



УДК 547.114.5:543.422.23:579.842.23

© 1990 г.

*В. Д. Львов, С. В. Гурьянова, А. В. Родионов,
Б. А. Дмитриев, А. С. Шапков*, А. В. Игнатенко*,
Р. П. Горикова**, Ю. С. Оводов***

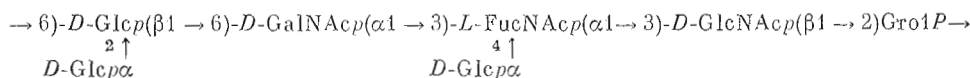
СТРУКТУРА ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА ГЛИЦЕРОФОСФАТСОДЕРЖАЩЕЙ О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ИЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *YERSINIA KRISTENSENII*, ШТАММ 103 (0:12,26)

*Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва;*

** Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва;*

*** Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО АН СССР,
Владивосток*

Из липополисахарида микроорганизма *Yersinia kristensenii* штамма 103 (0:12,26) мягким кислотным гидролизом получен О-специфический полисахарид, построенный из остатков *D*-глюкозы, 2-ацетиамидо-2,6-дидезокси-*L*-галактозы, 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы, 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы, глицерина и фосфорной кислоты в соотношении 3:1:1:1:1:1. На основании данных ³¹P- и ¹³C-ЯМР-спектров, результатов дефосфорилирования, анализа методом метилирования и избирательного расщепления по Смуту установлено, что повторяющееся звено полисахарида представляет собой глицерофосфатсодержащий разветвленный гексасахарид следующего строения:



Проведена полная интерпретация ¹³C-ЯМР-спектра полисахарида, подтверждающего его строение.

Классификация микроорганизмов осуществляется на основании их генетических, биохимических, морфологических, инфекционных и серологических признаков. Недавно из большой группы бактерий *Yersinia enterocolitica* на основании результатов ДНК-ДНК-гибридизации и биохимических характеристик были выделены три новых самостоятельных вида: *Y. kristensenii*, *Y. frideriksenii*, *Y. intermedia* [1], классификационная схема для которых еще не разработана. Более того, практически отсутствуют данные о химическом строении их антигенных полисахаридов.

Данная работа продолжает систематические исследования структур О-специфических полисахаридов (ПС) из липополисахаридов (ЛПС) бактерий рода *Yersinia* [2, 3]. В настоящем сообщении представлены результаты изучения химического строения О-специфической полисахаридной цепи из ЛПС музейного штамма 103 (0:12,26), отнесенного по новой классификации к *Y. kristensenii*.

Выделение ЛПС из сухих клеток *Y. kristensenii* штамма 103 проводили экстракцией горячим водным фенолом по Вестфалю [4] с последующим диализом экстракта без разделения водного и фенольного слоев. ЛПС, очищенный трехкратным ультрацентрифугированием 3%-ного водного раствора при 105 000 *g*, по данным УФ-спектроскопии, практически не содержал примеси нуклеиновых кислот и белков (область 230–300 нм; 0,1% водный раствор). Выход ЛПС составил 4,5%. По данным двойной диффу-

зии в агаре, ЛПС был серологически активен в реакции с гомологичной сывороткой.

Липополисахарид исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле (15%) в присутствии додецилсульфата натрия [5]. Упорядоченное распределение полос практически от старта до фронта указывало на присутствие молекул ЛПС с различной молекулярной массой, отличающихся последовательным увеличением числа повторяющихся звеньев в полисахаридной цепи [6].

Для выделения специфического полисахарида раствор ЛПС (2 мг/мл) нагревали 90 мин при 100°С с 1% уксусной кислотой. Образовавшийся осадок липида А отделяли центрифугированием при 18 000 g. Из супернатанта гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-50 был выделен ПС1 (выход 30%), который, по данным двойной диффузии в агаре, был серологически активен. Наряду с ПС1 была выделена также фракция высших олигосахаридов и низкомолекулярная фракция, содержащая в основном кетодезоксиоктулозоновую кислоту. В гидролизате олигосахаридной фракции методом ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии (ХМС) в виде ацетатов полиолов были идентифицированы глюкоза, галактоза, *D*-глицеро-*D*-манно-гептоза и *L*-глицеро-*D*-манно-гептоза, причем соотношение двух последних (~1:3) характерно для «кора» ЛПС персиний [7].

Данные, полученные при общей характеристике липида А, свидетельствовали об отсутствии принципиальных отличий его состава по сравнению с другими липидами А из ЛПС грамотрицательных бактерий и совпадали с результатами установления структуры липида А из ЛПС *Y. pseudotuberculosis* [8]. В липиде А обнаружены додекановая и 3-гидрокситетрадекановая жирные кислоты в соотношении ~1:3, а также глюкозамин и фосфат в соотношении ~2:1.

По данным электрофореза на бумаге (ЭФ), при проявлении щелочным нитратом серебра (нагревание над паром) и реактивом на фосфор ПС1 ($[\alpha]_D^{25} +25,2^\circ$ (с 1, H₂O)) был кислым, $E_{\text{ГЛСА}}=0,5$. Содержание фосфора в ПС оказалось 2,3%. В гидролизате ПС1 с помощью аминокислотного анализатора были идентифицированы эквивалентные количества 2-амино-2-дезоксиглюкозы, 2-амино-2-дезоксигалактозы и 2-амино-2,6-дидезоксигалактозы. При гидролизе в более мягких условиях (2 М HCl, 100°С, 3 ч) с последующим дезаминированием азотистой кислотой, восстановлением и ацетилированием методом ГЖХ, хроматомасс-спектрометрии [9] были обнаружены ацетаты глицерина, 2,5-ангидро-6-дезокситалята, 2,5-ангидроталита, 2,5-ангидроманнита и сорбита в соотношении приблизительно 1:1:1:1:3.

Кроме того, в гидролизате ПС1 в качестве минорного компонента с помощью электрофореза было установлено наличие кислого фосфорсодержащего продукта, $E_{\text{НЭРО}_4}=0,78$. При изучении кислого компонента с помощью хроматографии на бумаге в системе пропанол — аммиак (d 0,88) — вода (6:3:1), предложенной для идентификации глицерофосфатов [10], установлено, что подвижность ($R_{\text{ГГО}}=0,64$) изучаемого компонента отличается от подвижности заведомого 2-глицерофосфата ($R_{\text{ГГО}}=0,70$), фосфаты моносахаридов в предложенной системе мигрируют значительно медленнее. Кроме того, в отличие от 2-глицерофосфата этот продукт проявлялся щелочным нитратом серебра с предварительной обработкой периодатом. Приведенные выше данные позволили предположить, что в состав ПС1 входит 1-глицерофосфат. Окончательное доказательство этого, полученное при изучении продуктов избирательного расщепления по Смитту, представлено ниже.

Для определения абсолютной конфигурации моносахаридов, входящих в состав ПС1, они были выделены из гидролизата препаративной бумажной хроматографией в системе бутанол — пиридин — вода (6:4:3). Результаты определения оптического вращения позволили отнести глюкозу, 2-амино-2-дезоксиглюкозу, 2-амино-2-дезоксигалактозу к *D*-ряду, а 2-амино-2,6-дидезоксигалактозу — к *L*-ряду.

Результаты определения моносахаридного состава полностью соответствовали данным анализа характеристических областей ¹³C-ЯМР-спектра

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР полисахаридов ПС1 и ПС2 и олигосахаридов ГС, ТС, ДС1 и ДС2 (D_2O , 80°C) *

Соединение	Остаток моносахарида	Химические сдвиги ^{13}C , м. д. от ТМС					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
ПС1	-2,6Glc β 1-	103,6	77,9	75,8	70,8	75,8	65,9
	Glc $\rho\alpha$ 1-	97,9	72,2	75,1	70,8	73,1	61,8
	-6GalNAc $\rho\alpha$ 1-	99,0	50,4	68,8	70,1	70,8	68,8
	-3,4FucNAc $\rho\alpha$ 1-	98,6	50,4	77,9	79,4	66,6	16,9
	Glc $\rho\alpha$ 1-	98,6	73,0	74,0	70,8	72,7	61,8
	-3GlcNAc $\rho\beta$ 1-	102,7	57,0	81,2	69,8	77,1	61,8
ПС2	-2Gro1-	65,6	81,2	61,8			
	-6Glc $\rho\beta$ 1-	104,7	75,0	76,7	70,9	76,3	65,5
	-6GalNAc $\rho\alpha$ 1-	98,9	50,5	69,1	70,2	70,9	69,8
	-3FucNAc $\rho\alpha$ 1-	99,2	50,5	75,2	72,9	66,8	16,7
	-3GlcNAc $\rho\beta$ 1-	102,9	57,1	79,6	70,1	77,3	62,0
	-2Gro1-	66,0	81,5	62,1			
ГС	-2Glc $\rho\beta$ 1-	102,8	79,6	76,1	71,1	77,6	62,7
	Glc $\rho\alpha$ 1-	98,5	72,3	74,8	71,0	73,2	62,3
	-6GalNAc $\rho\alpha$ 1	99,1	50,6	68,7	70,1	71,6	69,1
	-3,4FucNAc $\rho\alpha$ 1-	99,1	50,0	77,3	79,6	67,5	17,0
	Glc $\rho\alpha$ 1-	99,0	73,0	74,2	71,0	73,0	62,2
	-3GlcNAc $\rho\beta$ 1-	102,1	56,8	79,6	69,9	76,9	62,1
ТС	-2Gro	62,0	82,4	62,0			
	Glc $\rho\beta$ 1-	104,5	75,2	77,0	71,1	77,1	63,0
	-6GalNAc $\rho\alpha$ 1-	99,2	51,0	69,2	70,3	71,1	69,4
	-3FucNAc $\rho\alpha$ 1-	99,2	50,6	77,6	73,1	67,2	16,8
	-3GlcNAc $\rho\beta$ 1-	102,6	57,2	79,7	70,2	77,2	62,7
	-2Gro	62,4	82,8	62,1			
ДС1	FucNAc $\rho\alpha$ 1-	99,1	55,7	69,0	72,5	68,1	16,5
	-3GlcNAc $\rho\beta$ 1-	102,7	57,0	79,9	69,8	77,1	62,0
	-2Gro1-	66,0	81,2	62,0			
	-1Gro	67,7	72,1	63,4			
ДС2	FucNAc $\rho\alpha$ 1-	99,0	50,7	69,0	72,4	68,1	16,5
	-3GlcNAc $\rho\beta$ 1-	102,5	57,0	80,0	69,8	77,0	62,0
	-2Gro	62,1	82,5	62,7			

* Химические сдвиги CH_2CO — 23,3—23,4 м. д., CH_3CO — 175,4 — 176,0 м. д.

ПС1 (см. рис. 1, таблицу). Обнаружение шести аномерных сигналов единичной интегральной интенсивности в области резонанса аномерных атомов углерода подтверждало наличие шести моносахаридных остатков в повторяющемся звене ПС1. Присутствие трех остатков 2-ацетамидо-2-дезоксигексоз доказывалось наличием трех характерных сигналов CH_2CON -групп в области ~ 23 и ~ 175 м.д., а также для 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-*L*-галактозы наличием высокопольного сигнала ~ 17 м.д. Кроме того, рассмотрение области резонанса атомов C2 ацетамидогексоз давало возможность заключить, что сигнал при 57,0 м.д. может принадлежать только β -связанному остатку с *глюко*-конфигурацией, а сигналы при 50,1 и 50,0 м.д. — α -связанным остаткам с *галакто*-конфигурацией [11], т.е. остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы связан с ПС1 β -связью, а остатки 2-ацетамидо-2,6-дидезокси-*L*-галактозы и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы — α -связью. Конфигурация гликозидных связей остальных моносахаридных остатков в ПС1 следовала из анализа констант спин-спинового взаимодействия (KССВ) $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ аномерных атомов углерода, которые оказались равными ~ 160 Гц для сигналов с хим. сдвигом 103,7, 102,7 м.д. и ~ 170 Гц — для сигналов с 99,9; 98,6 и 98 м.д. Поскольку для аномерных атомов углерода фуранозидов химические сдвиги C1 лежат в интервале 103—110 м.д., а константы спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 171—175 Гц [12, 13], можно заключить, что ни один из моносахаридных остатков в ПС1 не находится в фуранозной форме. Из этих данных следовало, что все остатки находятся в пиранозной форме, два из них присоединены β -гликозидными связями, а остальные четыре — α -гликозидными. Таким образом, с учетом приведенного выше анализа конфигураций связей

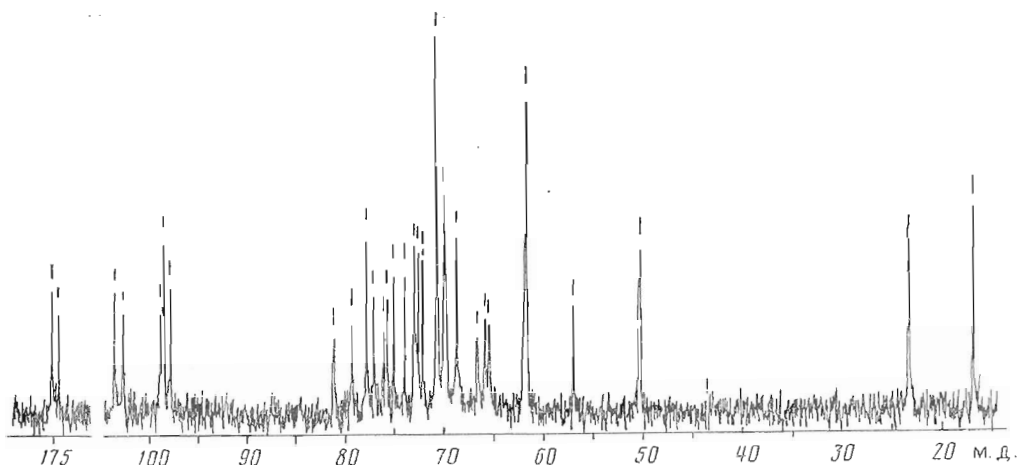


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР нативного полисахарида (ПС1)

остатков аминоксахаров следовало сделать вывод о том, что один из остатков *D*-глюкопиранозы имеет β -конфигурацию, а два других остатка *D*-глюкопиранозы — α -конфигурацию гликозидной связи.

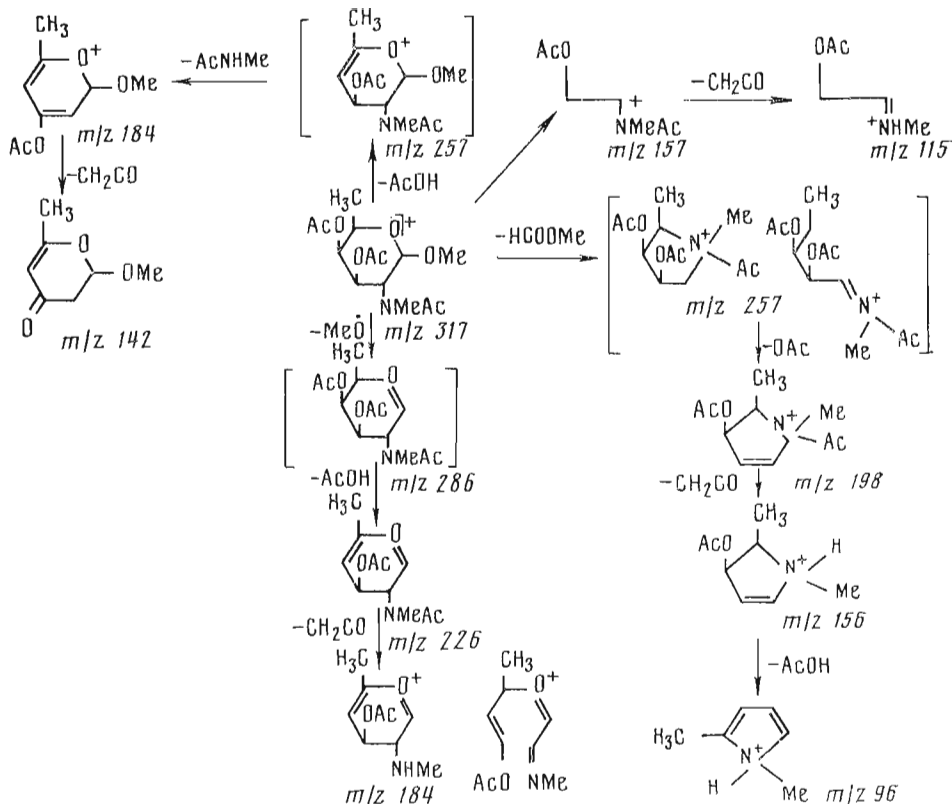
В спектре ^{31}P -ЯМР полисахарида был обнаружен сигнал с хим. сдвигом +1,6 м.д. (деионизованная вода), местоположение которого в спектре не менялось при изменении pH образца (pH 9,8 и 3,5). Описанным выше спектральным характеристикам однозначно соответствовало наличие в ПС монофосфодиэфирной группировки, причем положение сигнала фосфата в спектре позволяло исключить возможность гликозилфосфатной связи (сигнал гликозидного монофосфодиэфира обычно расположен в области $-1 \sim -2$ м.д.) [14]. Из этих данных непосредственно следовало, что один из моносахаридных компонентов полисахаридной цепи имеет в качестве заместителя остаток фосфорной кислоты, алкилированный глицерином.

Положение монофосфатной группы в полисахаридной цепи было установлено на основании данных дефосфорилирования ПС1 48% HF (4 сут, 20° С), в результате которого наблюдалось полное расщепление полимерной цепи с образованием гексасахаридного фрагмента (ГС) и освобождением фосфорной кислоты, причем свободных моносахаридов и глицерина обнаружено не было. Сопоставление данных анализа моносахаридного состава исходного ПС1 и гексасахарида, выделенного гель-хроматографией на колонке с TSK-40, показало их полную идентичность. Следовательно, остаток фосфорной кислоты входит в состав ПС1 в качестве мостиковой группы, соединяющей глицеринсодержащие гексасахаридные повторяющиеся звенья ПС1.

Сравнительный анализ методом метилирования ПС1 и гексасахарида показал, что ПС1 содержит два остатка терминальной *D*-глюкопиранозы, один остаток 2,6-ди-*O*-замещенной *D*-глюкопиранозы, 3,4-ди-*O*-замещенной 2-ацетидамо-2,6-дидезоксигалактопиранозы*, 6-*O*-замещенной 2-ацетидамо-2-дезоксигалактопиранозы** и 3-*O*-замещенной 2-ацетидамо-2-дезоксиглюкопиранозы**, тогда как гексасахарид вместо 2,6-ди-*O*-замещенного остатка *D*-глюкопиранозы содержит 2-*O*-замещенный остаток *D*-глюкопиранозы. Из приведенных выше данных можно было сделать следующие выводы: 1) полисахаридная цепь является разветвленной; 2) на концах боковых разветвлений расположены два остатка *D*-глюкопиранозы, а узлами разветвления являются остатки 2-ацетидамо-2,6-

* Основные направления фрагментации соответствующего метилфлюкозаминида представлены на схеме. В литературе отсутствуют данные о фрагментации метил-2,6-дидезоксид-2-(*N*-метилацетидамо)-3,4-ди-*O*-ацетидагалактопиранозидов.

** Выбор, касающийся характера замещения 2-ацетидамо-2-дезоксигалактопиранозы и 2-ацетидамо-2-дезоксиглюкопиранозы, был сделан на основании данных перидатного окисления ПС1, в процессе которого наблюдалось исчезновение *D*-галактозаминина при полном сохранении *D*-глюкозаминина (данные анализа гидролизата на аминокислотном анализаторе).



дидезокси-*L*-галактопиранозы и *D*-глюкопиранозы; 3) фосфат присоединяется в полисахаридной цепи в положение 6 остатка *D*-глюкопиранозы, расположенной в узле разветвления, и, значит, фосфатсодержащий фрагмент ПС1 может быть представлен следующим образом: Gro1P→6-*D*-Glc.

С целью выяснения характера присоединения терминальных остатков *D*-глюкопираноз были предприняты попытки ферментативного гидролиза ПС1 и гексасахарида β- и α-глюкозидазами различного происхождения. Однако ни в одном случае не наблюдалось заметного расщепления глюкопиранозидных связей. Сольволиз ПС1 жидким безводным HF при различных температурах приводил к трудноразделимой смеси (ВЭЖХ) большого числа олигосахаридных компонентов. Поэтому для выяснения взаимного расположения моносахаридных остатков в повторяющемся звене ПС был использован метод расщепления полисахаридной цепи по Смитту [15].

Как и следовало ожидать из данных анализа методом метилирования, в процессе окисления ПС1 избытком периодата натрия устойчивыми оказались лишь остатки 2-ацетида-2,6-дидезокси-*L*-галактопиранозы, 2-ацетида-2-дезокси-*D*-глюкопиранозы и глицерина. Образовавшийся в результате мягкого кислотного гидролиза окисленного и затем восстановленного боргидридом натрия ПС1 олигосахарид (ДС1) содержал помимо перечисленных выше компонентов эквимолярное количество фосфата. Местоположение сигнала в ³¹P-ЯМР-спектре и его характеристики для олигосахарид ДС1 совпадали с данными для ПС1. Строение ДС1 было установлено, исходя из результатов полного отнесения всех сигналов в его спектре ¹³C-ЯМР, а также в спектре ¹³C-ЯМР продукта дефосфорилирования ДС1 плавиковой кислотой (ДС2) (см. рис. 2 и 3 и таблицу). Спектр ДС2 содержал 19 хорошо разрешенных сигналов единичной интегральной интенсивности. Анализ спектра ДС2 с учетом эффектов гликозилирования [16] позволил сделать однозначный вывод о том, что ДС2 содержит незамещенный остаток α-связанной 2-ацетида-2,6-дидезокси-*L*-галактопиранозы и замещенный в положение 3 остаток 2-ацетида-2-дезокси-*D*-глюкопиранозы, присоединенный β-связью. Кроме того, расчет теоретических значений хим. сдвигов [16] для атомов С1—С6 остатка 2-ацетида-

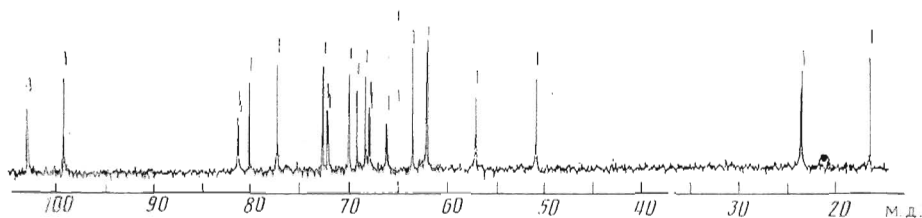


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР олигосахарида ДС1, полученного из ПС1 деградацией по Смиту

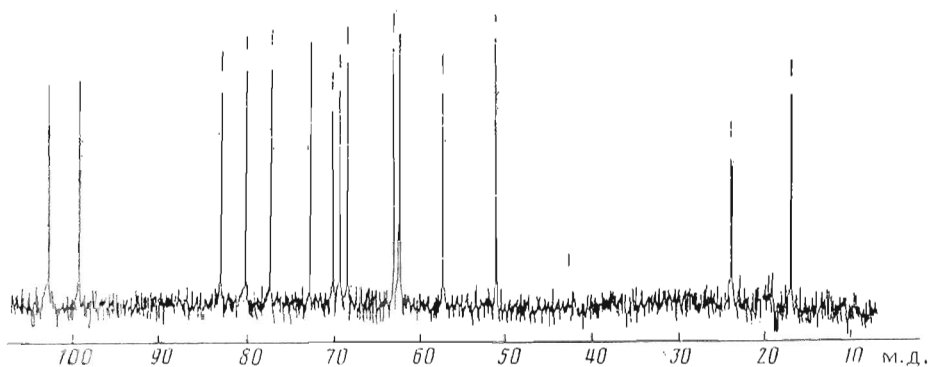
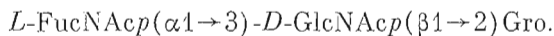


Рис. 3. Спектр ^{13}C -ЯМР олигосахарида ДС2, полученного дефосфорилированием ДС1

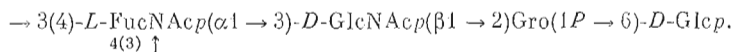
2,6-дидезокси-*L*-галактопиранозы и атомов С2—С6 для остатка 2-ацетиламино-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы показал, что ни одна из остальных возможных структур ДС2 не удовлетворяет экспериментальному ^{13}C -ЯМР-спектру. После отнесения всех сигналов обоих амносахаров стало очевидным, что остаток глицерина замещен в ДС2 в положение 2 (сигналы обеих незамещенных НОСН₂-групп остатка глицерина лежат в области ~62 м.д.). Таким образом, структура ДС2 могла быть представлена следующим образом:



Отнесение сигналов в спектре фосфатсодержащего ДС1 было проведено на основании результатов расшифровки спектра ДС2, а также литературных данных о величинах α - и β -эффектов фосфорилирования [17] и КССВ $J_{\text{C, P}}$ [18] (см. таблицу). Основные изменения в спектре ДС2 коснулись сигналов атомов С1 и С2 остатка глицерина: сигнал атома С1 был обнаружен в виде дублета с КССВ $^2J_{\text{C, P}} \sim 4$ Гц в более слабом поле (66,0 м.д., α -эффект гликозилирования ~ 4 м.д.), а сигнал атома С2 также в виде дублета с КССВ $^3J_{\text{C, P}} \sim 8$ Гц — в более сильном поле (81,2 м.д., β -эффект гликозилирования $\sim 1,5$ м.д.). Следовательно, фосфат присоединен к остатку глицерина в положение 1. Кроме того, появление в спектре ДС1 в сравнении со спектром ДС2 трех новых сигналов с хим. сдвигами 67,7 ($J_{\text{C, P}} \sim 6$ Гц), 72,0 ($J_{\text{C, P}} \sim 9$ Гц) и 62,0 м.д. однозначно указывало на присутствие в ДС1 второго остатка глицерина, замещенного фосфатом в положении 1. Дополнительный остаток глицерина, очевидно, представляет собой С4—С6-фрагмент 2,6-ди-О-замещенного остатка *D*-глюкопиранозы, расщепившегося в результате распада по Смиту. Таким образом, ДС1 имеет следующее строение:



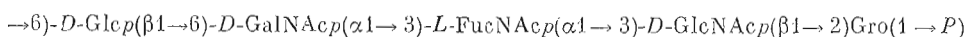
и, следовательно, фрагменту повторяющегося звена ПС1 может быть приписано строение:



Наличие двух терминальных остатков *D*-глюкопиранозы в гексасакхаридном повторяющемся звене ПС1 позволяло надеяться, что в очень мяг-

ких условиях периодатного окисления преимущественно будут окисляться именно эти моносахаридные остатки. Этого удалось добиться, варьируя условия окисления (температура, концентрация периодата натрия, разбавление раствора). Оптимальными оказались следующие условия: температура 4° С в разбавленном растворе (2 мг ПС1 на 1 мл Н₂О) при недостатке периодата натрия (4 моль окислителя на 6 способных к окислению α-диольных групп). Выделенный после восстановления NaBH₄, мягкого кислотного гидролиза и гель-хроматографии модифицированный полисахарид (ПС2), по данным определения моносахаридного состава, содержал эквивалентные количества *D*-глюкозы, 2-амино-2-дезоксид-*D*-галактозы, 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы, 2-амино-2,6-дидезоксид-*L*-галактозы, глицерина и фосфата.

При дефосфорилировании ПС2 в качестве основного компонента был выделен тетрасахарид (ТС), имевший тот же состав (за исключением фосфата), что и ПС2. Анализ методом метилирования ПС2 и тетрасахарида показал, что в состав повторяющегося звена ПС2 входят 3-О-замещенные остатки 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-глюкопиранозы и 2-ацетиамидо-2,6-дидезоксид-*L*-галактопиранозы, а также 6-О-замещенные остатки 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактопиранозы и *D*-глюкопиранозы, вместо последнего из которых в случае тетрасахарида обнаружено эквивалентное количество производного незамещенной *D*-глюкопиранозы. Из этих данных можно было заключить, что ПС2 имеет следующее строение:

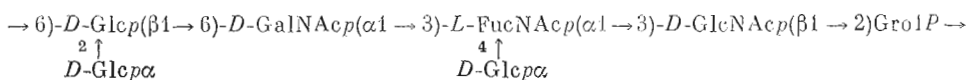


и, таким образом, терминальные остатки *D*-глюкопиранозы присоединены в положение 4 остатка 2-ацетиамидо-2,6-дидезоксид-*L*-галактопиранозы и положение 2 остатка *D*-глюкопиранозы.

Определение конфигурации гликозидных связей остатков *D*-глюкопираноз, один из которых присоединен β-, а два других — α-гликозидной связью, было выполнено в результате полного отнесения всех сигналов в ¹³С-ЯМР-спектрах тетрасахарида и ПС2. При расшифровке спектра тетрасахарида использовались спектральные данные для ДС2, а также литературные характеристики α- и β-метил-*D*-глюкопиранозидов, 6-О-замещенных остатков 2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозы и 3-О-замещенного остатка 2-ацетиамидо-2,6-дидезоксид-α-*L*-галактопиранозы [16] (об установлении конфигурации гликозидных связей остатков аминсахаров см. выше). Анализ ¹³С-ЯМР-спектра тетрасахарида показал, что он содержит все сигналы, характерные для β-связанного остатка *D*-глюкопиранозы, тогда как сигналы атомов С2 и С5 в области ~72 м.д. остатка α-связанной *D*-глюкопиранозы в спектре отсутствуют. Следовательно, остаток *D*-глюкопиранозы, расположенной в основной цепи ПС1, имеет β-конфигурацию. Из сопоставления области аномерных атомов углерода спектра нативного ПС1 (см. выше) и тетрасахарида следовало, что сигналы при 103,6 и 104,7 м.д. в соответствующих спектрах принадлежат остатку β-связанной *D*-глюкопиранозы. В результате отнесения сигнала С1 остатка β-*D*-глюкопиранозы стало возможным получить подтверждение взаимного расположения данного остатка и остатка 2-ацетиамидо-2-дезоксид-α-*D*-галактопиранозы. Действительно, остаток 2-ацетиамидо-2,6-дидезоксид-α-*L*-галактопиранозы не может быть замещен остатком β-гексапиранозы, так как в таком случае наблюдались бы аномальные эффекты замещения, в том числе для С1 гликозилирующего моносахарида — хим. сдвиг атома С1 остатка β-*D*-глюкопиранозы был бы близок к 100 м.д. [16]. Расшифровка ¹³С-ЯМР-спектра ПС2, лишь в деталях отличающегося от спектра тетрасахарида, была проведена с учетом описанного выше отнесения сигналов остатка фосфорилированного глицерина и появления в спектре ПС2 сигнала атома С6 остатка 6-О-замещенной β-*D*-глюкопиранозы при ~65,5 м.д. с КССВ *J*_{с,р} 4 Гц (см. таблицу).

Из всех приведенных выше данных следовало, что остаток *D*-глюкопиранозы, расположенный в основной полисахаридной цепи, присоединен β-гликозидной связью и, таким образом, оба терминальных остатка *D*-глюкопиранозы имеют α-конфигурацию гликозидной связи. Следовательно,

повторяющееся звено О-специфического полисахарида *Y. kristensenii* штамма 103 имеет строение:



На последнем этапе работы была проведена полная расшифровка ^{13}C -ЯМР-спектра гексасахарида и далее спектра ПС1 с помощью тех же подходов, что и в случае тетрасахарида и ПС2. Все сигналы в спектрах гексасахарида и ПС1 были отнесены с использованием литературных спектральных данных для α -метил-*D*-глюкопиранозида, принимая во внимание величину и знак эффектов гликозилирования [16], наблюдающихся при замещении остатков 2-ацетиамидо-2,6-дидезокси- α -*L*-галактопиранозы и *D*-глюкопиранозы в положение 4 и 2 соответственно. Отсутствие заметных расхождений между теоретическими и экспериментальными значениями хим. сдвигов для всех углеродных атомов в спектре ПС1 представляется независимым доказательством структуры повторяющегося звена ПС1.

Необходимо отметить, что фосфатсодержащие полисахариды принадлежат обычно к классу тейхоевых кислот [19] или К-полисахаридов [20]. Выделенный нами из ЛПС *Y. kristensenii* штамма 103 (0 : 12,26) специфический полисахарид является, по-видимому, первым примером глицерофосфатсодержащего О-антигенного полисахарида.

Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 и FN-11 в системе растворителей бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (А); пропанол — NH_4OH (*d* 0,88) — вода, 6 : 3 : 1 (Б). Электрофорез проводили 100 мин в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5, при 40 В/см. Моносахариды обнаруживали щелочным нитратом серебра, аминоксахара — 0,2% раствором нингидрина в ацетоне, компоненты с винциальными гидроксильными группами — щелочным нитратом серебра с предварительным периодатным окислением, 2-кето-3-дезоксиктулозоновую кислоту — реагентом с тиобарбитуровой кислотой [21].

Гель-фильтрацию проводили на колонках (2,5×60 см) с сефадексом G-50, TSK-гелями HW-50 и HW-40 в 0,05 М уксусной кислоте. Детектирование осуществляли с помощью УФ-детектора Uvicord S (206 нм) и Uvicord II (254 нм).

Растворы упаривали в вакууме при 40° С или лиофилизовали.

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

Газожидкостную хроматографию проводили на хроматографах Pye-Unicam, модель 104, на стеклянных колонках (0,4×150 см), упакованных фазой 3% QE-1 на Gas-Chrom Q (100—120 меш) и Hewlett-Packard 5890 на стеклянной капиллярной колонке (25 м) Ultra 1. Моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов в интервале 150—225° С (5°/мин), ацетатов частично метилированных полиолов и ацетатов частично метилированных метилгликозидов в интервале 110—280° С (10°/мин). Жирные кислоты анализировали в виде метиловых эфиров (150—225° С, 5°/мин). Хроматомасс-спектрометрию выполняли на приборе LKB 9000s и Finigan на капиллярных колонках с указанными выше фазами.

^{31}P -ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker AM 300 при 20° С относительно H_3PO_4 . ^{13}C -ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker WM при 80° С относительно метанола (δ 50,14 м.д.).

Содержание фосфора определяли по методике [22].

Аминосакхара идентифицировали на аминокислотном анализаторе LG 5001 в соответствии с работой [23].

Использовали микроорганизм *Y. kristensenii*, штамм 103 (0 : 12,26), полученный от профессора Н. Mollaret (институт Пастера, Париж).

Выделение липополисахарида. Сухой ацетоновый порошок *Y. kristensenii* (40 г) экстрагировали 30 мин 45% водным фенолом при 68–70° С. Объединенный водно-фенольный экстракт диализовали против проточной и далее дистиллированной воды, упаривали до объема 100 мл и лиофилизировали. Раствор экстракта в воде (10 мг/мл) подвергали трехкратному ультрацентрифугированию при 105 000g в течение 4 ч. Выход ЛПС составил 1,68 г (4,5%).

Выделение полисахарида. ЛПС (1 г) гидролизovali 1,5 ч 1% CH_3COOH (2 мг/мл) при 100° С. Осадок липида А (300 мг) отделяли центрифугированием, дважды промывали 1% раствором CH_3COOH . Супернатант упаривали и лиофилизovali. При хроматографии на сефадексе G-50 получали высокомолекулярный полисахарид (320 мг), олигосахаридную фракцию (300 мг) и фракцию моносахаридов (60 мг).

ПС гидролизovali 3 ч при 100° С 0,5 М трифторуксусной кислотой или 2 М HCl . Моносахаридный состав определяли БХ, ЭФ и ГЖХ. Для анализа моносахаридов на аминокислотном анализаторе использовали гидролизат ПС 4 М HCl (100° С, 16 ч). Для определения абсолютной конфигурации моносахаридов 20 мг ПС гидролизovali 3 ч 2 М HCl при 100° С. Гидролизат наносили на колонку (1×5 см) с катионитом КУ-2 (H^+) в воде и нейтральные моносахариды элюировали 10 объемами воды. Получали 5 мг Glc. Аминосахара элюировали 10 объемами 2 М HCl , элюат упаривали досуха, остаток делили препаративной БХ в системе А. Выделено 1,7 мг 2-амино-2,6-дидезоксигалактозы, 1 мг 2-амино-2-дезоксиглюкозы, 1 мг 2-амино-2-дезоксигалактозы.

Определение жирнокислотного состава липида А. 1 мг липида А гидролизovali 5 ч 4 М HCl при 100° С. Гидролизат упаривали, жирные кислоты экстрагировали смесью этилацетат — гептан (1:1). Экстракт обрабатывали эфирным раствором диазометана до образования устойчивой желтой окраски и анализировали методом ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии.

Дефосфорилирование полисахарида. а) *Подбор условий дефосфорилирования ПС.* Обработку ПС (10 мг) 48% HF проводили при 0 и 20° С в течение 2 или 4 сут. После удаления плавиковой кислоты высушиванием в эксикаторе над NaOH при 1 мм рт. ст. остаток растворяли в воде и прибавляли раствор NH_4OH (d 0,88) до pH 7. Раствор хроматографировали на колодке (1,6×100 см) с TSK-гелем HW-40(S). Во всех фракциях определяли моносахаридный состав и содержание фосфора. Результат дефосфорилирования оценивали по максимальному выходу дефосфорилированного гексасахарида и отсутствию моносахаридов в низкомолекулярной фракции;

б) *Получение гексасахарида.* 100 мг ПС дефосфорилировали 4 сут 0,5 мл 48% HF при 20° С. Далее обрабатывали как описано выше. После гель-хроматографии получали 60 мг высокомолекулярной фракции, 25 мг гексасахарида и фракцию, содержащую свободную фосфорную кислоту. Высокомолекулярную фракцию повторно обрабатывали 48% HF, как описано выше, и дополнительно выделяли 25 мг гексасахарида. Моносахаридный состав полученного гексасахарида определяли как описано выше.

Распад полисахарида по Смитчу. Раствор ПС (100 мг) в 13 мл 0,1 М периодата натрия выдерживали в темноте 2,5 сут при 20° С, добавляли 3 капли этиленгликоля и через 30 мин наносили на колонку с сефадексом G-50. К раствору окисленного ПС в 5 мл H_2O прибавляли избыток NaBH_4 , через 4 ч реакционную смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 5 и хроматографировали на колодке с сефадексом G-50. Высокомолекулярную фракцию (70 мг) гидролизovali 2 ч 35 мл 1% CH_3COOH при 100° С, упаривали до объема 3 мл и хроматографировали на колодке с TSK-гелем HW-40. Основную фракцию ДС1 (25 мг) анализировали на содержание фосфора (3,5%) и определяли моносахаридный состав как описано выше.

Дефосфорилирование дисахарида I. 25 мг ДС1 выдерживали 2 сут в 0,5 мл 48% HF при 4° С. Далее обрабатывали как описано выше и гель-хроматографией на колодке с TSK-40 выделяли ДС2 (7 мг).

Частичное периодатное окисление полисахарида. а) *Подбор условий.* ПС (1 мг) растворяли в 0,5 мл NaIO_4 (0,6 или 1,2 мг) и оставляли при

4°С на 1, 2 или 4 сут. Реакцию прекращали прибавлением 20 мкл этиленгликоля, реакционную смесь диализовали и лиофилизовали. Глубину периодатного окисления оценивали по результатам анализа моносахаридного состава окисленного ПС.

б) *Получение частично окисленного полисахарида.* Охлажденный до 4°С раствор 50 мг ПС в 6,5 мл воды прибавляли к 6 мл охлажденного до 4°С раствора NaIO₄ (30 мг) и оставляли в темноте при 4°С на 4 сут. Реакционную смесь обрабатывали как описано выше. Выход модифицированного ПС2 составил 30 мг (60%).

Дефосфорилирование полисахарида 2. 28 мг ПС2 обрабатывали 4 сут 48% HF при 20°С и после обычной обработки и хроматографии на колонке с TSK-40 получали 6,5 мг тетрасахарида.

Метилирование. ПС1 (10 мг), гексасахарид (5 мг), ПС2 (3 мг) и тетрасахарида (2 мг) метилировали по методу Хакомори [24]. Сползя метилированный продукт выделяли на колонке Sep-Pak C-18. Продукт подвергали действию HCl в метаноле (100°С, 16 ч) с последующим ацетилированием (Ac₂O/Py, 100°С, 2 ч). Полученные ацетаты частично метилированных метилгликозидов идентифицировали с помощью хроматомасс-спектрометра, гидролизовали 2 ч 2 М HCl при 100°С, восстанавливали NaBH₄ в течение 2 ч и ацетилировали (Ac₂O/Py, 100°С, 2 ч). Полученные ацетаты частично метилированных полиолов идентифицировали хроматомасс-спектрометрически.

Получение антисыворотки. Антисыворотки к *Y. kristensenii* штамма 103 (0:12,26) получали по методике [25].

Реакция преципитации. Реакцию преципитации проводили на пластинках с 1% агаром по Оухтерлоши.

Авторы выражают благодарность сотруднику лаборатории химии углеводов ИОХ АН СССР Ю. А. Книрелю за расчет теоретического спектра олигосахаридов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kapperud G., Bergan T. // Meth. Microbiol. 1984. V. 15. № 6. P. 296–343.
2. Оводов Ю. С., Горшкова П. П. // Химия природн. соедин. 1988. № 2. С. 163–171.
3. Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 156. № 2. P. 391–397.
4. Westphal O., Jann K. Methods Carbohydr. Chemistry/Eds Whistler R., Bemiller J. M. N. Y.—L.: Acad. Press, 1965. P. 88–91.
5. Tsai C.-M., Frasch C. E. // Anal. Biochem. 1982. V. 119. № 1. P. 115–119.
6. Palva E. T., Makela P. H. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 107. № 1. P. 137–143.
7. Толмич С. В., Горшкова П. П., Оводов Ю. С. // Химия природн. соедин. 1985. № 6. С. 751–755.
8. Krasikova I. N., Gorbach V. I., Solov'eva T. F., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 89. P. 287–289.
9. Dmitriev B. A., Backinovskiy L. V., L'vov V. L., Kochetkov N. K., Hoffman I. L. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 50. № 3. P. 539–547.
10. Anderson A. J., Archibald A. R. // Biochem. J. 1975. V. 151. P. 115–120.
11. Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Дерезицкая В. А. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1495–1506.
12. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
13. Bock K., Lundt I., Pedersen C. // Tetrahedron Lett. 1973. № 13. P. 1037–1040.
14. Egan W., Schneerson R., Werner K. E., Zon G. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 2898–2910.
15. Goldstein I. J., Hay G. W., Lewis B. A., Smith F. // Abstr. Papers J. Amer. Chem. Soc. 1959. V. 135. P. 3D.
16. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75.
17. De Boer W. R., Kruyssen F. J., Wouters Y. T. M., Kruk C. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 62. № 1. P. 1–6.
18. Jann B., Dengler Th., Jann K. // FEMS Microbiol. Letters. 1985. V. 29. P. 257–261.
19. Наумова Н. Б., Шашков А. С., Строганова М. П. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1529–1537.
20. Egan W., Schneerson R., Werner K. E., Zon G. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 2898–2910.
21. Weissbach A., Huxoitz J. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. № 4. P. 705.
22. Симен Э. Методы исследования пуклеиновых кислот. М.: Мир, 1970.
23. Родионов А. В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 581–588.
24. Hakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 2. P. 205–208.

V. L. L'VOV, S. V. GURYANOVA, A. V. RODIONOV, B. A. DMITRIEV,
A. S. SHASHKOV *, A. V. IGNATENKO *, R. P. GORSHKOVA **,
Yu. S. OVODOV **

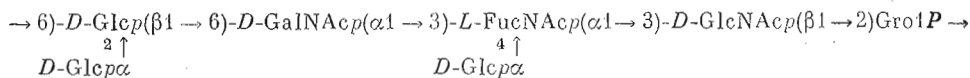
THE STRUCTURE OF THE REPEATING UNIT
OF THE GLYCEROLPHOSPHATE-CONTAINING O-SPECIFIC
POLYSACCHARIDE CHAIN FROM LIPOPOLYSACCHARIDE
OF *YERSINIA KRISTENSENII* STRAIN 103 (0 : 12,26)

*N. F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Academy of Medical Science
of the USSR, Moscow;*

** N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;*

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

Mild acid hydrolysis of the lipopolysaccharide from *Yersinia kristensenii* strain 103 (0 : 12,26) afforded teichoic acid-like polysaccharide. From the results of methylation, dephosphorylation, partial Smyth degradation, and ^{13}C and ^{31}P NMR data the structure of the repeating unit of the polysaccharide was deduced as follows:



The structure was confirmed by complete interpretation of polysaccharide ^{13}C NMR spectrum.