



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 13 \* №10\* 1987

УДК 577.114.5.088:579.842.14

## АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

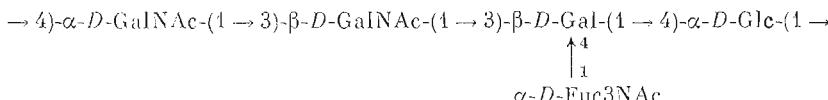
24\*. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ  
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SALMONELLA ARIZONAЕ* O63 (ARIZONA 08)

*Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Липкинд Г. М.,  
Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С.\*,  
Холодкова Е. В.\**

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

\* *Институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова Минздрава СССР, Москва*

В состав О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида *Salmonella arizonaе* O63 входит D-глюкоза, D-галактоза, N-ацетил-D-галактозамин и 3-ацетамидо-3,6-дидезокси-D-галактоза ( $\alpha$ -Fuc3NAc) в соотношении 1:1:2:1. На основании данных метилирования и расчета  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров полисахарида и продукта его избирательного расщепления безводным фтористым водородом — линейного полимера, не содержащего 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозы, установлено, что полисахарид имеет следующую структуру:

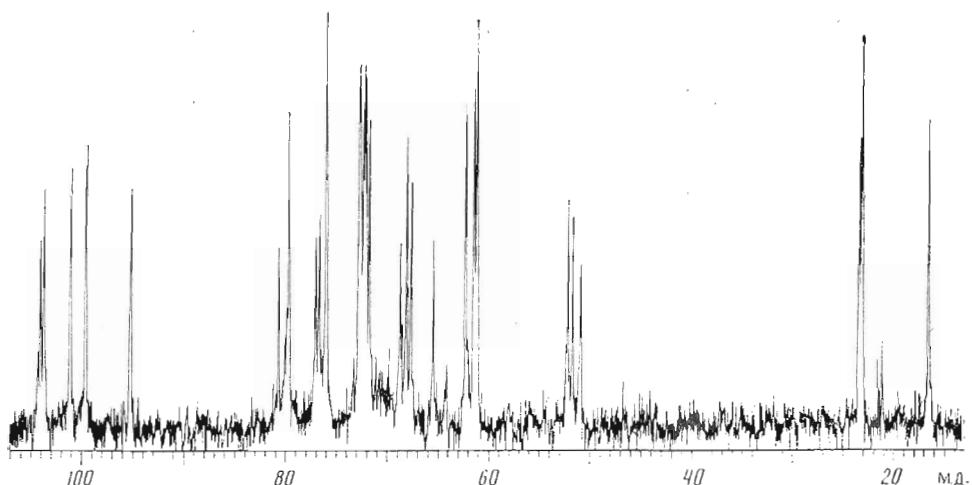


Бактерии *Salmonella arizonaе* (Arizona) являются возбудителями ряда желудочно-кишечных заболеваний. В ходе структурного исследования О-антителенов с целью создания химической основы для серологической классификации этого вида нами было установлено строение О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида *S. arizonaе* O59 (Arizona O19) [1]. В настоящем сообщении приведены данные по структурному анализу О-специфического полисахарида *S. arizonaе* O63 (Arizona 08).

Липополисахарид, выделенный из сухих бактериальных клеток экстракцией водным фенолом по методу [2], был расщеплен нагреванием с 1% уксусной кислотой, и из водорастворимой фракции гель-хроматографией на сепадексе G-50 был получен О-специфический полисахарид. Он имел оптическое вращение  $[\alpha]_D +125,0^\circ$  (с 0,4) и былнейтральным по данным электрофореза на бумаге. В гидролизате полисахарида с помощью аминокислотного и углеводного анализаторов сравнением с заведомыми образцами были идентифицированы галактозамин, 3-амино-3,6-дидезоксигалактоза, глюкоза и галактоза в соотношении  $\sim 2:1:1:1$ . 3-Аминосахар был дополнительно идентифицирован методами ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетата полиола и хроматографии на бумаге. Все моносахариды имеют D-конфигурацию, как это было установлено для глюкозы и галактозы окислением D-глюкозооксидазой и D-галактозооксидазой соответственно, а для аминосахаров — по удельному оптическому вращению их хлоргидратов, выделенных из гидролизата полисахарида с помощью ионообменной хроматографии на катионите.

В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида (рисунок) присутствовали сигналы пяти аномерных атомов углерода в области 95,3–104,1 м.д., трех атомов углерода, связанных с азотом, при 51,0–52,2 м.д., C6 одного 6-дезоксигалактоза при 16,6 м.д. и четырех остальных сахаров при 61,2–62,3 м.д., 20 вторичноспиртовых углеродных атомов в области 65,5–80,8 м.д. и трех

\* Сообщение 23 см. [1]. Сокращение: Fuc3NAc — 3-ацетамило-3,6-дидезоксигалактоза.



$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *S. arizonae* O63

ацетамидных групп при 23,2—23,4 м.д. ( $\text{CH}_3$ ) и 175,0—175,7 м.д. ( $\text{CO}$ ). Таким образом, данные спектра хорошо согласуются с результатами определения моносахаридного состава и показывают, что полисахарид является регулярным и построен из повторяющихся пентасахаридных звеньев, а также что все три аминосахара присутствуют в N-ацетилированной форме. Кроме того, в спектре присутствовали сигналы при 21,2—21,6 м.д., принадлежащие O-ацетильным группам, что подтверждалось их исчезновением из спектра после обработки полисахарида водным раствором триэтиламина. Интегральные интенсивности этих сигналов были незначительными (~0,1—0,2) от интенсивности сигнала одной N-ацетильной группы), и O-ацетильные группы в полисахариде локализованы не были.

Из снятого без подавления C,H-взаимодействий  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида были определены величины КССВ  $J_{\text{c},\text{H}}$  для всех аномерных атомов углерода (таблица). Три из них были относительно большими (169—171 Гц), а две другие несколько меньше (162,3 Гц). Следовательно, три моносахаридных остатка присоединены  $\alpha$ -гликозидными связями, а два другие —  $\beta$ -гликозидными [3].

Полисахарид был подвернут метилированию [4], и частично метилированные моносахариды, полученные при гидролизе метилированного полимера, анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов пептидов. В результате идентифицированы 2,3,6-три-O-метилглюкоза, 2,6-ди-O-метилгалактоза, 3,6-ди-O-метил- и 4,6-ди-O-метил-2-(N-метил)-ацетамидо-2-дезоксигалактоза, а также 2,4-ди-O-метил-3-(N-метил)-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактоза. Из этих данных следовало, что полисахарид является разветвленным, в узле разветвления находится остаток галактозы, замещенный в положения 3 и 4, остаток 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозы представляет собой терминальный сахар боковой цепи, остаток глюкозы и один из остатков N-ацетилгалактозамина замещены в положение 4, а второй остаток N-ацетилгалактозамина замещен в положение 3.

Для структурного анализа регулярных полисахаридов нами ранее успешно использовалась программа на ЭВМ, позволяющая рассчитывать их  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры, исходя из моносахаридного состава и средних значений эффектов гликозилирования, и находить структуру, для которой рассчитанный спектр наиболее близок экспериментальному  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектру [1, 5, 6]. Использованные в этих работах величины эффектов гликозилирования были определены при анализе данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР для дисахаридов и дисахаридных фрагментов олиго- и полисахаридов. Вследствие этого расчетный метод дает хорошие результаты в случае линейных полисахаридов, но не может быть применен с использованием тех же величин эффектов гликозилирования для анализа разветвленных полимеров, так как в этом случае для моносахаридного остатка, лежащего в узле разветвления,

Химические сдвиги ( $\delta$ , м. д.) в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах \*  
В скобках приведены КССВ  $^1J_{\text{СЛ.Н}}$  в Гц

Соединение, остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Полисахарид (I), А						
-4GalNAc $\alpha$ 1-	95,4	51,0	68,7	79,5	72,5	61,5
-3GalNAc $\beta$ 1-	104,0	52,1	76,5	65,3	76,0	62,2
-3Gal $\beta$ 1-	103,8	71,3	82,9	69,7	76,0	62,1
-4Glc $\alpha$ 1-	101,3	72,8	72,7	79,8	72,2	61,1
Полисахарид (I), Б						
-4GalNAc $\alpha$ 1-	95,5	51,0	68,5	79,2	72,4	61,7
-3GalNAc $\beta$ 1-	104,4	52,0	76,5	65,4	76,4	62,2
-3Gal $\beta$ 1-	104,0	71,0	83,2	69,7	76,3	62,2
-4Glc $\alpha$ 1-	101,3	72,7	72,6	79,9	71,9	61,1
Полисахарид (II), А						
-4GalNAc $\alpha$ 1-	95,3 (170,9)	51,0	68,8	79,2	72,4	61,5
-3GalNAc $\beta$ 1-	103,8 (162,3)	52,2	76,8	65,5	76,0	62,3
-3,4Gal $\beta$ 1-	104,1 (162,3)	72,2	80,7	77,1	76,0	61,2
-4Glc $\alpha$ 1-	101,3 (169,7)	72,8	72,8	79,8	72,3	61,2
Fuc3NAc $\alpha$ 1-	99,7 (170,9)	67,7	51,8	71,8	68,1	46,6
Fuc3NAc $\alpha$ 1-OMe [9]	100,3	67,2	52,6	71,6	67,6	46,5

\* Спектр экспериментальный (А) и рассчитанный (Б).

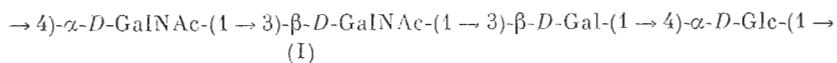
часто наблюдаются отклонения (иногда значительные, до 5 м.д. [7]) экспериментальных химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  от рассчитанных. Один из возможных путей включения расчетного метода в структурный анализ разветвленных полисахаридов может заключаться в отщеплении боковых цепей химическими методами, установлении строения образующегося при этом линейного полимера путем расчета  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров для всех возможных структур и затем реконструировании структуры исходного разветвленного полисахарида с помощью сравнительного анализа его  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра и спектра основной цепи.

Для отщепления боковых цепей в настоящей работе был использован сольволиз безводных фтористым водородом, так как известно, что гликозидные связи 6-дезоксисахаров расщепляются этим реагентом значительно легче, чем гликозидные связи гексоз и гексозаминов (например, [8]). Сольволиз полисахарида в относительно мягких условиях ( $-40^\circ\text{C}$ ) привел к полимерному продукту, выделенному гель-хроматографией. По данным кислотного гидролиза, в состав этого модифицированного полисахарида входят глюкоза, галактоза и галактозамины в соотношении  $\sim 1 : 1 : 2$ .  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр свидетельствовал, что полимер построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев (таблица). Следовательно, терминальный остаток 3-ацетамидо-3,6-ди-дезоксигалактозы был избирательно отщеплен при сольволизе фтористым водородом при сохранении гликозидных связей остальных моносахаридов.

Анализ модифицированного полисахарида методом метилирования [4] привел к идентификации 2,3,6-три-O-метилглюкозы, 2,4,6-три-O-метилглактозы, 3,6-ди-O-метил- и 4,6-ди-O-метил-2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксигалактозы. Следовательно, этот полимер линейный; остаток галактозы, лежащий в узле разветвления исходного полисахарида, замещен в основной цепи в положение 3, а боковая цепь присоединяется к нему, таким образом, в положение 4.

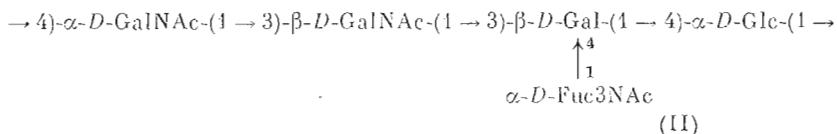
Для определения последовательности моносахаридных остатков и конфигурации гликозидных связей в модифицированном полисахариде был использован вышеупомянутый расчетный метод [5, 6]. С помощью ЭВМ были рассчитаны  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры всех возможных линейных полимеров данного моносахаридного состава (за исключением полисахаридов с 1,6-гликозидными связями, так как из  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра вытекало, что

замещенные в положение 6 моносахаридные остатки отсутствуют). В результате была найдена структура (I), для которой сумма квадратов отклонений химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  сигналов экспериментального и расчетного спектров друг от друга была минимальной (1,0). Типы замещения моносахаридных остатков в этой структуре полностью согласуются с результатами анализа метилированием. Расчет выявил еще три структуры с относительно небольшим суммарным квадратичным отклонением (5,5–6,1), однако ни одна из них не удовлетворяла данным метилирования. Для всех остальных структур величина суммарного квадратичного отклонения превышала 10.



Таким образом, расчет с помощью ЭВМ в сочетании с анализом методом метилирования позволил однозначно определить структуру модифицированного полисахарида. Сделанное в ходе расчета отнесение сигналов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре этого полисахарида, а также химические сдвиги  $^{13}\text{C}$ , рассчитанные для структуры (I), приведены в таблице.

В модифицированном полисахариде два моносахаридных остатка присоединены  $\alpha$ -гликозидными связями, два другие –  $\beta$ -гликозидными, а в исходном полисахариде три из пяти моносахаридных остатков присоединены  $\alpha$ -гликозидными связями (см. выше). Следовательно, гликозидная связь остатка 3-ацетамило-3,6-дизезоксигалактозы имеет  $\alpha$ -конфигурацию. Так как место присоединения этого моносахарида было определено при анализе методом метилирования, можно заключить, что полисахарид *S. arizonae* О63 имеет структуру (II):



На примере этого полисахарида нами была продемонстрирована возможность определения места присоединения боковой цепи к основной цепи путем анализа  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра. Созданная нами для этой цели программа для ЭВМ позволяет находить в основной цепи разветвленного полисахарида олигосахаридный (в данном случае трисахаридный) участок, не несущий боковой цепи, последовательно рассматривая варианты с замещением боковой цепью каждого из остатков основной цепи. Критерием отбора служит сумма квадратов отклонений химических сдвигов сигналов C2–C6 в рассчитанном спектре рассматриваемого олигосахарида (трисахарида) и в экспериментальном  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре разветвленного полисахарида после исключения из него сигналов терминального остатка 3-ацетамило-3,6-дизезоксигалактозы. В результате расчета было найдено, что в предположении о присоединении боковой цепи к остатку галактозы суммарное квадратичное отклонение для сигналов каждого из трех остальных моносахаридных остатков основной цепи не превышает 1, тогда как для трех других вариантов суммарное квадратичное отклонение сигналов хотя бы одного из монозамещенных остатков превышало 7.

При этом расчете были выделены сигналы  $^{13}\text{C}$  остатка галактозы, лежащего в узле разветвления полисахарида (таблица), анализ которых позволил сделать выбор между двумя оставшимися вариантами структуры (с замещением остатка галактозы в положения 2 и 3 или 3 и 4). Действительно, в предположении о замещении этого остатка в положения 3 и 4 сигнал при 72,7 м.д. принадлежит C2 остатка галактозы и отклоняется от положения сигнала этого атома в спектре линейного полисахарида (I) на +0,9 м.д., что вполне объяснимо появлениею дополнительного заместителя при C4. В случае же замещения остатка галактозы в положении 2 и 3 сигнал при 72,2 м.д. должен принадлежать атому C4 этого остатка, и отклонение его химического сдвига от сдвига соответствующего сигнала в спектре полимера (I) составляет уже 2,5 м.д., что выходит за рамки возмож-

ных величин дальних эффектов (в данном случае от гликозилирования по C2).

Таким образом, анализ спектра показал, что в узле разветвления лежит остаток галактозы, замещенный в положения 3 и 4, что согласуется со структурой (II). Хотя для изученного полисахарида этот вывод был легко сделан на основании данных метилирования, описанный здесь подход может оказаться полезным — например, в случае присутствия в основной цепи двух одинаково замещенных остатков одного и того же моносахарида, один из которых лежит в узле разветвления, или в случае недостаточно хорошего разделения частично метилированных моносахаридов при анализе ГЖХ.

### Экспериментальная часть

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $60^\circ\text{C}$  с использованием в качестве внутреннего стандарта ацетона ( $\delta_c$  31,45 м. д.). Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при  $20^\circ\text{C}$ . Хроматомасс-спектрометрия выполнена на приборе Varian Mat Gnom 111 на колонке с 3% OV-I на посилете Diatomite CQ (100–120 mesh), газ-носитель — гелий. Гель-хроматография, хроматография и электрофорез на бумаге и ионообменная хроматография аминосахаров выполнены как описано ранее [10]. Анализ с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов проведен как в работе [11].

Выращивание бактериальной структуры *S. arizonae* 63:z<sub>4</sub>, z<sub>32</sub>:— (Arizona 8:1,7,8:—, штамм 40009) проводилось как описано в работе [12]. Липополисахарид выделяли по методу [2] и расцепляли как в работе [11].

Кислотный гидролиз проводили 4 М соляной кислотой ( $100^\circ\text{C}$ , 3 ч); в аналитическом варианте гидролизат анализировали с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов, а также методами ГЖХ и хроматографии на бумаге; в preparativном варианте ионообменной хроматографией на катионите Chromex UA-8 ( $\text{H}^+$ -форма) в 0,33 М соляной кислоте выделяли хлоргидрат *D*-галактозамина ( $[\alpha]_D +71,2^\circ$  ( $c$  0,4); [13]:  $[\alpha]_D +82^\circ$  (вода)), и хлоргидрат 3-амино-3,6-дизекси-*D*-галактозы ( $[\alpha]_D +51,1^\circ$  ( $c$  0,2); [14]: для N-ацетильного производного  $[\alpha]_D +114^\circ$  (вода)). 3-Аминосахар был превращен, как обычно, в 1,2,4,5-тетра-О-ацетил-3-ацетамидо-3,6-дизексигалактит, масс-спектр которого совпадал с описанным в работе [9]. По времени удерживания при анализе ГЖХ он был неотличим от заведомого образца, полученного при гидролизе О-специфического полисахарида *Pseudomonas syringae*, патовар *syringae* 281 [15]. Ферментативное окисление глюкозы и галактозы в гидролизате полисахарида осуществляли согласно [10].

Метилирование полисахарида проводили по методу [4], продукт выделяли путем адсорбции в патроне Sep-Pak C18 (США) с последующим элюированием метанолом, как описано в работе [16], гидролизовали 2 М трифтормукусной кислотой ( $120^\circ\text{C}$ , 1 ч), частично метилированные моносахариды превращали в ацетаты полиолов согласно [17], гексозы идентифицировали по данным [18], аминосахара — с использованием данных [17].

Сульволиз полисахарида безводным фтористым водородом проводили при  $-40^\circ\text{C}$  в течение 40 мин (охлаждение смесью твердая углекислота — ацетон), продукты осаждали из реакционной смеси эфиром, как описано в работе [19], и разделяли гель-хроматографией на геле TSK HW 40.

Авторы благодарят д-ра Б. Лапи (Национальный институт гигиены, Будапешт) за предоставление бактериальной культуры и В. Н. Шибаева за плодотворное участие в обсуждении результатов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Липкинд Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Холодкова Е. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1275–1281.
2. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 325–332.
3. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. Р. 293–297.
4. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276–279.
5. Липкинд Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 833–840.
6. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1987. In press.
7. Lemieux R. U., Bock K., Delbaere L. T. J., Koto S., Rao V. S. // Can. J. Chem. 1980. V. 58. № 6. Р. 631–653.
8. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Wilkinson S. G., Tahara Y., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. № 3. Р. 659–669.
9. Lvov V. L., Tochlamysheva N. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Čapek K. // Carbohydr. Res. 1983. V. 112. № 2. Р. 233–239.

10. Виноградов Е. В., Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кошетков Н. К., Холодкова Е. В., Станиславский Е. С. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 660–669.
11. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 66. № 3. P. 559–566.
12. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kocharova N. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 106. № 3. P. 643–651.
13. Beil. B. 4 (4). S. 2719.
14. Ashwell G., Volk W. A. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. № 12. P. 4549–4555.
15. Zdrovenko G. M., Yakovleva L. M., Gubanova N. Y., Solyanic L. P., Zakharova I. Y., Gvozdyak R. I., Knirel Y. A., Dashunin V. M. // Abstr. Pap. 3rd Bratislava Symp. on Saccharides. Bratislava. 1986. P. 46–46a.
16. Waeghe T. J., Darvill A. G., McNeil M., Albersheim P. // Carbohydr. Res. 1983. V. 123. № 2. P. 281–304.
17. Stellner K., Saito H., Hakomori S.-I. // Arch. Biochem. and Biophys. 1973. V. 155. № 2. P. 464–472.
18. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren J. // Chem. Commununs Stockholm Univ. 1976. № 8. P. 1–75.
19. Mort A. J. // Carbohydr. Res. 1983. V. 122. № 2. P. 315–321.

Поступила в редакцию  
6.II.1987

**ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 24. THE STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *Salmonella arizonae* O63 (ARIZONA O8) LIPOPOLYSACCHARIDE**

VINOGRADOV E. V., KHIREL Yu. A., LIPKIND G. M.,  
SHASHKOV A. S., KOCHETKOV N. K., STANISLAVSKY E. S.\*,  
KOLODKOVA E. V.\*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; \*I. I. Mechnikov Institute of Vaccines and  
Sera, Health Ministry of the USSR, Moscow*

The O-specific polysaccharide chain of the *Salmonella arizonae* O63 lipopolysaccharide is composed of *D*-glucose, *D*-galactose, N-acetyl-*D*-galactosamine, and 3-acetamido-3,6-dideoxy-*D*-galactose (Fuc3NAc) residues in the ratio 1:1:2:1. On the basis of methylation analysis and calculations of  $^{13}\text{C}$ -NMR-spectra of the polysaccharide and of the product of its selective cleavage with anhydrous hydrogen fluoride, the linear polymer lacking 3-acetamido-3,6-dideoxygalactose, it was concluded that the polysaccharide has the following structure:

