



УДК 547.114.5 : 543.422.23 : 579.842.23

СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА
YERSINIA INTERMEDIA ШТАММА 680

Горшкова Р. П., Ковальчук С. В., Исаков В. В.,
Фролова Г. М., Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток

Получен и охарактеризован О-специфический полисахарид из липополисахарида *Yersinia intermedia* штамма 680, выделенного от больного. Показано, что специфический полисахарид представляет собой фруктан. Серологическая активность липополисахарида и фруктана исследована в реакциях преципитации и ингибирования пассивного гемоллиза. На основании данных метилирования, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и иммунохимических исследований предложена структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида.

В настоящее время пристальное внимание исследователей привлекает нерсиниоз — новое инфекционное заболевание со сложной клинической картиной. Практически за десятилетие болезнь распространилась по всем странам и стала представлять серьезную опасность для человечества [1]. Нерсиниоз вызывает микроорганизм *Yersinia enterocolitica*, разделенный на 34 серологических варианта (серовара), из которых в последние годы [2] по биохимическим характеристикам и ДНК — ДНК-гибридизации выделены еще три вида нерсиний: *Yersinia kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*. Для новых видов до настоящего времени не разработана классификация, в литературе отсутствуют данные по структурному исследованию антигенов, случаи заболевания для них редки и практически не описаны.

Настоящая работа посвящена выяснению химического строения и серологической активности О-специфического полисахарида, полученного из липополисахарида *Y. intermedia* штамма 680, выделенного во Владивостоке от больного нерсиниозом в тяжелой форме.

Выделение липополисахарида из микробной массы проводили экстракцией по Вестфалю. Нуклеиновые кислоты отделяли трехкратным ультрацентрифугированием. Выход липополисахарида 2,3%.

При гидролизе липополисахарида 1% уксусной кислотой липид А (выход 50%) выпадает в осадок, из надосадочного раствора при осаждении спиртом получена полисахаридная фракция (20%) и этанольный экстракт (30%). Полисахаридная фракция при гель-фильтрации на сефадексе G-50 разделяется на два основных компонента: высокомолекулярный глюкан (10%) и выходящую далеко за свободным объемом колонки фракцию (80%), в которой идентифицированы характерные для кора липополисахаридов нерсинии [3] остатки глюкозы, галактозы, 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы, *L*-глицеро-*D*-манногептозы, *D*-глицеро-*D*-манногептозы. Из этанольного экстракта препаративной хроматографией на бумаге выделены фруктоза, О-ацетильное производное фруктозы, 2-кетид-3-дезоксидоктоновая кислота (KDO) и ее фосфат. Фруктоза и ее О-ацетильное производное при восстановлении NaBH_4 и ацетилировании дают одну и ту же смесь гексаацетатов сорбита и маннита (1,2 : 1, по данным ГЖХ). Моносахариды были охарактеризованы методами ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и хроматомасс-спектрометрии.

Из-за высокой лабильности специфического полисахарида его не удалось выделить при гидролизе липополисахарида. Оптимальным оказался

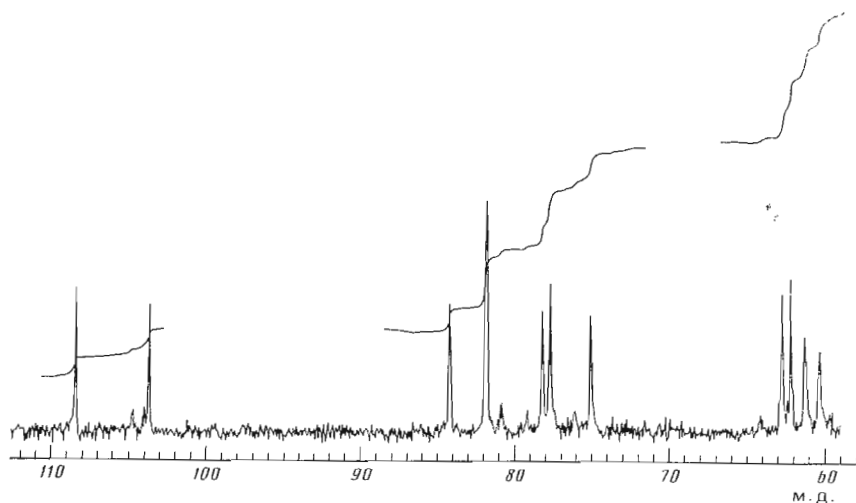


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР фруктана из липополисахарида *Y. intermedia* 680

автогидролиз липополисахарида при нагревании его водного раствора на кипящей водяной бане в течение 4 ч. В результате гель-фильтрации углеводной фракции на сефадексе G-50 получены глюкан, O-специфический полисахарид и олигосахарид кора. В гидролизате специфического полисахарида идентифицирован единственный моносахарид фруктоза.

Фруктан метилировали по Хакомори [4]. Полностью метилированный фруктан подвергали формолизу с последующим гидролизом, восстановлением и ацетилированием [5]. Полученные частично метилированные ацетаты полиолов идентифицировали хроматомасс-спектрометрией с использованием литературных данных [6]. Наличие двух пиков 1,2,5-три-O-ацетил-3,4,6-три-O-метилгекситов указывает на $2 \rightarrow 1$ -связь между фруктозными остатками.

В спектре ^{13}C -ЯМР (рис. 1) фруктана в области резонанса аномерных C-атомов наблюдаются два сигнала при 103,8 и 108,5 м. д., а в области резонанса кольцевых C-атомов присутствуют сигналы при 75,1; 77,8; 78,2; 81,8 (двойной интегральной интенсивности) и 84,2 м. д. В области резонанса оксиметильных групп наблюдаются четыре сигнала при 60,3; 61,3; 62,2; 62,7 м. д. Общее количество сигналов в спектре равно 12. Сопоставление величин химических сдвигов в области резонанса аномерных C-атомов в спектре ^{13}C -ЯМР фруктана с данными спектров ^{13}C для α , β -фруктопиранозы, α , β -фруктофуранозы и α - и β -метилфруктофуранозидов (табл. 1) показывает близкое положение сигналов метилфруктофуранозидов и фруктана. Это позволяет сделать вывод, что исследуемый полисахарид имеет дисахаридное повторяющееся звено, в котором оба остатка фруктозы находятся в фуранозной форме. Детальный анализ спектра ^{13}C -ЯМР полисахарида с привлечением данных для α , β -фруктофураноз и α - и β -метилфруктофуранозидов, а также данных по исследованию фруктанов (табл. 1 и 2) показывает, что сигнал при 75,1 м. д. характерен для C4-атома β -фруктофуранозы, а сигналы при 77,8 и 78,2 м. д. относятся к C3 β -фруктофуранозы и C4 α -фруктофуранозы соответственно. Сигнал при 81,8 м. д. (двойной интегральной интенсивности) соответствует C5-атомам α , β -фруктофураноз, а сигнал 84,2 м. д. принадлежит C3-атому α -фруктофуранозы.

В линейных полисахаридах ацетильные группы имеют особое значение и часто определяют серологическую специфичность микроорганизмов. Для определения положения ацетильной группы во фруктане проводили сравнительный анализ спектров ^{13}C -ЯМР полисахарида (AcO 6,70%), липополисахарида (Ac 6,69%) и дезацетилированного липополисахарида (Ac 3,08%). Количество O-ацетильных групп во фруктане, а также O- и N-ацетильных групп в липополисахаридах определяли по методу [11].

Химические сдвиги (δ) ^{13}C -ЯМР в спектрах фруктозы и некоторых олигосахаридов

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Литература
α -D-Fruf	63,2	99,0	71,8	72,1	66,2	62,2	[7]
β -D-Fruf	64,7	99,1	38,4	70,5	70,0	64,1	[8]
α -D-Fruf	63,8	105,5	82,9	77,0	82,2	61,9	[8]
β -D-Fruf	63,6	102,6	76,4	75,4	81,6	63,2	[8]
α -D-Fruf-OMe	59,1 *	109,0	84,0	78,2	81,1	62,2 *	[5]
β -D-Fruf-OMe	60,9 *	104,7	78,0	76,1	82,1	63,6 *	[5]
β -Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -Fruf	61,0	104,3	77,2	75,0	81,9	62,7	[9]
β -Fruf	64,2	100,0	68,8	70,2	69,8	64,5	
β -Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -Fruf	61,7	104,5	77,9	75,7	82,4	63,4	[9]
α -Glc-(1 \rightarrow 6)- α -Fruf	62,2	104,9	77,9	75,7	82,4	63,5	
α -Glc-(1 \rightarrow 6)- α -Fruf	99,7	72,6	74,2	70,8	73,1	61,8	[9]
α -Glc-(1 \rightarrow 6)- β -Fruf	63,9	105,9	82,9	77,3	81,2	68,0	[9]
α -Glc-(1 \rightarrow 6)- β -Fruf	99,4	72,6	74,2	70,8	73,1	61,8	[9]
β -Fruf	63,9	102,9	76,5	75,8	80,1	69,0	[9]

* C1 \rightleftharpoons C6.

Таблица 2

Химические сдвиги (δ) ^{13}C -ЯМР в спектрах D-фруктанов I, II и фруктана III, полученного из *Y. intermedia* штамма 680 *

Фруктан	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Литература
I	\rightarrow 1)- β -Fruf-(2 \rightarrow	62,2	104,5	78,5	76,6	82,4	63,4	[10]
II	\rightarrow 6)- β -Fruf-(2 \rightarrow	61,3	105,4	77,6	76,5	81,5	64,6	[10]
III	\rightarrow 1)- β -Fruf-(2 \rightarrow	60,3	108,5	84,2	78,2	81,8	62,2	
		(60,8)	(107,0)	(82,8)	(77,5)	(81,5)	(61,7)	
	\rightarrow 1)- β -Fruf-(2 \rightarrow	61,3	103,8	77,8	75,1	81,8	62,7	
		(61,7)	(103,0)	(76,3)	(74,8)	(81,8)	(61,7)	

* В скобках указаны химические сдвиги сигналов ^{13}C в спектре липополисахарида, полученном в DMSO- d_6 .

Спектр ^{13}C -ЯМР липополисахарида 680 (рис. 2) показывает наличие четырех сигналов непротонированных C-атомов при 108,4; 107,0; 104,1 и 103,0 м. д., относящихся к C2-атомам α , β -фруктофуранозных остатков. Интегральное соотношение сигналов при 108,4 и 107,0 м. д. равно 1 : 3; подобное интегральное соотношение наблюдается и для сигналов 104,1 и 103,0 м. д. В области резонанса кольцевых C-атомов наблюдаются интенсивные сигналы при 82,8; 81,6; 81,1; 77,5; 76,3; 74,8 м. д., соответствующие C3—C5-атомам фруктофуранозных остатков, а также четко выраженные сигналы при 80,2 и 79,8 м. д. меньшей интегральной интенсивности (соотношение сигналов 81,6; 81,1 соответственно к 80,2; 79,8 м. д. близко 3 : 1). В области резонанса оксиметильных групп наблюдаются два относительно интенсивных сигнала при 61,7 и 60,6 м. д., а в области 10—40 м. д. — сигналы при 43,4; 22,0; 24,6; 29,1; 31,3 и 33,8 м. д., соответствующие липидному компоненту липополисахарида. Кроме того, в спектре наблюдается сигнал при 20,7 м. д., соответствующий C-атому метильной группы ацетильной группировки. Сопоставление спектров ^{13}C -ЯМР нативного липополисахарида и его дезацетилированного производного показывает, что в спектре дезацетилированного липополисахарида отсутствуют сигналы при 108,4 и 104,1 м. д., соответствующие C2-атомам α , β -фруктофуранозных остатков, а также сигналы при 80,3 и 79,8 м. д., характерные для C5-атомов в случае замещения по C6-или C4-атомам α , β -фруктофуранозных остатков.

Присутствие OAc-групп в O-специфическом полисахариде подтверждается также результатами иммунохимических исследований. Данные

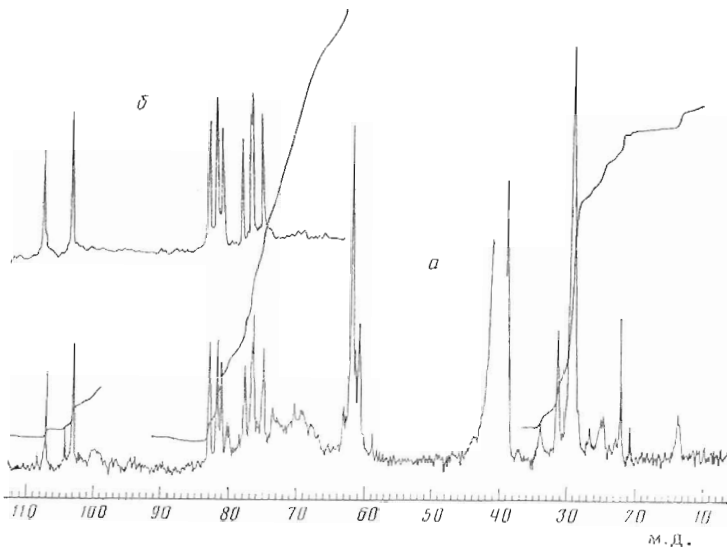


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР липополисахарида *Y. intermedia* 680 (а) и его дезацетилированного производного (б)

двойной диффузии в агаре указывают на серологическую активность липополисахарида и фруктана и на присутствие в них идентичных антигенных детерминант. Дезацетилирование липополисахарида приводит к потере его серологической активности.

Способность липополисахарида, дезацетилированного липополисахарида, фруктана, О-ацетильного производного фруктозы, метилгликозида

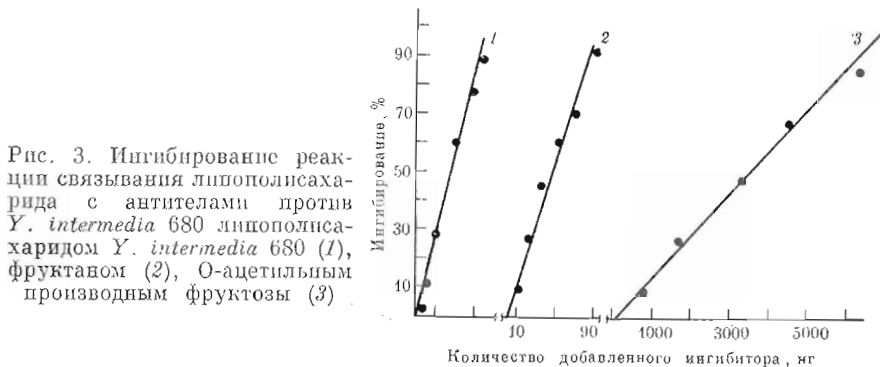
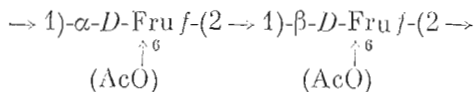


Рис. 3. Ингибирование реакции связывания липополисахарида с антителами против *Y. intermedia* 680 липополисахаридом *Y. intermedia* 680 (1), фруктаном (2), О-ацетильным производным фруктозы (3).

фруктозы и фруктозы ингибировать специфическое связывание липополисахарида с антителами против целого микроба штамма 680 была исследована в реакции пассивного гемолиза [12]. Как видно из рис. 3, липополисахарид, фруктан и О-ацетильное производное фруктозы полностью ингибируют систему, но обладают разной ингибирующей активностью. Так, 50% ингибирования достигается при концентрации этих соединений 2, 40 и 1250 мкг соответственно. Дезацетилированный липополисахарид, метилгликозид фруктозы и фруктоза не ингибируют систему даже при избытке ингибитора (до 800 мкг), что свидетельствует об определяющей роли ацетатной группы в ингибировании реакции пассивного гемолиза.

Таким образом, результаты исследований указывают на регулярность ацетатных групп во фруктане и на то, что детерминантой является О-ацетильное производное фруктозы. Значительная потеря ОАс-групп, вероятно, еще на стадии выделения липополисахарида свидетельствует о чрезвычайно высокой лабильности связи заместителя с фруктофурапозными остатками. Эта лабильность, а также данные ^{13}C -ЯМР-спектроскопии позволяют предположить, что О-ацетильные группы присоединены в положение $\beta\alpha$ - и β -фруктофурапозных остатков.

Исходя из данных химических и иммулохимических исследований и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии липополисахарида и фруктана, мы предлагаем следующую структуру дисахаридного повторяющегося звена O-специфического полисахарида из липополисахарида *Y. intermedia* штамма 680:



В природе широко распространены фруктаны растительного происхождения. В бактериях встречаются резервные фруктаны левапового и шчулинового типа [13]. D-Фруктоза найдена в составе липополисахарида *Vibrio cholerae* [14], однако отсутствует доказательство, что она является компонентом O-антигена. Нами впервые обнаружен в составе липополисахарида микроорганизма, патогенного для человека, необычный по строению серологически активный фруктан.

Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-12, FN-15, Whatman 3-MM в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3).

Моносахариды обнаруживали щелочным раствором азотнокислого серебра и анилинфталатом, аминсахара — 0,2% раствором нингидрина в ацетоне, CDO — тнобарбитуровой кислотой.

Гель-фильтрацию проводили на колонке (65 × 2,5 см) с сефадексом G-50 fine в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (4 мл AcOH, 10 мл пиридина на 1000 мл H₂O). Фракции тестировали фенол-сернокислотным методом.

Растворы лиофилизovali или упаривали в вакууме при 42° С.

Оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141.

Газожидкостную хроматографию проводили на хроматографе Pye-Unicam, серия 104, на стеклянных колонках (150 × 0,4 см), упакованных фазой 3% QF-1 на Gas Chrom Q (100—120 меш). Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов 175—225° С, 5°/мин и ацетатов частично метилированных полиолов 125—225° С, 5°/мин.

Хроматомасс-спектрометрию выполняли на приборе LKB 9000s с использованием колонок с фазой, как указано выше. ^{13}C -ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker Physics HX-250. Химические сдвиги пересчитывали относительно тетраметилсилана. В качестве внутреннего стандарта использовали метанол (δ_{C} 49,6 м.д.). Липополисахарид и дезацетилованный липополисахарид исследовали растворенными в DMSO-*d*₆, полисахарид и моносахариды — в D₂O, метилированный полисахарид — в CDCl₃.

Использовали микроорганизм *Y. intermedia* штамма 680, полученный из Института микробиологии и эпидемиологии СО АМН СССР г. Владивостока.

Выделение ЛПС. Сухой ацетоновый порошок *Y. intermedia* 680 (93 г) экстрагировали 45% водным фенолом. Нуклеиновые кислоты удаляли трехкратным ультрацентрифугированием при 105 000g в течение 4 ч. Выход липополисахарида 2,12 г.

Моносахаридный состав определяли гидролизом при 100° С липополисахарида 0,5 М трифторуксусной кислотой (3 ч), 2 М HCl (3 ч), 0,5 М H₂SO₄ (3 ч) с последующей хроматографией на бумаге, а также ГЖХ продуктов гидролиза в виде ацетатов полиолов.

Дезацетилирование. Липополисахарид (100 мг) дезацетиловали 0,01 М раствором щелочи KOH в атмосфере аргона в течение 4 ч, диализовали. Выход дезацетилованного липополисахарида 53 мг.

Автогидролиз. Липополисахарид (500 мг) растворяли в 50 мл H₂O и нагревали 4 ч при 100° С с контролем pH среды и наличия CDO через каждый час. Осадок липида А и липополисахарида (327 мг) отделяли ультрацентрифугированием (105 000g, 40 мин). Супернатант упаривали до 5 мл и осаждали 50 мл этанола. Из полисахаридной фракции (129 мг) гель-фильтрацией на сефадексе G-50 выделяли фракции: высокомолекулярные глюкоан (4 мг) и фруктан (42 мг) и низкомолекулярные полисахарид кора (18 мг) и олигосахариды с CDO (65 мг).

Уксуснокислотный гидролиз. Липополисахарид (1000 мг) растворяли в 100 мл 1% CH₃COOH и нагревали 1,5 ч при 100° С. Далее обрабатывали как описано выше. После осаждения полисахаридной фракции этанолом

из этанольного экстракта (300 мг) препаративной бумажной хроматографией выделяли фруктозу (190 мг) ($R_{\text{Rha}} = 0,6$, $[\alpha]_{578}^{20} - 69,7^\circ$ (с 1,0, H₂O), лит. данные $[\alpha]_{578}^{20} - 92,4^\circ$ [15]), О-ацетильное производное фруктозы (24 мг, $R_{\text{Rha}} = 1,04$), $[\alpha]_{578}^{20} - 57,6^\circ$ (с 0,2, H₂O), КДО (10 мг, $R_{\text{Rha}} = 0,23$) и КДО-фосфат (3 мг).

Варьирование условий уксуснокислотного гидролиза липополисахарида (100 мг) проводили по температуре 100, 90, 80° С и времени 90, 60, 30, 15 мин. Обработка аналогична описанной выше. Результат оценивали по отсутствию фруктозы в этанольном экстракте.

Фруктан (32 мг) метилировали по Хакомори [4]. Полностью метилированный фруктан экстрагировали хлороформом и сушили. Выход 20 мг. Продукт (5 мг) подвергали формолизу 90% HCOOH (100° С, 15 мин), гидролизу 0,062 М H₂SO₄ (100° С, 16 ч) и получали ацетаты частично метилированных полиолов, которые идентифицировали хроматомасс-спектрометрией.

Антисыворотку к *Y. intermedia* штамма 680 получали по методике [16].

Реакцию преципитации проводили на пластинках с 1% агаром по Оухтерлони.

Реакцию ингибирования пассивного гемолиза осуществляли по методике [12]. Липополисахарид (0,1 мл 0,1% раствора) нагревали 3 ч с 0,1 мл 0,1% раствора триэтиламина в воде при 37° С и доводили pH до 7 добавлением 0,2 М HCl. Суспензию подготовленных эритроцитов барана (0,2 мл отцентрифугированного осадка) в 5 мл фосфатного буфера, pH 7,2, добавляли к активированному липополисахариду и инкубировали 2 ч при 37° С. Сенсibilизированные эритроциты трижды отмывали фосфатным буфером и использовали в реакции пассивного гемолиза. Все растворы готовили на вероналовом буфере, pH 6,95, в присутствии яичного альбумина. 0,2 мл раствора ингибитора (0,5 мг — 1 мг), 0,2 мл антисыворотки (1 : 2500) инкубировали 2 ч при 37° С. После инкубации добавляли 0,1 мл компонента (сухой комплемент морской свинки в разбавлении 1 : 30), 0,1 мл суспензии сенсibilизированных эритроцитов и 0,1 мл вероналового буфера и еще раз инкубировали 30 мин при 37° С. Контроль лизиса проводили без добавления антисыворотки, контроль ингибирования — без добавления ингибитора. Поглощение супернатанта измеряли при 413 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleksić S., Bockemühl J. // J. Clin. Microbiol. 1984. V. 20. № 1. P. 99—102.
2. Kapperud G., Bergan T. // Meth. Microbiol. 1984. V. 15. № 6. P. 296—343.
3. Толмич С. В., Горшкова Р. П., Оводов Ю. С. // Химия природы. соедин. 1985. № 6. С. 751—755.
4. Hakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.
5. Hofmann P., Jann K., Jann B. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 147. № 3. P. 601—609.
6. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren G. // Chem. Commun. Stockholm Univ. 1976. № 8. P. 8—84.
7. Funcke W., Sonntag G., Triantephyllides Ch. // Carbohydr. Res. 1979. V. 75. № 1. P. 305—309.
8. Angyal S. J., Bethell G. S. // Aust. J. Chem. 1976. V. 29. № 6. P. 1249—1265.
9. Bock K., Pedersen C., Pedersen H. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1984. V. 42. P. 193—225.
10. Tamasic J., Jennings H. J., Glaudemans G. P. J. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. № 1. P. 127—133.
11. Trutnovsky H., Sakla A. B., Taleb S. A. // Microchem. J. 1975. V. 20. № 4. P. 415—420.
12. Kontrohr T., Peters K. // J. Immunol. Methods. 1976. V. 13. P. 271—277.
13. Kenne L., Lindberg B. The polysaccharides/Ed. Aspinall G. O. Pergamon Press, 1983. V. 2. P. 287—363.
14. Kenne L., Lindberg B., Unger P. // Carbohydr. Res. 1979. V. 68. № 1. P. C14—C16.
15. Staněk J., Cerný M., Kocourek J., Pacak J. The monosaccharides. Prague, 1963. P. 99.
16. Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Y. S. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 3. P. 527—531.

Поступила в редакцию
16.VI.1986
После доработки
4.X.1986

STRUCTURE OF AN O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE ISOLATED FROM
LIPOPOLYSACCHARIDE OF *YERSINIA INTERMEDIA* STRAIN 680

GORSBKOVA R. P., KOVALCHUCK S. V., ISAKOV V. V.,
FROLOVA G. M., OVODGV Yu. S.

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

An O-specific polysaccharide from lipopolysaccharide of *Yersinia intermedia* pathogenic strain 680 has been isolated and shown to be a serologically active fructane. Serological specificity of the lipopolysaccharide and the fructane was studied by reactions of precipitation and of inhibition of passive hemolysis. On the basis of methylation studies, ^{13}C NMR spectroscopy, and immunochemical data the following structure was proposed for the repeating unit of the O-specific polysaccharide:

