известными различиями в стабильности полипренилмоно- и -пирофосфатных производных к мягкой щелочной обработке и действию фенола [21].

При мягкой щелочной обработке морепренилпирофосфатгалактозы (I) 100% радиоактивности перешло из органического слоя в водную фазу (табл. 4), что соответствовало расщеплению пирофосфатной связи и освобождению водорастворимого фосфата сахара. В этих же условиях основное количество липидсвязанной глюкозы остается нерасщепленной, что характерно для полипрениолмонофосфатных производных. Хроматография в системе Б, где тоже может происходить щелочной гидролиз, четко выявляет различия в стабильности этих липидсахаров (табл. 4). Пик радиоактивности проб с липидсвязанной глюкозой имеет подвижность, характерную для нерасщепленного полипренилфосфатсахара; в пробе с соединением (I) пик радиоактивности оказался в зоне циклофосфата сахара. Результаты фенольной обработки (табл. 4) также выявили различия, характерные для этих двух типов липидсахаров, и подтвердили заключение о том, что образуется полипренилмонофосфатглюкоза (IV).

Приведенные данные показывают, таким образом, что препарат растворимых трансфераз из *S. senftenberg* содержит фермент, катализирующий следующую реакцию:



Участие полипренилмонофосфатглюкозы в реакции глюкозилрования олигосахаридных звеньев. Дальнейшая судьба остатка глюкозы после ее переноса на полипренилфосфат была прослежена в следующих экспериментах: упаренную органическую фазу, содержащую морепренилмоно-

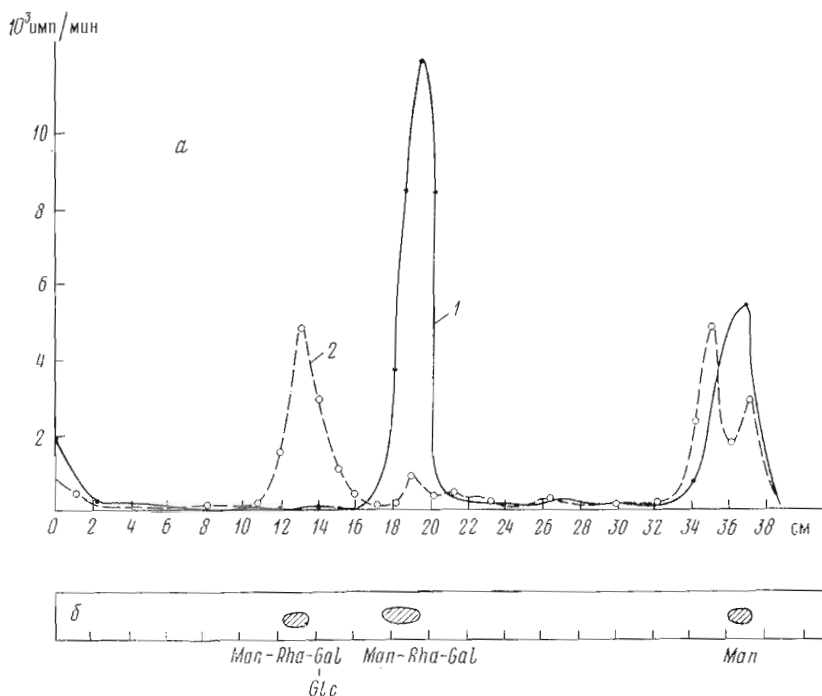
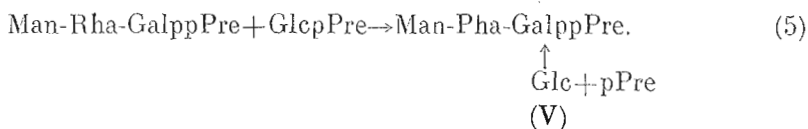


Рис. 1. Хроматография в системе А олигосахаридов, полученных в отсутствие донора глюкозы (1) и при добавлении липидмонофосфат<sup>[14C]</sup>глюкозы (2) (а) и смеси стандартных олигосахаридов (б)

фосфат<sup>[14C]</sup>глюкозу, вносили в инкубационную смесь с растворимыми трансферазами, UDP-Gal, dTDP-Rha и GDP-<sup>[14C]</sup>Man (1-й вариант) или те же немеченые нуклеотидсахара (2-й вариант). Параллельно готовились смеси для инкубации без морапренилмонофосфат<sup>[14C]</sup>глюкозы. После стандартной обработки инкубационных смесей для выделения олигосахаридов из их полипренольных производных (см. «Экспериментальную часть») радиоактивные продукты анализировали хроматографией на бумаге в системе А (рис. 1). В контрольной пробе, содержавшей GDP-<sup>[14C]</sup>Man, но без производного <sup>[14C]</sup>глюкозы (1-й вариант), пик радиоактивности соответствовал трисахариду (табл. 3). В пробах, инкубированных вместе с морапренилмонофосфатглюкозой, радиоактивный продукт имел более низкую подвижность, соответствующую подвижности тетрасахарида.

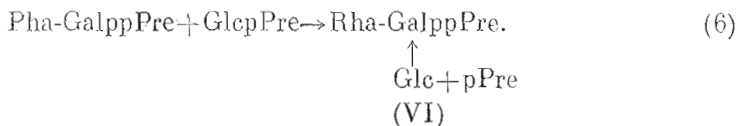
Гликозилтрансферазы инкубировали далее с набором меченых нуклеотидсахаров (UDP-(6-<sup>3H</sup>)Gal, dTDP-<sup>[14C]</sup>Rha, GDP-<sup>[14C]</sup>Man и UDP-<sup>[14C]</sup>Glc) и морапренилфосфатом. Продукты выделяли стандартным методом (опыт 7а, табл. 3), олигосахариды гидролизовали в жестких условиях и продукты гидролиза анализировали хроматографией на бумаге в системе А (рис. 2). Как видно, положение пиков радиоактивности соответствует моносакхаридному составу тетрасахаридного повторяющегося звена. Молярное соотношение для моносакхаридов, определенное после элюции зон радиоактивности, соответствовало 1:1:1:1. Значит, при добавлении в инкубационную смесь полипренольного производного глюкозы происходило увеличение размера олигосахаридного звена на один остаток моносакхаридов. Из представленных данных следует, что полипренилмонофосфатглюкоза может служить донором остатка глюкозы в реакции гликозиллирования повторяющегося трисахаридного звена и само гликозиллирование происходит до стадии полимеризации, в процессе сборки

повторяющегося звена, т. е. имеет место реакция



Ферменты, катализирующие этот процесс, присутствуют в препарате растворимых трансфераз.

Далее было необходимо определить наименьшую длину цепи олигосахарида, который мог служить субстратом реакции гликозилирования. С этой целью в инкубационную смесь, содержащую гликозилтрансферазы, морапренилфосфат и UDP-[<sup>14</sup>C]Glc, добавляли последовательно по одному из остальных немеченых нуклеотидсахаров. Анализ углеводных фрагментов продуктов реакции методом хроматографии на бумаге показал (табл. 3), что остаток глюкозы может включаться только при наличии UDP-[<sup>14</sup>C]Gal и dTDP-Rha, т. е. после образования дисахаридного производного (II),



Добавление третьего нуклеотидсахара — GDP-Man — повышало суммарную радиоактивность в зонах олигосахаридов. Таким образом, гликозилирование в исследованной системе может начинаться на стадии дисахаридного производного полипренилпирофосфата и идет более эффективно при наличии трисахаридного производного (III). Повышение количества образовавшихся лигандсвязанных олигосахаридов было замечено и при сравнении включения радиоактивности в органическую фазу в пробах, содержащих все нуклеотидсахара, кроме UDP-Glc, и при ее добавлении (табл. 2, опыты 8, 8а).

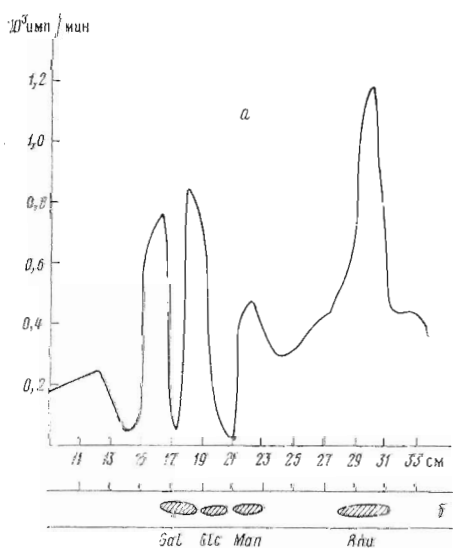


Рис. 2

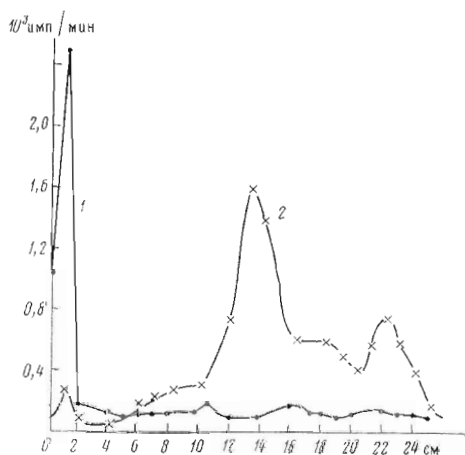


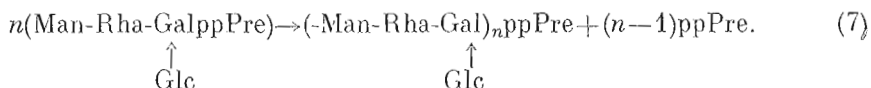
Рис. 3

Рис. 2. Хроматография в системе А гидролизата тетрасахарида (распределение радиоактивности) (см. табл. 3, опыт 7) (а) и стандартных моносахаридов (б)

Рис. 3. Хроматография в системе В инкубационной смеси, содержащей морапренилпирофосфаттетрасахарид и препарат мембран (1), контрольная проба с инактивированным белком (2)

Как уже упоминалось, при биосинтезе O-специфического полисахарида *S. anatum* субстратом ферментативной полимеризации служит трисахаридное производное полипревола (III). В случае *S. typhimurium* в реакцию полимеризации могло вступать как аналогичное производное трисахарида, так и производное тетрасахарида, содержащее 3,6-дидезоксисахар. Вопрос о возможности ферментативной полимеризации производного тетрасахарида, содержащего разветвление у остатка моносахарида на восстанавливаемом конце цепи, оставался неясным, и это делало особенно интересным исследование ферментативной полимеризации морапренилпирофосфаттетрасахарида (V) с ферментом из *Salmonella senftenberg*.

Полимераза, необходимая для этой стадии, при получении препарата растворимых трансфераз остается связанной с цитоплазматической мембраной [10], и для дальнейшей работы мы использовали препарат мембран. Производное (V), меченное [<sup>14</sup>C]Man, полученное с препаратом растворимых трансфераз, солибилизировали с помощью твина-85 и инкубировали с препаратом мембран. Анализ всей инкубационной смеси в системе В (рис. 3) обнаружил единственный пик радиоактивности в районе старта. В контрольной пробе, содержавшей инактивированный прогреванием препарат мембран, основной пик радиоактивности сосредоточился в зоне подвижности липидпирофосфаттетрасахарида (V). Этот результат указывает на протекание ферментативной полимеризации (реакция 7). Распределение радиоактивности соответствует образованию полимера с выходом 90%.



Образование полимера наблюдали также при инкубации производного (IV). Для дальнейшей характеристики полимера, полученного из производного (V), провели отщепление полипревола мягким кислотным гидролизом, обработку водорастворимого продукта щелочной фосфатазой и выделение нейтральной фракции полисахарида электрофорезом в системе Г. Для оценки молекулярного веса полученного продукта далее была проведена его гель-фильтрация. По данным гель-фильтрации на сефадексах G-25 и G-50 (рис. 4а, б), на которых исключаются полимеры с  $M > 5000$  и 10 000 соответственно, молекулярный вес выделенного полисахарида меньше 10 000, но больше 5000. При гель-фильтрации на сефадексе G-100 полимер выходил почти одновременно с маркером, имеющим  $M$  9300. Используя кривую молекулярно-вещного распределения маркера [22], можно оценить молекулярный вес полисахарида как 8000.

Проведенное исследование показало, что биосинтез O-специфического полисахарида *S. senftenberg* включает стадии, аналогичные для биосинтеза O-антигенов салмонелл серологических групп А, В и Е. Обнаруженные различия связаны с процессом гликозилирования.

Демонстрация реакций 1—3 под действием препарата растворимых гликозилтрансфераз позволяет сделать вывод о том, что биосинтез протекает по блочному механизму с образованием полипренолфосфосахарных предшественников, причем на восстанавливаемом конце цепи находится, как и в других известных случаях, остаток галактозы.

Введение разветвлений, содержащих остаток глюкозы, в полисахарид в *S. senftenberg*, как и в ранее изученных случаях, начинается с образования полипренилмонофосфатглюкозы (реакция 4). Однако в отличие от данных, полученных на бесклеточных системах предшественников других серогрупп [15, 19, 20], нам с помощью препарата растворимых гликозилтрансфераз удалось показать, что включение остатка глюкозы в состав углеводной цепи может происходить до полимеризации повторяющегося звена. Акцептором глюкозы при этом может служить остаток галактозы в полипренилпирофосфатном производном дисахарида (реакция 6) или



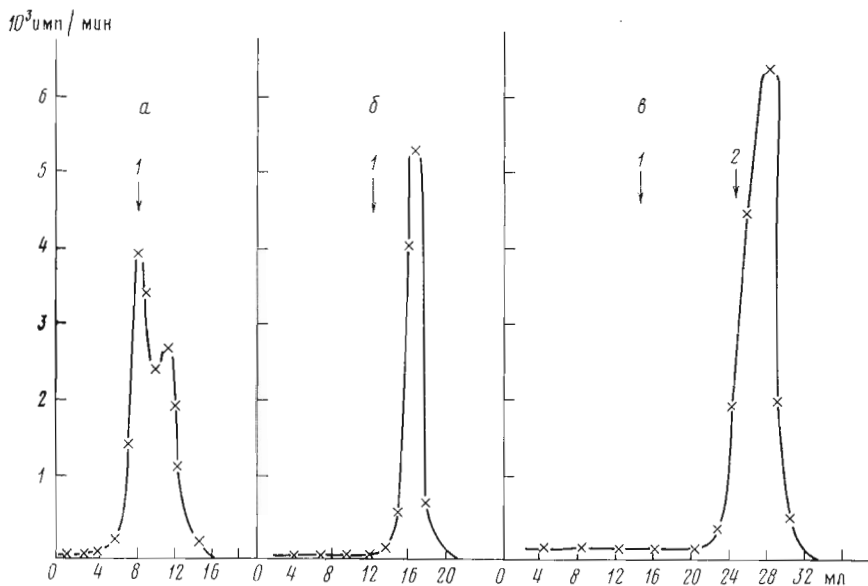


Рис. 4. Распределение радиоактивности в элюатах при гель-фильтрации полисахарида на сефадексах: G-25 (а), G-50 (б), G-100 (в). Стрелками указаны времена элюции голубого декстрана с  $M 1 \cdot 10^6$  (1) и  $1 \cdot 10^4$  (2)

трисахарида (реакция 5). Далее, образовавшееся в результате последней реакции производное тетрасахарида может претерпевать ферментативную полимеризацию (реакция 7).

Таким образом, в изученном нами случае можно рассматривать включение остатка глюкозы в олигосахаридные предшественники как одну из стадий биосинтеза повторяющегося звена полисахарида, а не как модификацию растущей или уже построенной полимерной цепи, как это показано было ранее на других примерах. Возможно, что разный механизм глюкозилирования O-специфического полисахарида в штаммах салмонеллы серологических групп В и Е<sub>3</sub> [19, 20] и серологической группы Е<sub>1</sub> (данная работа) отражает разные пути введения 1→4- и 1→6-разветвлений в полимерную цепь.

С другой стороны, нельзя исключить, что благодаря существованию определенной пространственной организации ферментов в бактериальной мембране («улицы ферментов») процесс глюкозилирования *in vivo* может протекать и иначе.

Полученные данные о способности полимеразы *S. senftenberg* использовать в качестве субстратов производные разветвленного тетрасахарида указывают на возможность химико-ферментативного синтеза соответствующего O-специфического полисахарида. Тетрасахаридное повторяющееся звено этого полисахарида было недавно получено химическим путем в нашей лаборатории [23].

### Экспериментальная часть

В работе использовали культуру штаммов *S. senftenberg* (1, 3, 19, *gst*), полученную из музея Государственного института контроля и стандартизации медицинских и биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Микробная взвесь штамма выращивалась на пептонной воде с дрожжевым экстрактом [24] в течение 18 ч при 37°.

Препараты мембран и растворимых гликозилтрансфераз получали по методу Осборн [10], как описано нами ранее [11]. Количество белка в ферментных препаратах, определенное по Лоури [25], составило для пре-

парата мембран 20 мг/мл, для препарата растворимых трансфераз 3,46 мг/мл.

**Нуклеотидсахара.** 234 мКи/ммоль UDP-[<sup>14</sup>C]Gal, 184 мКи/ммоль GDP-[<sup>14</sup>C]Man, 320 мКи/ммоль UDP-[<sup>14</sup>C]Glc (Amersham, Англия) разбавляли соответствующими нерадиоактивными нуклеотидсахарами до удельной радиоактивности 10 мКи/ммоль для GDP-Man и 20 мКи/ммоль для UDP-Gal и UDP-Glc. UDP-[6-<sup>3</sup>H]Gal получали по методу [26], как описано ранее [11]; в работе использовали UDP-[6-<sup>3</sup>H]Gal с удельной радиоактивностью 70 мКи/ммоль. Получение dTDP-[<sup>14</sup>C]Rha проводили по методу [27]. В работе использовали нерадиоактивные препараты UDP-Gal, GDP-Man (Calbiochem, США), UDP-Glc (Merck, ФРГ), dTDP-Rha, полученную по методике [28].

**Полипепенилфосфаты.** В работе использовали морепепенилфосфат, полученный по методу [20], а также бактериальный полипепенилфосфат, выделенный по методу [10] из клеток *E. coli*.

**Аналитическая техника.** Радиоактивные вещества определяли с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика Isoscar-300 (Nuclear Chicago, США) с использованием толуольного сцинтиллятора [12] для локализации радиоактивных зон на бумаге и диоксанового сцинтиллятора [29] для водных растворов. Определение радиоактивности в растворах, содержащих хлороформ, проводили как описано в работе [11]. Радиоактивные вещества элюировали с бумаги водой. При гомогенном счете эффективность для трития составляла около 30%, для <sup>14</sup>C — 70%. Для хроматографии на бумаге использовали системы: *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (А), 3 М аммиак в 80% этаноле (Б), этанол — 1 М ацетат аммония (рН 7,5), 5 : 2 (В). Использовали бумагу FN-11 (Filtrak, ГДР) или Whatman 1M. Нерадиоактивные углеводы обнаруживали на бумаге с помощью анилинфталата. Электрофорез на бумаге (40 В/см, 3 ч) проводили в 0,05 М триэтиламмонийбикарбонате (Г).

**Гель-фильтрацию** полисахаридов проводили на колонках (1×40 см) с сефадексами G-25, G-50 и G-100 в 0,05 М ацетате аммония, рН 7,3.

**Общая методика** проведения ферментативных реакций была аналогична описанной ранее для *S. anatum* [11]. При работе с препаратом растворимых трансфераз аликвоту раствора фосфата морепепенила (50 нмоль) упаривали в токе азота, остаток солиобилизовали встряхиванием в 10 мкл метанола и 15 мкл 0,5% водного раствора гвина-85, далее добавляли 5 мкл 1 М трис-НСl-буфера (рН 8,5), 10 мкл 0,1 MgCl<sub>2</sub> и по 25 нмоль нуклеотидсахаров в различных комбинациях в соответствии с конкретным опытом. Последним добавляли ферментный препарат (60–100 мкг белка), общий объем инкубационной смеси составлял 100–120 мкл. Пробы инкубировали при 37° 25 мин при получении липидсвязанных олигосахаридов, при 25° 25 мин для получения липидных производных глюкозы и галактозы, при 25° 2 ч в опытах по глюкозилрованию с участием липидмонофосфат-[<sup>14</sup>C]глюкозы.

С препаратом мембран составляли аналогичные инкубационные смеси, но не добавляли морепепенилфосфат и вносили 5 мкл EDTA (рН 8,0), 200–300 мкг белка, инкубировали 1 ч при 25°. Ферментативную реакцию во всех случаях останавливали добавлением 2 мл смеси хлороформ — метанол, 2 : 1, пробы обрабатывали как описано ранее [12] для определения радиоактивности в водной фазе.

**Идентификация полипепенилпирофосфатолигосахаридов.** Для выделения олигосахаридных фрагментов полипепенилпирофосфатолигосахариды обрабатывали фенолом и фосфомоноэстеразой, как описано в работе [12]. Для идентификации моносахаридного состава выделенные олигосахариды подвергали гидролизу в 0,5 н. HCl (100°, 16 ч). Соляную кислоту удаляли из гидролизатов многократной отгонкой с водой и остаток хроматографировали в системе А. Для опытов 7 и 7а (табл. 3) определяли молярное соотношение моносахаридов: для опыта 7 — Gal : Man : Rha, 1 : 0,93 : 1,11 и для опыта 7а — Gal : Glc : Man : Rha, 1 : 0,93 : 1,16 : 1,02.

*Сравнение устойчивости GalppPre и GlcpPre в условиях щелочного гидролиза [14].* Липидгексозы растворяли в 0,3 мл 0,1 н. NaOH в смеси хлороформ — метанол (1:4), инкубировали 30 мин при 20°, добавляли 3 мл воды, 2 мл метанола, 4 мл хлороформа и встряхивали. Определяли радиоактивность в обеих фазах.

*Получение три- и тетрасахаридных производных полипренилпирофосфата [11].* В инкубационные смеси с растворимыми трансферазами добавляли UDP-Gal, dTDP-Rha и GDP-[<sup>14</sup>C]Man, в случае тетрасахаридного производного добавляли еще UDP-Glc. Инкубировали 2 ч при 25°, полученные органические фазы хранили при -70° и упаривали непосредственно перед проведением полимеризации.

*Полимеризация.* К упаренному полипренилпирофосфатогликосахариду (50000 имп/мин, 3 нмоль) добавляли 30 мкл 0,2% твина-85, 45 мкл 2 М трис-малеата (pH 6,0), 15 мкл 0,1 MgCl<sub>2</sub>, 30 мкл (600 мкг белка) препарата мембран. Через 1 ч при 25° реакцию останавливали добавлением 3 мл 0,1 н. уксусной кислоты, содержащей 5 мМ EDTA. Смесь центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Осадки промывали на холоду 0,1 н. уксусной кислотой (2×3 мл) и далее проводили мягкий кислотный гидролиз для отщепления водорастворимого полисахаридфосфата (0,5 мл 0,5 н. уксусная кислота, 30 мин, 100°), центрифугировали (3000 об/мин, 10 мин), супернатант упаривали и дефосфорилировали полисахарид с помощью щелочной фосфатазы из кишок телят (КФ 3.1.3.1, Calbiochem, США) — 50 мкг в 100 мкл трис-HCl (pH 8,5), 37°, 3 ч.

Авторы глубоко благодарны Л. Л. Данилову за предоставление мораренилфосфата и Е. А. Киселевой за предоставление бактериального полипренилфосфата.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Luderitz O., Westphal O., Staub A. M., Nikaido H. (1971) in: Microbian Toxins (Weinbaum G., Kadis S., Ajl S. J., eds), vol. 4, pp. 45-234, Academic Press, New York - London.
2. Kito H., Nikaido H. (1973) J. Bacteriol., 113, 672-679.
3. Weiner I. M., Higuchi T., Rothfield L., Salmarsch-Andrew M., Osborn M. J., Horecker B. L. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 228-234.
4. Osborn M. J., Yuan Tze-Yuen R. (1968) J. Biol. Chem., 243, 5145-5152.
5. Kent J. L., Osborn M. J. (1968) Biochemistry, 7, 4409-4418.
6. Osborn M. J., Weiner J. M. (1968) J. Biol. Chem., 243, 2631-2640.
7. Wright A., Dankert M., Robbins P. W. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54, 235-241.
8. Dankert M., Wright A., Kelley W. S., Robbins P. W. (1966) Arch. Biochem. and Biophys., 116, 425-435.
9. Kanegasaki S., Wright A. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 951-958.
10. Osborn M. J., Cynkin N. A., Gilbert J. M., Muller L., Singh M. (1972) in: Methods in Enzymol. (Golowick C. P., Kaplan N. O., eds), vol. 28B, Complex Carbohydrates, part B, pp. 583-601, Acad. Press, New York - London.
11. Шибаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Дружинина Т. Н., Калинин И. А., Кочетков Н. К., Килессо В. А., Рожнова С. Ш. (1978) Биоорг. химия, 4, 47-56.
12. Шибаев В. Н., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Дружинина Т. Н., Кочетков Н. К. (1978) Биоорг. химия, 4, 244-256.
13. Шибаев В. Н., Дружинина Т. Н., Елисева Г. И., Кочетков Н. К. (1978) Биоорг. химия, 4, 257-267.
14. Nikaido K., Nikaido H. (1971) J. Biol. Chem., 246, 3912-3919.
15. Wright A. (1971) J. Bacteriol., 105, 927-936.
16. Nikaido H., Nikaido K., Nakae T., Makela P. H. (1971) J. Biol. Chem., 246, 3902-3911.
17. Uchida T., Makino T., Kurahashi K., Uetake H. (1965) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 21, 354-360.
18. Takeshita M., Makela P. H. (1971) J. Biol. Chem., 246, 3920-3927.
19. Sasaki T., Uchida T., Kurahashi K. (1974) J. Biol. Chem., 249, 761-772.
20. Вергунова Г. И., Глуходей И. С., Данилов Л. Л., Елисева Г. И., Кочетков Н. К., Троицкий М. Ф., Усов А. И. (1977) Биоорг. химия, 3, 1484-1492.
21. Garcia P. R., Recondo E., Dankert M. (1974) Eur. J. Biochem., 43, 93-105.
22. Granath K. A., Kvist B. E. (1967) J. Chromatogr., 28, 69-81.

23. Kochetkov N. K., Malysheva N. N., Torgov V. I., Klimov E. M. (1977) *Carbohydr. Res.*, **4**, 269–274.
24. Мейкелл Дж., Мейкелл Э. (1967) *Экспериментальная микробиология*, с. 63, «Мир», М.
25. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
26. Nelsestuen G. L., Kirkwood S. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 3828–3834.
27. Bernstein V. L., Robbins Ph. W. (1965) *J. Biol. Chem.*, **237**, 391–397.
28. Шибяев В. Н., Елисеева Г. И., Кусов Ю. Ю., Петренко В. А., Мищенко С. С., Кочетков Н. К. (1976) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2584–2587.
29. Bray G A. (1960) *Anal. Biochem.*, **1**, 279–285.

Поступила в редакцию  
27.XII.1978

## BIOSYNTHESIS OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE IN *SALMONELLA*

*SENFTENBERG*

SHIBAЕV V. N., DRUZHININA T. N., POPOVA A. N., KOCHETKOV N. K.,  
ROZHNОВА S. SH., KILESSO V. A.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; Central Research Institute of Epidemiology,  
Health Ministry of the USSR, Moscow*

A block mechanism with intermediate formation of polyprenyl pyrophosphate oligosaccharides was shown to operate in biosynthesis of the O-specific polysaccharide in *Salmonella senftenberg*. The oligosaccharide derivatives formed contain *D*-galactose residue at the reducing end of the chain. Consecutive transfer of *D*-galactosyl phosphate, *L*-rhamnose and *D*-mannose residues from UDP-Gal, dTDP-Rha and GDP-Man onto a polyprenyl phosphate acceptor was demonstrated with both cell envelope and solubilized glycosyl transferases preparations. The glycosylation pathway of the O-specific polysaccharide includes formation of polyprenyl monophosphate *D*-glucose followed by transfer of the monosaccharide residue onto the polyprenyl pyrophosphate oligosaccharides. The disaccharide and trisaccharide derivatives may serve as glucosyl acceptor in the reaction. A cell envelope preparation from *S. senftenberg* catalyzed the conversion of the polyprenyl pyrophosphate tetrasaccharide into the polysaccharide with molecular weight of ca. 8000. The similarities and differences in the mechanisms of the O-specific polysaccharide biosynthesis in *S. senftenberg*, *S. anatum* and *S. typhimurium* were discussed.