



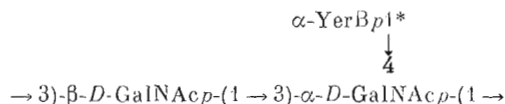
УДК 577.144.5.088:579.842.23

## СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *YERSINIA INTERMEDIA* СЕРОВАРА О : 4,33

Зубков В. А., Горшкова Р. П., Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ  
Академии наук СССР, Владивосток

При автогидролизе липополисахарида *Yersinia intermedia* серовара О : 4,33 выделен О-специфический полисахарид, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих по два остатка 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозы и остаток необычного разветвленного моносахарида — 3,6-дидезокси-4-С-(1-гидроксиэтил)-*ксило*-гексозы (YerB). На основании данных <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии, результатов метилирования и НФ-сольволиза установлена структура повторяющегося звена полисахарида:



В последние годы на основе биохимической характеристики и данных ДНК-гибридизации предложена новая классификация микроорганизма *Yersinia enterocolitica* — из него дополнительно выделены три новых вида: *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* [1]. Такое разделение требует четкого серотипирования, которое является необходимым приложением эпидемиологического изучения заболеваний, вызываемых данным микроорганизмом. Исследование О-антигенов позволит создать единую классификационную систему на основе структур О-специфических полисахаридов.

В настоящем сообщении приведены результаты структурного исследования О-специфического полисахарида из липополисахарида (ЛПС) микроорганизма О : 4,33 (штамм 1476), который ранее был отнесен к *Y. enterocolitica*, а в последнее время по расширенной классификации — к *Y. intermedia* [2].

Из ацетонового порошка *Y. intermedia* серовара О : 4,33 (штамм 1476) выделен ЛПС при экстракции по методу Вестфала [3]. Расщепление ЛПС 1% уксусной кислотой приводит к значительной деградации О-специфического полисахарида. Поэтому ЛПС разрушали автогидролизом (4 ч, 100° С), липид А удаляли центрифугированием и хроматографией гаптана на сефадексе G-100 выделяли три фракции: исходный ЛПС с примесью глюкоана, О-специфический полисахарид (ПС) и низкомолекулярную фракцию. Первая и последняя фракции в дальнейшем не исследовались.

В спектре <sup>13</sup>С-ЯМР полисахарида (рис. 1) наблюдаются сигналы двух С-метильных групп (14,1 и 17,9 м. д.), двух N-ацетильных (23,2; 23,5 и 174,6; 174,1 м. д.), дезоксизвена (30,3 м. д.), атомов углерода, связанных с аминогруппой (49,1 и 51,3 м. д.), и сигналы, соответствующие двум гидроксиметильным группам (61,4 и 62,1 м. д.), а также трем атомам углерода аномерных центров (94,5; 99,7 и 104,6 м. д.). Общее количество сигналов в спектре (24) соответствует трисахаридному повторяющемуся звену, содержащему остатки двух гексоз и октозы с С-метильными и ацетамидными группами.

\* YerB — 3,6-дидезокси-4-С-(1-гидроксиэтил)-*ксило*-гексоза (перспиноза В).

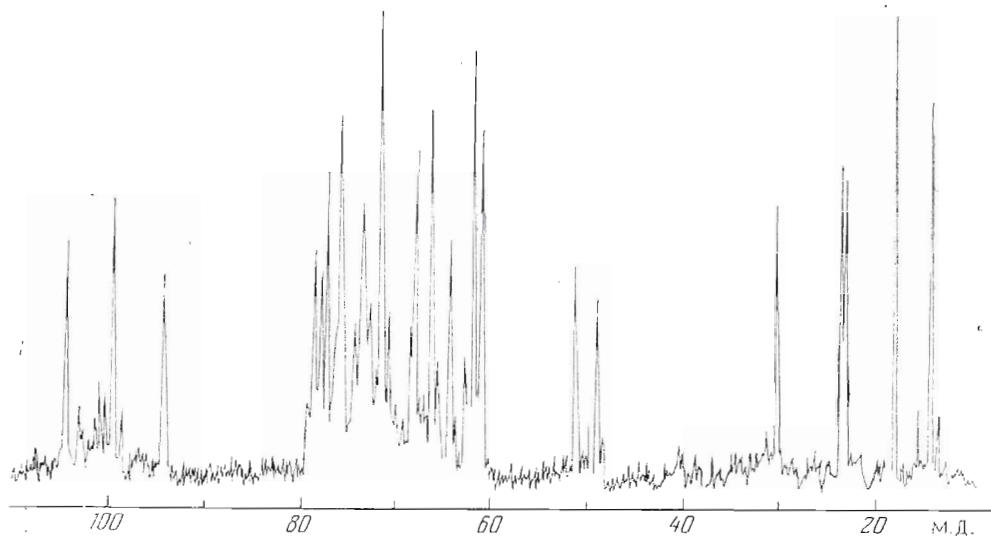


Рис. 1.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида

В гидролизате ПС идентифицированы *D*-галактозамин и иерсиниоза В (3,6-дидезокси-4-С-(1-гидроксиэтил)-*к*-сило-гексоза) [4]. Для определения количественного соотношения моносахаридов проводили дезаминирование гидролизата ПС. В виде ацетатов полиолов были идентифицированы иерсиниоза В и 2,5-ангидроталоза в соотношении 1 : 2. Последняя, как известно, образуется в результате дезаминирования галактозаминна [5]. Таким образом, повторяющееся звено полисахарида включает один остаток иерсиниозы В и два остатка *N*-ацетилгалактозаминна. Иерсиниоза В и галактозамин были выделены из гидролизата полисахарида с помощью препаративной хроматографии на бумаге. На основании величины оптического вращения галактозамин был отнесен к *D*-ряду.

Для установления порядка связей между моносахаридными остатками полисахарид метилировали водистым метилом в присутствии метилсульфинилкарбаниона по методу Хакомори [6]. В результате анализа частично метилированных ацетатов метилгликозидов методом хроматомасс-спектрометрии идентифицированы сполна метилированная иерсиниоза В, 4,6-ди-*O*-метилгалактозамин и 6-*O*-метилгалактозамин. Это указывает на то, что полисахарид является разветвленным, основная цепь его построена из двух остатков галактозаминна, при этом к одному из них присоединен остаток терминальной иерсиниозы В. Масс-спектр сполна метилированной иерсиниозы В (рис. 2) был получен впервые.

Для определения места присоединения остатка иерсиниозы В ПС был обработан фтористым водородом при  $-70^\circ\text{C}$  в течение 1 ч; в результате получен полисахарид (ПС-1), который состоит из остатков галактозаминна. В метанолизате сполна метилированного ПС-1 был обнаружен 4,6-ди-*O*-метилгалактозамин. Таким образом, исходя из обобщенных данных ме-

Химические сдвиги в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах иерсиниозы В, ПС и ПС-1

Соединение	Остаток	Химические сдвиги, м. д., от ТМС							
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'
Иерсиниоза	Yer ( $\alpha$ )	92,4	65,9	30,0	77,6	71,9	18,0	67,8	13,9
	Yer ( $\beta$ )	99,4	68,9	35,4	77,1	75,4	17,8	71,7	14,1
ПС	-3GalNAc $\beta$ 1-	104,6	51,3	76,0	64,5	76,0	62,1		
	-3,4GalNAc $\alpha$ 1-	94,5	49,1	78,6	78,2	73,6	61,4		
	Yer $\alpha$ 1-	99,7	66,5	30,3	77,4	71,8	17,9	68,1	14,1
ПС-1	-3GalNAc $\beta$ 1-	104,1	52,6	76,7	65,3	76,4	62,8		
	-3GalNAc $\alpha$ 1-	95,3	49,7	79,0	70,3	72,7	62,8		

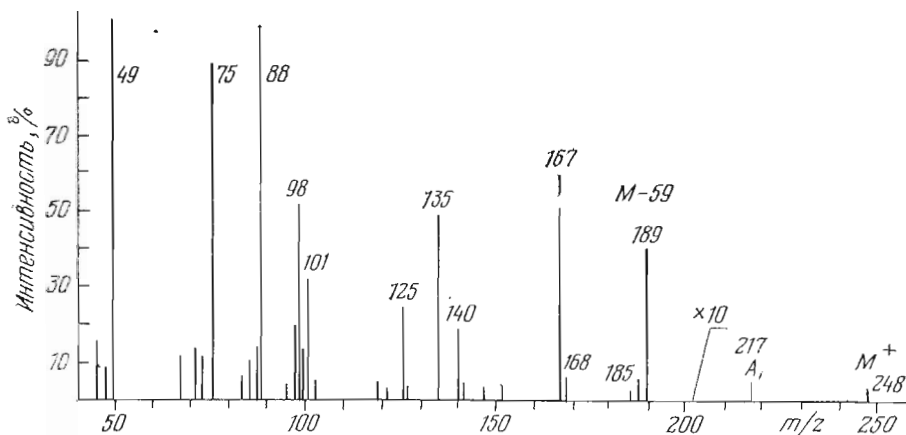


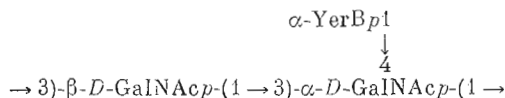
Рис. 2. Масс-спектр сполна метилированной иерсиниозы В

тирования, можно сделать вывод, что остаток иерсиниозы В присоединен к остатку галактозамина в положении С4.

В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре ПС-1 (таблица) в аномерной области наблюдаются два сигнала при 95,3 и 104,1 м. д. На основании конформационной зависимости химических сдвигов аномерных атомов углерода в олиго- и полисахаридах [7] можно сделать вывод, что один остаток галактозамина имеет  $\alpha$ -, а другой —  $\beta$ -конфигурацию. Это подтверждается положением сигналов атомов углерода, связанных с атомом азота (49,7 и 52,6 м. д.) [8]. Отнесение остальных сигналов было сделано исходя из величин  $\alpha$ - и  $\beta$ -эффектов гликозилирования в 1 $\rightarrow$ 3-связанных дисахаридных звеньях [7].

Полная структура повторяющегося звена была установлена при анализе  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра ПС.  $\alpha$ -Конфигурация иерсиниозы В следует из положения сигнала С3-атома углерода при 30,3 м. д. (таблица). В случае  $\beta$ -конфигурации сигнал дезоксиазона находился бы в более слабом поле. Смещение сигнала С4-атома  $\alpha$ -галактозамина в слабое поле на 8 м. д. в спектре ПС по сравнению со спектром ПС-1 (таблица) указывает на то, что именно остаток  $\alpha$ -галактозамина является точкой разветвления.

Таким образом, на основании данных метилирования, сольволиза,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии повторяющееся звено О-специфического полисахарида *Y. intermedia* О : 4,33 имеет следующую структуру:



Для выяснения конфигурации асимметрического центра 1-гидроксиэтильной группы и абсолютной конфигурации иерсиниозы В проводится встречный синтез всех ее стереоизомеров.

Авторы выражают глубокую благодарность д-ру хим. наук А. С. Шашкову (ИОХ АН СССР) за помощь при обсуждении результатов и съемку  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров полисахаридов.

### Экспериментальная часть

Нисходящую хроматографию выполняли на бумаге Filtrak FN-15 в системе *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3). Моносахариды обнаруживали щелочным раствором нитрата серебра. Гель-фильтрацию проводили на колонках (3,0 $\times$ 90; 2,5 $\times$ 75 см) с сефадексами G-100 и G-50 соответственно. ГЖХ выполняли на приборе Pye-Uniscam, серия 104, на колонке с 3% QF-1, газ-носитель — аргон, скорость 30 мл/мин. Масс-спектры снимали на приборе ЛКВ 9000s, используя стеклянные колонки (0,4 $\times$ 200 см), заполненные вышеуказанной фазой.

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры снимали на приборе WM-300 (Bruker) в  $\text{D}_2\text{O}$  при 40 $^\circ\text{C}$  с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола ( $\delta_{\text{с}}$  50,15 м. д.). Оптическое вращение определяли на приборе Perkin — Elmer, модель 141, при 20 $^\circ\text{C}$  в воде. Растворы упаривали в вакууме при 40 $^\circ\text{C}$  или лиофилизовали.

*Выделение О-специфического полисахарида. Микроорганизм Y. intermedia* О:4.33 (штамм 1476) получен из Международного центра по персиниям (Париж, проф. Mollet H. H.). Выращивание клеток проводили как описано ранее [9]. Высушенные

ацетоном клетки (30 г) экстрагировали 45% водным фенолом [3], водный слой отделяли, диализовали, упаривали до объема 250 мл и трижды ультрацентрифугировали при 105 000 g. Выход ЛПС составил 1%.

Раствор ЛПС (250 мг) в 30 мл воды нагревали с обратным холодильником на водяной бане (100° С, 4 ч), осадок липида удаляли центрифугированием, супернатант концентрировали до объема 10 мл и хроматографировали на сефадексе G-100. Выделяли три фракции: глюкан и ЛПС, O-специфический полисахарид (80 мг) и олигосахаридную фракцию (30 мг).

**Моносахаридный состав.** ПС и ПС-1 (по 6 мг) гидролизовали 1 М трифторуксусной кислотой (1 мл, 100° С, 2 ч), гидролизаты упаривали, 1/2 часть восстанавливали боргидридом натрия и ацетилировали. Вторую часть гидролизата дезаминировали как описано в работе [5]. Обе части анализировали ГЖХ.

Полисахарид (30 мг) гидролизовали 1 М трифторуксусной кислотой (3 мл, 100° С, 2 ч), гидролизат многократно упаривали с водой и подвергали препаративной бумажной хроматографии. В результате выделили иерсиниозу В (6 мг),  $[\alpha]_{578}^{20} +5,6^\circ$  (с 0,5, вода) и D-галактозамин (15 мг), который упариванием с 0,1 М HCl, а затем с водой превратили в хлоргидрат,  $[\alpha]_{578}^{20} +80^\circ$  (с 0,6, вода), ср. [10]:  $+91,5^\circ$  (вода).

**Метилирование полисахаридов** (по 5 мг) проводили иодистым метилом в присутствии метилсульфенилметанида натрия по методу Хакомори [6], избыток иодистого метила удаляли в токе азота, смесь разбавляли водой, диализовали против дистиллированной воды, лиофилизовали. Метилированные ПС и ПС-1 нагревали с 1 и. HCl в метаноле (100° С, 20 ч), гидролизаты упаривали, остатки ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине и исследовали методами ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии.

**Сольволиз фтористым водородом.** ПС (40 мг) высушивали над пятиокисью фосфора (70° С, 3 ч) в вакууме, помещали в герметичный тefлоновый сосуд, добавляли фтористый водород при охлаждении смесью твердой двуокиси углерода и ацетона [11]. Смесью перемешивали 1 ч при -70° С, выливали в охлажденную суспензию карбоната кальция (50 г) в 70 мл четыреххлористого углерода, нагревали при перемешивании до 20° С, центрифугировали, осадок промывали несколько раз водой, органический слой и водные экстракты упаривали. Полученные остатки объединяли, растворяли в небольшом объеме воды, центрифугировали, супернатант упаривали до 3 мл и хроматографировали на сефадексе G-50. Получили 20 мг ПС-1.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kapperud G., Bergan T., Lassen J. // Inter. J. Systematic Bacteriol. 1981. V. 31. № 4. P. 401-419.
2. Aleksic S., Bockemuhl J., Lange F. // Zbl. Bact. Hyg. 1986. A261. S. 299-310.
3. Westphal O., Jann K. // Meth. Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83-91.
4. Горшкова Р. П., Зубков В. А., Исаков В. В., Оводов Ю. С. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1146-1147.
5. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хм. 1974. № 10. С. 2335-2338.
6. Conrad H. E. // Meth. Carbohydr. Chem. 1972. V. 6. P. 361-364.
7. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. 173-185.
8. Деревицкая В. А., Шашкова А. С., Новинова О. С., Евстигнеев Ю. А. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 3. С. 410-421.
9. Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 3. P. 527-531.
10. Kuhn R., Bister W., Däfeldecker W. // Lieb. Ann. Chem. 1958. B. 617. S. 115-128.
11. Mort A. V., Lamport D. T. A. // Anal. Biochem. 1977. V. 82. № 2. P. 289-309.

Поступила в редакцию

12.II.1987

После доработки

7.V.1987

#### STRUCTURAL STUDIES OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *YERSINIA INTERMEDIA* O : 4,33 LIPOPOLYSACCHARIDE

ZUBKOV V. A., GORSHKOVA R. P., OVODOV Yu. S.

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Science Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

O-specific polysaccharide has been isolated on autohydrolysis of lipopolysaccharide from *Yersinia intermedia* O: 4,33 (strain 1476) and shown to consist of the yersinirose B-(3,6-dideoxy-4-C-(1-hydroxyethyl)-xylo-hexose) and 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose residues in a molar ratio of 1 : 2. Acid hydrolysis, methylation, solvolysis with anhydrous hydrogen fluoride, and <sup>13</sup>C-NMR studies indicate the polysaccharide to be composed of trisaccharide repeating units of the following structure:

