



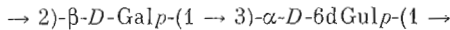
УДК 579.842.23 + 577.114.5.088 : 543.422.25

СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА
ИЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *YERSINIA ENTEROCOLITICA*
СЕРОВАРА O:6,31

Калмыкова Е. Н., Горшкова Р. П., Исаков В. В.,
Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии
ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток

Из липополисахарида *Yersinia enterocolitica* серовара O:6,31 выделен серологически активный О-специфический полисахарид. На основании данных метилирования, частичного гидролиза и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии предложена структура дисахаридного повторяющегося звена боковых цепей специфического полисахарида:



Микроорганизм *Yersinia enterocolitica* является возбудителем иерсиниоза у людей. Серологическая классификация этого вида бактерий подвергалась неоднократным пересмотрам [1], поэтому структурное исследование липополисахаридов необходимо для уточнения классификации данного микроорганизма.

Вартенберг и др. [2] показали, что в состав липополисахарида *Y. enterocolitica* серовара O:6,30 (штамм 102) входят остатки двух 6-дезоксигексоз (одна из которых предположительно 6-дезоксид-альтроза), глюкозы, галактозы, двух гептоз, глюкозамина, галактозамина и кетодезоксиоктоновой кислоты.

В настоящем исследовании приведены данные по структурному анализу О-специфического полисахарида *Y. enterocolitica* серовара O:6,31.

Из микроорганизма *Y. enterocolitica* серовара O:6,31 (штамм 1477) фенол-водной экстракцией [3] выделен серологически активный липополисахарид. В гидролизате липополисахарида хроматографией на бумаге и ГЖХ идентифицированы 6-дезоксигексоза, рамноза, глюкоза, галактоза, D-глицеро-D-манно-гептоза, L-глицеро-D-манно-гептоза, глюкозамин в соотношении 26 : 11 : 16 : 30 : 3 : 10 : 4 соответственно.

При мягком кислотном гидролизе липополисахарида с последующей гель-фильтрацией углеводного компонента на сефадексе G-50 выделен О-специфический полисахарид, состоящий из остатков 6-дезоксигексозы и галактозы в эквимольном соотношении. Незначительное содержание в полисахаридной фракции остатков рамнозы, глюкозы и гептоз связано с примесью олигосахарида «кора». D-Конфигурация остатков галактозы установлена на основании величины оптической активности препаративно выделенного моносахарида, $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$.

Выделенный полисахарид ингибирует реакцию пассивного гемолиза, что указывает на его серологическую активность.

Из гидролизата полисахарида препаративной бумажной хроматографией выделена смесь рамнозы и 6-дезоксигексозы. Попытки разделить эти моносахариды в различных системах растворителей не привели к успеху из-за близких значений их хроматографической подвижности. Однако при разделении смеси с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге в боратно-щелочном буфере обнаружен моносахарид с $E_{\text{Rha}} = 1,15$, $E_{\text{Glc}} = 0,65$, что, согласно литературным данным [4], характерно для 6-дезоксигулозы. Другая смесь, состоящая из 6-дезоксисахара и глицеральдегида, получена при деградации по Смиуту специфического

Сокращения: D-6dGul — D-6-дезоксигулоза.

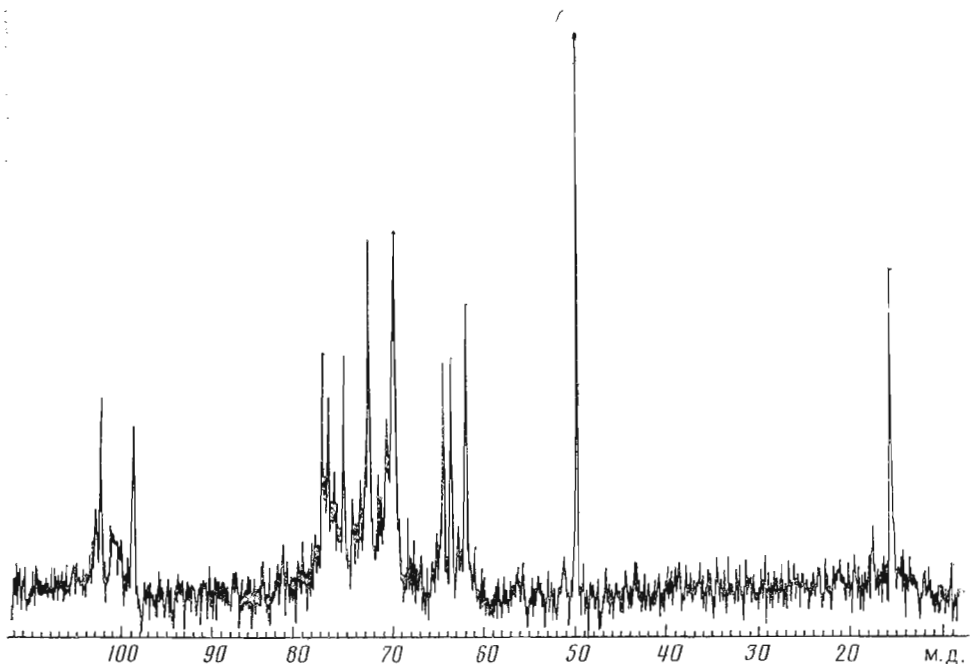
Отнесение сигналов атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР

Соединение	Химические сдвиги					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
β -D-Galp-OMe	102,1	68,4	71,8	72,4	70,0	15,5
α -D-Galp-OMe	100,3	65,1	71,8	72,4	62,6	15,3
α -D-Galp-OMe [9]	100,5	69,4	70,6	70,4	71,8	62,3
β -D-Galp-OMe [9]	104,9	71,8	73,9	69,8	76,2	62,1
\rightarrow 3)- α -D-6dGalp-(1 \rightarrow	98,8	64,4	77,1	69,8	63,5	15,3
\rightarrow 2)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	102,6	77,7	72,7	69,9	75,3	61,9

полисахарида О:6,31 (см. ниже). В данном случае выделить моносахарид в индивидуальном состоянии, используя хроматографию на бумаге и в тонком слое силикагеля, также не удалось из-за близких значений хроматографической подвижности компонентов в смеси: В ^1H -ЯМР-спектре этой смеси после предварительного ацетилирования методом двойного резонанса выделены сигналы протонов β -аномера ацетилированного моносахарида: Н1 (д, 5,99, $J_{1,2} = 8,5$ Гц); Н2 (дд, 5,11, $J_{2,3} = 3,5$ Гц); Н3 (дд, 5,41, $J_{3,4} = 1,5$ Гц); Н4 (дд, 4,88, $J_{4,5} = 2,25$ Гц); Н5 (дд, 4,20, $J_{5,6} = 6,5$ Гц); Н6 (д, 1,21, $J_{5,6} = 6,5$ Гц). Протоны при атоме С6 (3H) проявляются дублетом с КССВ 6,5 Гц, что свидетельствует о наличии 6-дезоксизвена в структуре моносахарида. Большое значение $J_{1,2}$ (8,5 Гц) указывает на экваториальную ориентацию гидроксильных групп при С1- и С2-атомах [5]. Величины $J_{2,3}$, $J_{3,4}$, $J_{4,5}$ (3,5; 1,5 и 2,25 Гц соответственно) указывают на аксиальное положение гидроксильных групп при С3- и С4-атомах. Сигналы ацетильных групп проявляются при 2,01; 2,13; 2,18 и 2,19 м.д. Таким образом, полученные данные позволяют утверждать, что исследованный моносахарид является тетраацетатом 6-дезоксигулозы.

Абсолютная конфигурация 6-дезоксигулозы была установлена путем анализа эффектов гликозилирования в ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида. Рассмотрение моделей Драйдинга дисахаридов β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-6dGalp и β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-6dGalp с учетом их преимущественной или среднестатистической конформации [6, 7] показывает, что они конформационно подобны дисахаридам β -D-Hexp-(1 \rightarrow 3)-D-Manp и β -D-Hexp-(1 \rightarrow 3)-L-Manp соответственно. Для построенных из двух пиранозных остатков 1,3-связанных дисахаридных фрагментов с манно-конфигурацией гликозилируемого моносахарида (агликона) и β -конфигурацией аномерного центра гликозилирующего моносахарида (гликона) α -эффект гликозилирования на С1 гликона равен 4—5 м.д., а β -эффект на соседнем с гликозилированным атоме С агликона, имеющем экваториальный протон (в данном случае С2), меньше 2,5 м.д. при одинаковой абсолютной конфигурации обеих пираноз. Напротив, при разной абсолютной конфигурации пираноз α -эффект на С1 гликона становится большим (7—8 м.д.), а β -эффект на С2 агликона уменьшается (< 2 м.д.). Учитывая, что в рассматриваемом полисахариде эффект от замещения остатка галактозы в положении 2 близок к 0 [8], α -эффект на С1 этого остатка составляет ~ 5 м.д., а β -эффект на несущем экваториальный протон С4 остатка 6-дезоксигулозы равен 2,6 м.д. (см. таблицу). Таким образом, 1,3-связанный дисахаридный фрагмент полисахарида имеет одинаковую абсолютную конфигурацию пираноз и, следовательно, 6-дезоксигулоза имеет D-конфигурацию.

Спектр ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида приведен на рисунке. В области аномерных атомов углерода наблюдаются два относительно интенсивных сигнала при 102,6 и 98,8 м.д., что указывает на дисахаридное повторяющееся звено полисахарида. Присутствие в аномерной области большого числа сигналов малой интенсивности обусловлено примесью олигосахаридов «кора». Для детального анализа спектра привлечены данные спектра ^{13}C -ЯМР α - и β -метилгликозидов 6-дезоксид-гулозы₁ (выделенной из липополисахарида *Y. enterocolitica* серовара О:7,8), а так-



Спектр ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида

же спектры метил- α - и β -*D*-галактозидов (таблица). Наличие в спектре полисахарида сигналов при 64,4 и 63,5 м. д., характерных для атомов С2 и С5 α -аномера 6-дезоксигулозы, указывает на α -конфигурацию гликозидной связи остатка 6-дезоксигулозы, а наблюдаемый сдвиг (0,7 м. д.) сигнала С2-атома в сильное поле относительно его значения в спектре моносахарида определяется β -эффектом гликозилирования по С3-атому [9]. Исходя из α -конфигурации остатка 6-дезоксигулозы, сигнал в области резонанса аномерных атомов углерода при 98,8 м.д. следует отнести к С1-атому 6-дезоксигулозы, а сигнал при 102,6 м.д. — к остатку галактозы. Такая величина химического сдвига С1-атома галактопиранозы характерна для β -*D*-галактопиранозы, гликозилированной по С2-атому. Данный вывод подтверждает анализ области 74—80 м.д., где резонируют углеродные атомы цикла, участвующие в образовании гликозидной связи. В этой области спектра наблюдаются три относительно интенсивных сигнала при 77,7; 77,1 и 75,3 м.д. Два из них относятся к С2-атому галактозного остатка и С3-атому 6-дезоксигулозы, а третий сигнал может относиться только к С5-атому β -*D*-галактопиранозного остатка. Исходя из конфигурации гликозидных связей и данных спектров моносахаридов, а также с учетом α - и β -эффектов гликозилирования [9] произведено отношение сигналов α -6-дезоксигулозы и β -*D*-галактозы (таблица).

Результаты ^{13}C -ЯМР-спектроскопии О-специфического полисахарида подтверждены данными ^1H -ЯМР-спектроскопии. В спектре ^1H -ЯМР обнаружены сигналы двух аномерных протонов при 5,09 (J 3,9 Гц); 4,37 (J 7,9 Гц) и дублет протонов метильной группы 1,02 м. д. (J 6,6 Гц). Протон Н5-атома 6-дезоксисахара образует мультиплет с центром при 4,47 м.д. Эти данные указывают на дисахаридное повторяющееся звено полисахарида, содержащее 6-дезоксигексозу, а также наличие α - и β -гликозидных связей у моносахаридов.

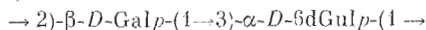
В гидролизате исчерпывающе метилированного липополисахарида и О-специфического полисахарида идентифицирован метил-2,4-ди-*O*-метил-6-дезоксигексопиранозид, не совпадающий с соответствующим образцом рамнозида [10], что указывает на включение остатков 6-дезоксигулозы в полисахаридную цепь 1,3-связью. Обнаруженный метил-3,4,6-три-*O*-метилгексопиранозид свидетельствует о том, что галактозные остатки находятся в пиранозной форме и связаны по второму положению. Кроме перечисленных метиловых эфиров в О-специфическом полисахариде

обнаружено незначительное количество метиловых эфиров моносахаридов «кора». В метилированном липополисахариде содержатся те же самые моносахариды, но с бóльшим количеством частично метилированных моносахаридов «кора».

О-Специфический полисахарид подвергали деградации по Смиуту. Исследование продуктов полного гидролиза деградированного полисахарида методом ГЖХ в виде ацетатов показало наличие 6-дезоксигулозы и глицерина. Полученные результаты указывает на то, что только остатки 6-дезоксигулозы связаны 1,3-связью, и это согласуется с результатами метилирования.

Для установления последовательности моносахаридных остатков полисахарид подвергали частичному гидролизу. Препаративной хроматографией на бумаге получена олигосахаридная фракция, имеющая $R_{Gal} = 0,92$, $[\alpha]_D^{20} + 4,4^\circ$, в гидролизате которой методом ГЖХ-масс-спектрометрии идентифицировали 6-дезоксигулозу и галактозу в эквимольном соотношении. Исследование ГЖХ-масс-спектрометрией исчерпывающе метилированной олигосахаридной фракции показало, что она представляет собой дисахарид, состоящий из остатков гексозы и 6-дезоксигексозы. На восстанавливаемом конце находится 6-дезоксигексоза, что подтверждается ионами abJ (m/z 249), aA_1 (m/z 219), bA_1 (m/z 189) [11].

Таким образом, на основании полученных данных установлена структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида *Y. enterocolitica* серовара О:6,31:



Экспериментальная часть

Нисходящую хроматографию выполняли на бумаге Filtrak FN-3, FN-5, восходящую препаративную хроматографию — на бумаге Whatman 3MM в системе растворителей: *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (А), *n*-бутанол — этанол — вода, 4 : 1 : 5 (В), толуол — *n*-бутанол — вода, 1 : 2 : 24 (С), изопропанол — этанол — вода, 4 : 1 : 4 (D). Высоковольтный электрофорез на бумаге выполняли в 0,05 М боратно-щелочном буфере (рН 10,4 при 25 В/см) 5 ч на бумаге Whatman 3MM и Filtrak FN-15. Нейтральные моносахариды обнаруживали щелочным раствором азотнокислого серебра, аминоксахара — 5% раствором нингидрина в ацетоне. Хроматографию в тонком слое проводили на стеклянных пластинках с силикагелем, импрегнированным 0,3 М гидрофосфатом натрия в системе этилацетат — изопропанол — метанол, 70 : 15 : 15 (Е). Моносахариды обнаруживали концентрированной серной кислотой при нагревании. Гель-хроматографию проводили в пиридин-ацетатном буфере (рН 4,5), используя колонку (65 × 1,8 см) с сефадексом G-50, фракции анализировали фенол-серным методом [12]. ГЖХ выполняли на хроматографе Pye-Uniscam-104 на колонках (150 × 0,4 см), содержащих: А) 3% QF-1 на Gas-chrom (100—120 меш); Б) 5% SF-30 на хроматоне (100—120 меш). Скорость аргона и водорода 60 мл/мин. На колонке А анализировали моносахариды в виде ацетатов полиолов при 175—225°С в программе температур 5°/мин, частично метилированные моносахариды — в виде ацетатов метилгликозидов при 115—225°С, 5°/мин. На колонке Б анализировали исчерпывающе метилированную олигосахаридную фракцию в интервале 220—300°С, 5°/мин. ГЖХ-масс-спектрометрию выполняли на приборе LKB-9000S при использовании колонок с указанными фазами. Спектр ¹H-ЯМР записывали на приборе Bruker WM-250 (250 МГц) в D₂O при 20°С, в качестве внутреннего стандарта использовали ацетон (2,08 м. д.). Спектр смеси ацетилированной 6-дезоксигулозы с глицеральдегидом снимали в CDCl₃. ¹³C-ЯМР-спектры записывали на приборе Bruker WM-250 (62,9 МГц) в D₂O при 60°С, химические сдвиги рассчитывали по соотношению $\delta_{TMS} = \delta_{MeOH} + 48,6$ м. д. ИК-спектры снимали на спектрофотометре UR-20 (Carl Zeiss, ГДР) в хлороформе. Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141, в воде.

Микроорганизм *Yersinia enterocolitica* серовара О:6,31 (штамм 1477), полученный из междунардного центра по иерсиниям (Наринж, проф. Н. Н. Mollaret), выращивали на синтетической среде, как описано в работе [13]. Липополисахариды выделяли по методу Вестфали [3]. Нуклеиновые кислоты удаляли ультрацентрифугированием в течение 3 ч при 105 000 *g*. Выход липополисахаридов от сухого ацетатного порошка бактерий 1%.

Полный гидролиз. Липополисахарид (10 мг) и полисахарид (5 мг) нагревали 3 ч с 0,5 М трифторуксусной кислотой при 100°С. Раствор упаривали, моносахариды идентифицировали методами хроматографии на бумаге в системе А и ГЖХ в виде ацетатов полиолов.

Уксуснокислотный гидролиз. Липополисахарид (500 мг) кипятили 1 ч с 1% уксусной кислотой (50 мл), осадок отделяли ультрацентрифугированием в течение 1 ч при 105 000 *g*, выход липида А и исходного липополисахарида 219 мг. Липофилизированную полисахаридную фракцию хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Выход О-специфического полисахарида 192 мг, $[\alpha]_D^{20} + 52,5^\circ$; олигосахарида «кора» — 20 мг.

Частичный гидролиз. Специфический полисахарид (200 мг) нагревали с 0,1 н. соляной кислотой (20 мл) 1 ч при 100° С, раствор упаривали с метанолом, растворяли в 1 мл воды и осаждали этанолом (5 мл). Этанольную фракцию (126 мг) делили двукратной восходящей хроматографией на бумаге в системе А; выделяли две зоны: I (32 мг, $R_{Gal} = 0,90$) и II (33 мг, $R_{Gal} = 0,96$). Нисходящей хроматографией на бумаге в системе А каждой зоны выделяли олигосахаридную фракцию (7,3 мг, $R_{Gal} = 0,92$, $[\alpha]_D^{20} + 4,7^\circ$) и индивидуальные моносахариды: *D*-галактозу (4 мг, $[\alpha]_D^{20} + 70^\circ$), *D*-глюкозу (2,1 мг, $[\alpha]_D^{20} + 12,4^\circ$) и смесь рамнозы с 6-дезоксигулозой (8 мг) в соотношении 1 : 1,7 соответственно ($[\alpha]_D^{20} - 12,5^\circ$). Смесь рамнозы с 6-дезоксигулозой исследовали ГЖХ-масс-спектрометрией в виде ацетатов полиолов, хроматографией на бумаге в системах А — D и высоковольтным электрофорезом на бумаге в боратно-щелочном буфере.

Метилирование. Липополисахарид и полисахарид (10 и 5 мг соответственно) и олигосахаридную фракцию метилировали подистым метилом в диметилсульфоксиде в присутствии метилсульфенилкарбоната [14]. Метилированные липополисахарид и полисахарид диализовали, олигосахаридную фракцию экстрагировали хлороформом. Полноту метилирования проверяли по отсутствию полос поглощения гидроксила (3600 см^{-1}) в ИК-спектрах. Исчерпывающе метилированную олигосахаридную фракцию исследовали ГЖХ-масс-спектрометрией на колонке Б. Метилированные липополисахарид и полисахарид нагревали 3 ч при 100° С с метанолизной смесью хлорная кислота — метанол (1 : 10), нейтрализовали дауэксом-1 (HCO_3^-), упаривали, ацетиловали уксусным ангидридом в пиридине и исследовали ГЖХ-масс-спектрометрией на колонке А.

Распад по Смуту. Специфический полисахарид (100 мг) растворяли в 0,5 М водном периоде натрия (10 мл) и выдерживали 48 ч в темноте при 20° С. Добавляли избыток боргидрида натрия и оставляли еще на 2 ч, остаток боргидрида натрия разрушали разбавленной уксусной кислотой (до pH 5—6) и диализовали полученную смесь 2 сут против часто сменяемой дистиллированной воды. Аликвоту полученного полиспирта подвергали полному гидролизу и исследовали ГЖХ-масс-спектрометрией. Остальное количество гидролизовали 98 ч 0,5 М соляной кислотой при 20° С, лиофилизовали и осаждали этанолом. Этанольный экстракт хроматографировали на бумаге в системе А. Выделяли фракцию с $R_{Rha} = 0,96$ (10,8 мг) ($[\alpha]_D^{20} + 12^\circ$), которую гидролизовали 0,5 М трифторуксусной кислотой, как описано выше, и исследовали хроматографией в тонком слое силикагеля и ^1H -ЯМР-спектроскопией в виде ацетатов.

Ингибирование непрямого (пассивного) гемолиза проводили, как описано ранее [15], используя эритроциты барана, сенсibilизированные липополисахаридом O:6,31, активированным обработкой 0,1 н. NaOH (5 мин, 90° С). Во всех экспериментах использовали вероналовый буфер (pH 6,95), содержащий бычий сывороточный альбумин. Инкубировали 30 мин при 37° С 0,2 мл ингибитора полисахарида O:6,31 (0,5—100 мкг), 0,2 мл вероналового буфера и 0,1 мл антисыворотки (в разведении 1 : 6400). К смеси добавляли комплемент (0,1 мл, сухая сыворотка морской свинок в разведении 1 : 20) и 0,25% суспензию эритроцитов барана (0,1 мл), инкубировали 30 мин при 37° С и центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин. Поглощение супернатанта определяли при 413 нм. 50%-ное ингибирование достигается при концентрации полисахарида 30 мкг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleksič S., Bockmühl J., Lange F. // Zbl. Bakt. Hyg. 1986. A 261. S. 299—310.
2. Wartenberg K., Lysy J., Knapp W. // Zbl. Bakt. Hyg. 1975. A 230. S. 361—366.
3. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. // Z. Naturf. 1952. B. 7B. № 1. S. 148—155.
4. Kaufmann H., Mühlradt P., Riechstein T. // Helv. chim. acta. 1976. V. 50. № 8. P. 2287—2298.
5. Altona C., Haasnoot C. A. G. // Org. Mag. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417—429.
6. Thøgersen H., Lemieux R. U., Bock K., Meyer B. // Can. J. Chem. 1982. V. 60. № 1. P. 44—57.
7. Backinowsky L. V., Balan N. F., Shashkov A. S., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1980. V. 84. P. 225—235.
8. Шапков А. С., Чижов О. С. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437—497.
9. Липкин Г. М., Шапков А. С., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 833—840.
10. Evtushenko E. V., Vakhrusheva N. M., Ovodov Yu. S. // J. Chromatogr. 1980. V. 196. P. 331—333.
11. Чижов О. С., Полякова Л. А., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1964. Т. 158. № 3. С. 685—688.
12. Dubois M., Gilles K. A., Rebers P. A., Gamilton J. K., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350—356.
13. Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 3. P. 527—531.
14. Nakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 1. P. 205—208.
15. Gorbach V. I., Krasikova I. N., Lukyanov P. A., Razmakhnina O. Yu., Solov'eva T. I., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 98. № 1. P. 83—86.

Поступила в редакцию
18.V.1987
После доработки
14.VIII.1987

STRUCTURAL STUDIES OF SIDE-CHAINS
OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM
LIPOPOLYSACCHARIDE OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA*,
SEROVAR O:6.31

KALMYKOVA E. N., GORSHKOVA R. P., ISAKOV V. V.,
OVODOV Yu. S.

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

The serologically active O-specific polysaccharide has been isolated from the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica*, serovar O: 6.31. Using methylation, partial acid hydrolysis and ^{13}C NMR spectroscopy, the main structural moiety of the O-specific polysaccharide is shown to be the following disaccharide repeating unit:

