



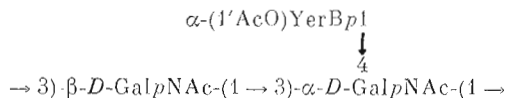
УДК 577.114.5:579.842.23

**СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *YERSINIA ENTEROCOLITICA*
СЕРОВАРА O : 4,32. СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ РОДСТВО
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *Y. ENTEROCOLITICA* O : 4,32
И *Y. INTERMEDIA* O : 4,33**

**Зубков В. А., Горшкова Р. П., Бурицева Т. И.,
Исаков В. В., Оводов Ю. С.**

*Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного отделения Академии наук СССР, Владивосток*

При мягком кислотном гидролизе липополисахарида *Yersinia enterocolitica* серовара O : 4,32 выделен O-специфический полисахарид, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих по два остатка 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы и остаток разветвленной октозы — 3,6-дидезокси-4-С-(1-гидроксиэтил)-*D*-ксило-гексозы (персинозы В), ацетилированной по С1'. На основании данных ¹³С-ЯМР-спектроскопии и результатов метилирования установлена структура повторяющегося звена полисахарида:



Выявлено структурное и серологическое родство липополисахаридов *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 и *Y. intermedia* серовара O : 4,33.

Yersinia enterocolitica является микроорганизмом с высокой степенью серологической гетерогенности и вызывает заболевание персинозом [1]. Персинозы в настоящее время распространены практически по всему миру и представляют серьезную угрозу для человечества. Для *Y. enterocolitica* не разработана четкая классификация, так как не имеется полных данных по структурному исследованию ее антигенов. Исследование соматических O-антигенов позволит создать единую классификационную систему на основе структур O-специфических полисахаридов, что необходимо для быстрой и однозначной диагностики данного заболевания.

Настоящее сообщение посвящено установлению строения O-специфического полисахарида *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 (штамм 96) и его серологического родства с ЛПС *Y. intermedia* серовара O : 4,33 (штамм 1476).

Из ацетонового поронка *Y. enterocolitica* O : 4,32 при экстракции горячим водным фенолом [2] с последующим трехкратным ультрацентрифугированием водной фазы для удаления нуклеиновых кислот выделен ЛПС с выходом 1%.

При слабом уксуснокислотном гидролизе ЛПС разрушается, липид А выпадает в осадок. Из надосадочного раствора при осаждении этанолом выделена полисахаридная фракция. В этанольном растворе методом хроматографии на бумаге были обнаружены 2-кето-3-дезоксидоктоповая кислота, 3,6-дидезокси-4-С-(1-гидроксиэтил)-*D*-ксило-гексоза (персиноза В), $R_{\text{Fна}} 1,18$, структура которой была доказана нами ранее [3], и моносахарид с хроматографической подвижностью, несколько большей, чем у персинозы В ($R_{\text{Fна}} 1,20$). Данный моносахарид выделен препаративной бумажной хроматографией и представляет собой персинозу В, O-ацетилированную при С1'. В ¹H-ЯМР-спектре моноацетата присутствует сигнал O-ацетильной группы при 2,16 м. д. и квартет от Н1' смежных по сравнительно

Сокращения: YcrB — персиноза В, 3,6-дидезокси-4-С-(1-гидроксиэтил)-*D*-ксило-гексоза, ЛПС — липополисахарид.

со спектром иерсиниозы В на 0,3 м. д. в слабое поле. Обработка моноацетата водным триэтиламиноом приводит к иерсиниозе В, что подтверждается ¹Н-ЯМР-спектроскопией, величиной удельного оптического вращения и хроматографической подвижностью.

Гель-фильтрацией на сефадексе G-50 получен О-специфический полисахарид, в гидролизате которого методом хроматографии на бумаге обнаружены иерсиниоза В в галактозаминах.

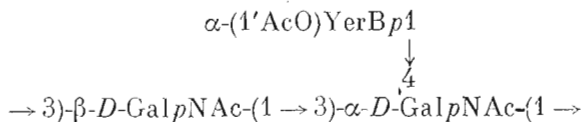
Для определения количественного соотношения моносахаридов проводили дезаминирование гидролизата О-специфического полисахарида, после чего ГЖХ в виде ацетатов полиолов идентифицированы 2,5-ангидроталоза и иерсиниоза В в соотношении 2 : 0,9. Нестехиометрическое количество иерсиниозы В объясняется, по-видимому, ее частичным отщеплением в ходе уксуснокислотного гидролиза ЛПС.

Для установления порядка связей между моносахаридными остатками полисахарид метилировали по Хакомори [4]. В результате анализа частично метилированных метилгликозидов методом хроматомасс-спектрометрии идентифицированы сполна метилированная иерсиниоза В, метил-2-дезоксид-4,6-ди-О-метил-2-(N-метил)ацетидагалактопиранозид и метил-2-дезоксид-6-О-метил-2-(N-метил)ацетидагалактопиранозид. Это указывает на то, что полисахарид является разветвленным, повторяющееся звено его основной цепи построено из двух 1,3-связанных остатков 2-ацетида-2-дезоксид-D-галактозы, при этом к одному из них в положение 4 присоединен остаток терминальной иерсиниозы В.

В спектре ¹³С-ЯМР О-специфического полисахарида наблюдаются сигналы двух метильных групп иерсиниозы В (С6 и С1') при 17,8 и 14,1 м. д. соответственно, О-ацетильной группы при 21,1 м. д., двух N-ацетильных групп при 22,2 и 22,9 м. д., С3-дезоксизвена иерсиниозы В (30,3 м. д.) и сигналы, соответствующие двум гидроксиметильным группам (61,4 и 62,2 м. д.) и трем апомерным атомам углерода (94,4; 99,7 и 104,7 м. д.). Общее количество сигналов в спектре 26, что соответствует трисахаридному повторяющемуся звену, содержащему остатки двух гексозампнов и тридезоксиктозы с одной О-ацетильной и двумя N-ацетильными группами.

При обработке О-специфического полисахарида водным триэтиламиноом был получен О-дезацетилированный полисахарид, ¹³С-ЯМР-спектр которого полностью совпал со спектром О-специфического полисахарида, выделенного из *Y. intermedia* серовара О : 4,33 [5].

Таким образом, на основании полученных данных установлена структура повторяющегося звена специфического полисахарида *Y. enterocolitica* серовара О : 4,32, которая отличается от структуры повторяющегося звена О-специфического полисахарида *Y. intermedia* серовара О : 4,33 только наличием О-ацетильной группы при С1' иерсиниозы В:



Для установления серологического родства ЛПС *Y. enterocolitica* О : 4,32 и *Y. intermedia* О : 4,33 использовали реакцию преципитации [6] и твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА) [7].

При двойной иммунодиффузии по Оухтерлони [6] ЛПС *Y. enterocolitica* О : 4,32 и *Y. intermedia* О : 4,33 реагировали с гомологичными и гетерологичными антисыворотками с образованием одной полосы преципитации. Наличие перекрестных реакций во всех случаях дает возможность сделать вывод о близкой серологической специфичности ЛПС исследуемых серологических вариантов. Для выяснения роли отдельных структурных компонентов исследуемых ЛПС в формировании иммунохимических детерминант и их ответственности за О-фактор использовали ингибирование ИФА фрагментами О-специфических полисахаридов ЛПС *Y. enterocolitica* О : 4,32 и *Y. intermedia* О : 4,33 в соответствующих тест-системах (рис. 1а, б).

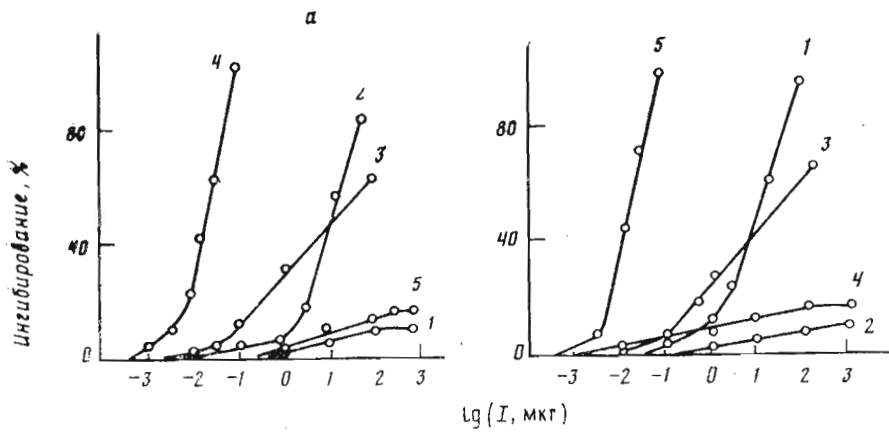


Рис. 1. Ингибирование в ИФА [7] реакции антисыворотки к *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 с ЛПС *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 (а) и реакции антисыворотки *Y. intermedia* серовара O : 4,33 с ЛПС *Y. intermedia* серовара O : 4,33 (б) метилгликозидом YерВ (1), 1'-O-ацетил-YерВ (2), модифицированным полисахаридом *Y. intermedia* O : 4,33, лишенным YерВ (3), O-специфическим полисахаридом *Y. enterocolitica* O : 4,32 (4) и *Y. intermedia* O : 4,33 (5)

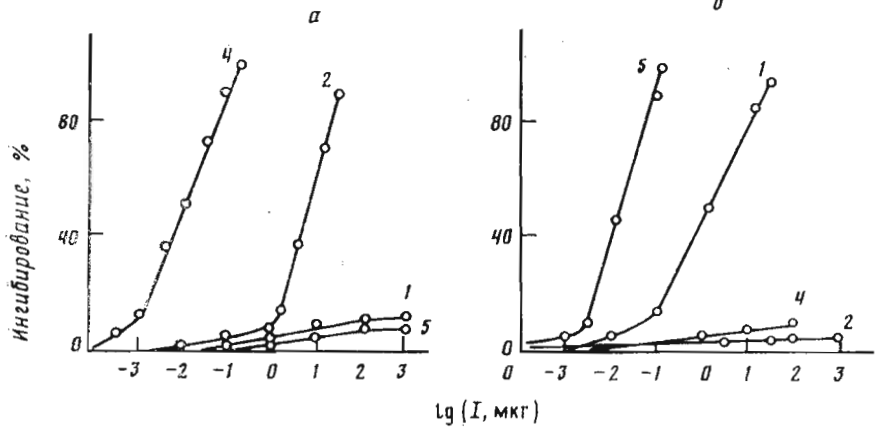


Рис. 2. Ингибирование в ИФА реакции истощенной антисыворотки (см. «Экспер. часть») *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 с ЛПС *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 (а) и реакции истощенной антисыворотки *Y. intermedia* серовара O : 4,33 с ЛПС *Y. intermedia* серовара O : 4,33 структурными компонентами O-специфических полисахаридов. Обозначение кривых абсцисс как на рис. 1. Кривая 3 совпадает с осью абсцисс

Исходя из структуры O-специфических полисахаридов исследуемых сероваров, мы предположили, что в состав их антигенных детерминант входят находящиеся в боковой цепи остатки иерсиниозы В, как ацетилированные (серовар O : 4,32), так и незамещенные (серовар O : 4,33). Необходимо было также установить иммунодоминантную роль основной цепи, общей для обоих полисахаридов. Для этого были получены метилгликозид иерсиниозы В, моноацетат иерсиниозы В и модифицированный полисахарид, полученный путем отщепления остатка иерсиниозы В при обработке O-специфического полисахарида *Y. intermedia* O : 4,33 безводной HF [5]. Применение этих фрагментов в качестве ингибиторов в ИФА (рис. 1) показало, что метилгликозид иерсиниозы В более активен в иммунной тест-системе серовара O : 4,33 (рис. 1б). В системе O : 4,32 его ингибирующая активность значительно падала (рис. 1а). Моноацетат иерсиниозы В в тест-системе серовара O : 4,33 был практически неактивен в отличие от его значительной ингибирующей активности (80%) в тест-системе серовара O : 4,32. Модифицированный полисахарид имел одинаковую ингибирующую активность в обеих системах (до 60%) (рис. 1а, б). Эти результаты свидетельствуют о том, что в формировании иммунохи-

мических детерминант ЛПС *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 принимают участие остаток ацетилированной персиниозы В и фрагмент основной цепи соответствующего полисахарида $\rightarrow 3)-\beta-D-GalpNAc-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-GalpNAc-(1\rightarrow$, а в формировании иммунохимических детерминант ЛПС серовара O : 4,33 — остаток персиниозы В и тот же фрагмент цепи, являющийся одинаковым для обоих ЛПС.

Для подтверждения этого предположения и выявления группировок, ответственных за O-фактор 32 в ЛПС *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 и O-фактор 33 ЛПС *Y. intermedia* серовара O : 4,33, были получены истощенные антисыворотки к вышеуказанным ЛПС (рис. 2), содержащие соответственно только аггитела к факторам 32 и 33. При их использовании в твердофазном ИФА с применением в качестве ингибиторов отдельных структурных компонентов (рис. 2) было показано, что за O-фактор 33 отвечает остаток персиниозы В в ЛПС *Y. intermedia* серовара O : 4,33 (ингибирующая активность 95% в истощенной тест-системе O : 4,33). Моноацетат персиниозы в данном случае практически неактивен (рис. 2б). O-фактор 32 у ЛПС *Y. enterocolitica* O : 4,32, вероятно, обусловлен наличием в составе полисахаридной цепи остатка 1'-O-ацетилиперсиниозы В (ингибирующая активность 90% в истощенной тест-системе O : 4,32). Метилгликозид персиниозы В в этом случае проявлял ингибирующую активность не более 10% (рис. 2а). Модифицированный полисахарид не проявлял ингибирующей активности в истощенной тест-системе, что дает возможность предположить принадлежность фрагмента $\rightarrow 3)-\beta-D-GalpNAc-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-GalpNAc-(1\rightarrow$ к O-фактору 4.

Таким образом, данные серологических исследований подтверждают результаты химических и физико-химических исследований O-специфических полисахаридов ЛПС *Y. enterocolitica* серовара O : 4,32 и *Y. intermedia* серовара O : 4,33 и однозначно доказывают их серологическое родство при значительном сходстве их структур.

Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную хроматографию выполняли на бумаге Filtrak FN-15 и Whatman 3-MM в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3). Моносахариды обнаруживали щелочным раствором азотнокислого серебра и кислым фталатом анилина.

ГЖХ выполняли на хроматографе Pye-Unicam-104 с пламенно-ионизационным детектором на стеклянных колонках (0,4×150 см), 3% QF-1 на Gas-Chrom Q (100—120 меш), скорость потока аргона 60 мл/мин. Ацетаты полиолов анализировали в интервале 175→225° С, ацетаты частично метилированных метилгликозидов — при 110→225° С (скорость 5°/мин).

Хроматомасс-спектрометрию осуществляли на приборе LKB-9000s при использовании колонок с вышеуказанной фазой. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer, ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектры записывали на приборе Bruker-Physik WM-250 в D₂O, в качестве внутреннего стандарта использовали метанол (δ_c 50,15 м.д.).

Выделение ЛПС, O-специфических полисахаридов осуществляли как описано ранее [3, 5].

Выделение персиниозы и моноацетата персиниозы. ЛПС (800 мг) гидролизovali 4 ч 1% уксусной кислотой при 100° С. Липид А удаляли центрифугированием (105 000 g, 1 ч), супернатант лиофилизovali, растворяли в воде (2 мл) и осаждали полисахарид этанолом. Этанольный раствор (30 мг) хроматографировали на бумаге, выделяли персиниозу В (6 мг), $[\alpha]_D^{20} +5,0^\circ$ (с 0,2, вода), и моноацетат персиниозы В (3 мг), $[\alpha]_D^{20} +8,0^\circ$ (с 0,1, вода).

Моносахаридный состав. Полисахарид (6 мг) гидролизovali 1 М трифторуксусной кислотой (1 мл, 100° С, 2 ч), гидролизат упаривали, дезаминировали [8] и анализировали ГЖХ.

Метилирование полисахарида проводили по методу [4]. Метилированный полисахарид выделяли адсорбцией в патроне Sep-Pak C18 (США) с последующим элюированием метанолом как описано в работе [9], затем

подвергали метаболизму 1 М НСl в метаполе (100° С, 16 ч), упаривали, ацетилировали и исследовали методом хроматомасс-спектрометрии.

О-Дезацетилирование О-специфического полисахарида. Полисахарид (100 мг) растворяли в 5 мл воды, добавляли 0,2 мл перегнанного триэтиламина, нагревали 40 мин при 60° С, упаривали, растворяли в 5 мл воды, обрабатывали 5 мл катионита КУ-2 (Н⁺-форма), встряхивая периодически в течение 15 мин, фильтрат лиофилизировали, получали 85 мг О-дезацетилированного полисахарида.

Серологические исследования. Антисыворотки к *Y. enterocolitica* серовара О : 4,32 и *Y. intermedia* серовара О : 4,33 получали по методике [10]. Реакцию преципитации проводили на пластинках с 1% агаром по Оухтерлонни [6]. Иммуноферментный анализ выполняли как описано в работе [7]. Истощенную антисыворотку *Y. enterocolitica* О : 4,32 получали путем адсорбции соответствующей исходной антисыворотки липополисахаридом *Y. intermedia* О : 4,33, истощенную антисыворотку *Y. intermedia* О : 4,32 — адсорбцией исходной антисыворотки липополисахаридом *Y. enterocolitica* О : 4,32. К 1 мл исходной антисыворотки добавляли избыточное количество (10 мг) липополисахарида указанного выше штамма. Смесь встряхивали, выдерживали 3 ч в термостате при 37° С, затем в течение ночи в холодильнике. Центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин. Полученные антисыворотки испытывали на наличие перекрестных реакций с исследуемыми липополисахаридами. В случае их отсутствия антисыворотки считались истощенными (лишенными О-фактора 4). Если перекрестные реакции имели место, процедуру истощения антисывороток повторяли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleksic S., Bockemuhl J. // J. Clin. Microbiol. 1984. V. 20. № 1. P. 99—102.
2. Westphal O., Jann K. // Meth. Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83—91.
3. Горшкова Р. П., Зубков В. А., Исаков В. В., Оводов Ю. С. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1146—1147.
4. Nakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.
5. Зубков В. А., Горшкова Р. П., Оводов Ю. С. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 65—68.
6. Ouchterlony O. // Acta pathol. et microbiol. scand. 1958. V. 25. P. 186—191.
7. Ruitenberg E. I., Streeberg P. A., Bros B. J. M., Buys J. // J. Immunol. Methods. 1976. V. 10. P. 67—83.
8. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 10. С. 380—384.
9. Mort A. J., Parker S., Kuo Mao Sung. // Anal. Biochem. 1983. V. 133. № 2. P. 380—384.
10. Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 3. P. 527—531.

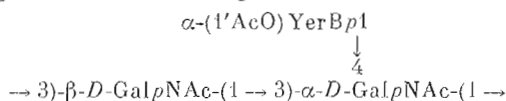
Поступила в редакцию
7.VII.1988

STRUCTURAL STUDIES OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE OF THE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O : 4,32 LIPOPOLYSACCHARIDE. SEROLOGICAL INTERRELATION BETWEEN O-ANTIGENS OF *Y. ENTEROCOLITICA* O : 4,32 AND *Y. INTERMEDIA* O : 4,33

ZUBKOV V. A., GORSHKOVA R. P., BURTSEVA T. I.,
ISAKOV V. V., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

O-Specific polysaccharide has been isolated on mild acid hydrolysis of the lipopolysaccharide from *Yersinia enterocolitica* O : 4,32 (strain 96) and shown to consist of yersiniose B (3,6-dideoxy-4-C-(1-hydroxyethyl)-D-xylo-hexose, YcrB) acetylated at C1' and 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose residues in a molar ratio 1 : 2. Acid hydrolysis, methylation and ¹³C NMR studies indicated the polysaccharide to be composed of trisaccharide repeating units of the following structure:



The data obtained revealed structural and serological interrelation between O antigens of *Y. enterocolitica* O : 4,32 and *Y. intermedia* O : 4,33.