



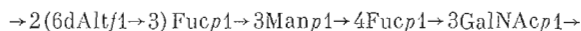
УДК 547.458.8.02:576.851.098

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА
YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS VB-СЕРОВАРА

Корчагина Н. И., Горикова Р. П., Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии
ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток

На основании результатов частичного гидролиза, распада по Смуту и данных метода метилирования предложена структура повторяющегося звена O-специфических боковых цепей липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* VB:



6dAlt и Fuc – L-, GalNAc и Man – D-конфигурации.

Предварительные данные о строении O-специфических полисахаридов в липополисахаридах *Y. pseudotuberculosis* серологических вариантов VA и VB приведены ранее [1]. В составе повторяющегося звена полисахарида VA обнаружена 3,6-дидезоксигексоза, идентифицированная как аскаррилоза, в полисахариде VB 3,6-дидезоксисахар не обнаружен.

Нами [2] при изучении липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VB-серовара того же штамма (R2) найдена 6-дезоксигексоза, которая выделена препаративной хроматографией на бумаге и по электрофоретической и хроматографическим подвижностям, согласно работе [3], идентифицирована как 6-дезокспальтроза.

При мягком кислотном гидролизе липополисахарида получен O-специфический полисахарид. Методом ГЛХ ацетатов полиолов и ацетатов метилгликозидов, полученных из гидролизата и метанолизата специфического полисахарида, показано, что в состав полисахарида входит по одному остатку 6-дезоксид-L-альтрозы, D-маннозы, D-галактозамина и два остатка L-фукозы. Моносахариды препаративно выделены хроматографией на бумаге из гидролизата специфического полисахарида и отнесены к D- и L-ряду по величинам удельного вращения. Наличие N-ацетильных групп (2,9%) в O-специфическом полисахариде указывает на то, что остаток галактозамина N-ацетилирован.

В метанолизате спирта метилированного полисахарида, полученного по методу Хакомори [4], с помощью хроматомасс-спектрометрии в виде ацетатов метилгликозидов были идентифицированы 2,3-ди-O- и 4-моно-O-метилфукоза (1:0,65), 2,4,6-три-O-метилманноза; 2-(N-метил)-4,6-ди-O-метилгалактозамин и незначительные количества 3,4-ди-O-метилфукозы [5–7]. Все моносахариды присутствуют в метанолизате в пиранозной форме.

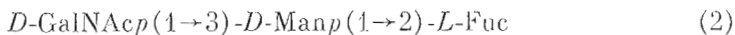
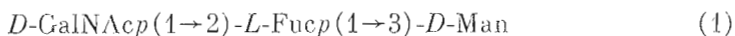
В метилированном липополисахариде после формолиза, гидролиза, восстановления и ацетилирования с помощью хроматомасс-спектрометрии наряду с ацетатами полиолов 2,3-ди-O-метил- и 4-моно-O-метилфукозы (1:0,98) и 2,4,6-три-O-метилманнозы нами обнаружена в виде ацетата полиола 2,3,5-три-O-метил-6-дезоксигексоза, идентифицированная согласно [8], т. е. моносахарид, занимающий терминальное положение и находящийся в фуранозной форме. Лабильность связи терминального моносахарида с основной углеводной цепью приводит к частичному его отщеплению при получении специфического полисахарида. Вследствие этого в метилированном полисахариде обнаружены незначительные количества 3,4-ди-O-метилфукозы и местом присоединения 6-дезоксигексозы принято положение C3 1,2-связанного остатка фукозы.

Хроматографией на бумаге показано, что при мягком кислотном гидролизе липополисахарида легко отщепляется 6-дезоксид-*L*-альтроза, что подтверждает ее терминальный характер.

Сполна метилированный 6-дезоксид-*L*-альтродфуранозид в связи с его высокой летучестью и уменьшением содержания 6-дезоксид-*L*-альтродзы в полисахариде (по сравнению с липополисахаридом) в метанолизате метилированного полисахарида не обнаружен.

Из полученных данных следует, что в углеводную цепь *O*-специфического полисахарида остатки *D*-маннозы и *D*-галактозамина включены 1,3-связью, а остатки *L*-фукозы — 1,4- и 1,2-связями, причем остатки последнего типа находятся в разветвлении и к ним в положении C3 присоединены гликозидной связью остатки 6-дезоксид-*L*-альтродзы в фуранозной форме.

При деградации полисахарида по Смити образуется трисахарид, который был выделен с помощью гель-хроматографии на сефадексе G-15. Хроматографией на бумаге гидролизата трисахарида и ГЖХ ацетатов полиолов этого гидролизата показано, что в состав трисахарида входят остатки *L*-фукозы, *D*-маннозы и *D*-галактозамина. В метанолизате метилированного трисахарида хроматомасс-спектрометрией обнаружен метил-2-дезоксид-2-(*N*-метил)ацетамидо-3,4,6-три-*O*-метилгалактопиранозид, идентифицированный согласно работе [9], и в виде ацетатов метилгликозидов — 3,4-ди-*O*-метилфукоза и 2,4,6-три-*O*-метилманноза. Следовательно, возможны следующие альтернативные структуры трисахарида:



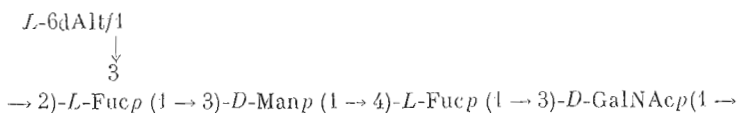
Для того чтобы выбрать из двух возможных структур, был осуществлен мягкий кислотный гидролиз полисахарида и с помощью препаративной хроматографии на бумаге был выделен дисахарид. Исследованием гидролизата последнего хроматографией на бумаге и ГЖХ ацетатов полиолов показано, что в состав дисахарида входят остатки *D*-маннозы и *L*-фукозы. Для определения восстанавливающего конца дисахарид был восстановлен, подвергнут гидролизу и затем ацетилирован, в результате хроматомасс-спектрометрией обнаружены ацетаты маннозы и фуцита. Следовательно, на восстанавливающем конце дисахарида находится остаток фукозы, что подтверждено наличием в масс-спектре сполна метилированного дисахарида пика с m/z 249.

В метанолизате метилированного дисахарида с помощью хроматомасс-спектрометрии соответствующих ацетатов метилгликозидов [10] идентифицированы 2,3,4,6-тетра-*O*-метилманноза и 2,3-ди-*O*-метилфукоза, оба моносахарида обнаружены в пиранозной форме. Таким образом, дисахаридный фрагмент *O*-специфического полисахарида имеет следующую структуру: *D*-Man $\rho(1\rightarrow 4)$ -*L*-Fuc.

Из приведенных данных по дисахариду и соотношения между моносахаридными остатками в полисахариде следует, что трисахарид, полученный деградацией специфического полисахарида по Смити имеет структуру (1). По остатку 1,4-связанной фукозы, заключенной между остатком аминосахара и остатком маннозы, протекает распад по Смити углеводной цепи полисахарида.

Восстановлением трисахарида, последующим метанолизом, ацетилированием и хроматомасс-спектрометрическим изучением продуктов для него подтверждена структура (1) (обнаружены ацетаты маннита и метилгликозидов фукозы и галактозамина).

Суммируя полученные данные, можно утверждать, что повторяющееся звено *O*-специфического полисахарида липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VB-серовара имеет следующую структуру



Данные о конфигурации гликозидных связей будут опубликованы в следующем нашем сообщении.

Экспериментальная часть

Полный гидролиз полисахарида и олигосахаридов проводили 1 н. H_2SO_4 при $100^\circ C$ в течение 3 ч. Аналитическую и препаративную хроматографию выполняли на бумаге FN-3 в системе *n*-бутанол — пиридин — вода (6:4:3), обнаружение моносахаридов осуществляли щелочным раствором нитрата серебра. 6-Дезоксиальтросу и кетодезоксиоктоновую кислоту идентифицировали хроматографией на бумаге Whatman № 1 в системе толуол — *n*-бутанол (1:2), насыщенной водой, электрофорезом на бумаге (боратный буфер, pH 10,4) и хроматографией в тонком слое силикагеля LSL₂₅₄ 5/40 (Чехословакия) в системе этилацетат — изопропанол — метанол (70:15:15). Гель-хроматографию проводили на колонках с сефадексом G-15 и G-50 в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (10 мл уксусной кислоты и 4 мл пиридина на 1 л воды), ГЖХ — на хроматографе Pye-Uniscam 104, на колонке, содержащей 3% QF-1 на Gas Chrom Q (100—120 меш), хроматомасс-спектрометрию — на приборе LKB-9000S (Швеция) на аналогичной колонке. Ацетаты частично метилированных метилгликозидов и полиолов изучали с помощью ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии в программе температуры от 115 до $225^\circ C$ (скорость повышения температуры — $5^\circ C/мин$), метилированных дисахарид — при $230^\circ C$. N-Ацетильные группы в полисахариде обнаруживали методом [11]. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin-Elmer-141.

Получение O-специфического полисахарида. Липополисахарид (600 мг), полученный как описано в работе [2], гидролизовали 1% уксусной кислотой (60 мл, 3 ч). Выпавший в осадок липид удаляли центрифугированием, супернатант лиофилизировали, затем растворяли в 2 мл воды и осаждали полисахаридную фракцию этанолом. В этанольном растворе хроматографией на бумаге обнаруживали кетодезоксиоктоновую кислоту и 6-дезоксид-*L*-альтросу, которую выделяли препаративно, $[\alpha]_{578}^{20} -20$ (с 0,5, вода). Осадок (280 мг) лиофилизировали и фракционировали на сефадексе G-50. Гель-фильтрацией получены O-специфический полисахарид (68 мг) и олигосахаридная фракция (191 мг), которую дальше не изучали.

Частичный гидролиз. O-Специфический полисахарид (35 мг) нагревали 25 мин с 3 мл 0,5 М H_2SO_4 при $100^\circ C$. Реакционную смесь нейтрализовали карбонатом бария и раствор деионизировали смолой КУ-2 (в H^+ -форме); 3-кратной препаративной хроматографией на бумаге выделяли дисахарид, выход 1,9 мг, R_{Gai} 0,87, $[\alpha]_{578}^{20} +2$ (с 0,19, вода).

Распад по Смигу. O-Специфический полисахарид (15 мг) окисляли 48 ч 1,5 мл 0,1 М раствора метапериодата натрия в темноте при $20^\circ C$, к раствору добавляли боргидрид натрия (70 мг), через 2 ч избыток боргидрида разрушали уксусной кислотой, раствор диализовали. Лиофилизированный продукт гидролизовали 2 мл 0,5 М HCl в течение 96 ч при $20^\circ C$ и олигосахарид выделяли гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-15. В результате получали 1,3 мг трисахарид.

Метилирование O-специфического полисахарида (7 мг), липополисахарида (10 мг) и олигосахаридов проводили иодистым метилом в диметилсульфоксиде в присутствии метилсульфинилкарбаниона [4]. Метилированные полимеры очищали диализом, олигосахариды экстрагировали хлороформом. Метанолиз проводили 2% раствором HCl в метаноле (8 ч, $100^\circ C$), формолиз — 90% муравьиной кислотой (3 ч, $100^\circ C$), последующий гидролиз — 0,3 М HCl (15 ч, $100^\circ C$). Ацетилирование осуществляли уксусным ангидридом в пиридине ($100^\circ C$, 30 мин).

ЛИТЕРАТУРА

1. Samuelsson K., Lindberg B., Brubaker R. J. *Bacteriol.*, 1974, v. 117, № 8, p. 1010—1016.
2. Gorshkova R. P., Korchagina N. I., Medonova T. A., Kalmykova E. N., Besednova N. N., Ovodov Yu. S. *Carbohydr. Res.*, 1980, v. 84, № 2, p. 237—243.

3. Kaufmann H., Muhlradt P., Reichstein T. *Helv. chem. acta*, 1967, v. 50, p. 2287-2298.
4. Nakomori S. J. *Biochem.*, 1964, v. 55, № 1, p. 205-208.
5. Елькин Ю. Н., Розынов В. В., Калиновский А. И., Вакорина Т. И., Шульга Н. И., Дзизенко А. К. *Химия природн. соедин.*, 1973, с. 457-459.
6. Елькин Ю. Н., Калиновский А. И., Розынов В. В., Вакорина Т. И., Шульга Н. И., Дзизенко А. К. *Химия природн. соедин.*, 1974, с. 451-454.
7. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 66, № 2, p. 559-566.
8. Bjorndal H., Lindberg B., Svensson S. *Carbohydr. Res.*, 1967, v. 5, № 2, p. 433-440.
9. Stoffin A., Stoffin P., Orr J. C. *Carbohydr. Res.*, 1972, v. 23, № 1, p. 251-260.
10. Kochetkov N. K., Chizhov O. S. *Tetrahedron*, 1965, v. 21, № 11, p. 2029-2047.
11. Trutnovsky H., Sacla A. B., Taleb S. A. *Microchem. J.*, 1975, v. 20, № 3, p. 415-420.

Поступила в редакцию
16.II.1982
После доработки
12.IV.1982

**STUDIES ON O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM
YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS VB SEROVAR**

KORCHAGINA N. I., GORSHKOVA R. P., OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Center,
Academy of Sciences of the USSR, Vlad'vostok*

Using methylation, partial hydrolysis, and Smith degradation, the structure of the repeating unit of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis* VB serovar (strain R2) has been elucidated:

