



УДК 577.114.5:543.422.23

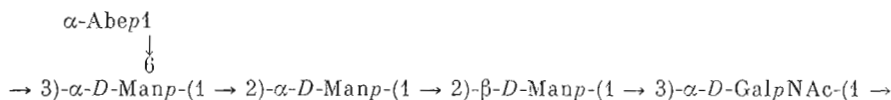
© 1991 г.

Р. П. Горшкова, В. В. Исаков, Л. С. Шевченко,
Ю. С. Оводов

СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* (СЕРОВАР II C)

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО АН СССР, Владивосток

При мягком кислотном гидролизе липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* (серовар II C) выделен специфический полисахарид, содержащий остатки абеквозы, *D*-маннозы и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы в соотношении 0,8 : 3 : 1. На основании данных метилирования, периодатного окисления, частичного гидролиза и спектроскопии ^{13}C -ЯМР установлено, что повторяющееся звено специфического полисахарида имеет структуру



Структура О-специфических полисахаридов сероваров IIA и IIB *Yersinia pseudotuberculosis* предложена Б. Линдбергом с соавт. [1, 2]. Повторяющееся звено у обоих сероваров представлено трисахаридами, а иммунодетерминантным моносахаридом является абеквоза. Кроме нее в состав специфического полисахарида серовара IIA входят остатки *L*-фукозы и *D*-маннозы, а в случае серовара IIB — 6-дезоксигептозы и *D*-галактозы.

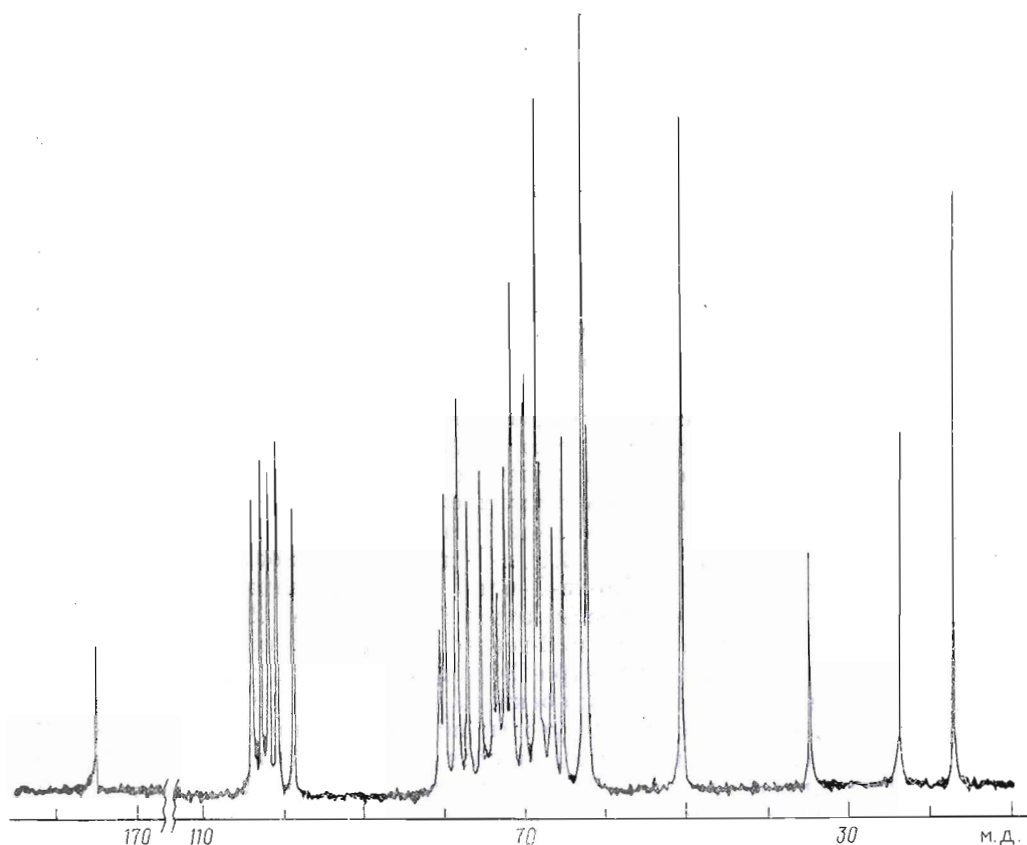
Настоящая работа продолжает иммунохимические исследования антигенов *Y. pseudotuberculosis* и посвящена установлению строения О-специфического полисахарида серовара II C *Y. pseudotuberculosis* (штамма 274, изолированного от человека), классифицированного японскими исследователями в 1984 г. [3].

Липополисахарид мы выделяли из ацетонового порошка микробной массы экстракцией горячим водным фенолом и очищали от нуклеиновых кислот 3-кратным ультрацентрифугированием водной фазы. Его выход составил 4,1%. В состав липополисахарида входят 55,2% моносахаридов, 37,9% липида А, 6,3% 3,6-дидезоксисахаров и 7,7% КДО. Липополисахарид обладает серологической активностью и дает одну полосу преципитации с гомологичной антисывороткой при двойной диффузии в агаре.

При укислительном гидролизе липополисахарида липид А выпал в осадок, а из надосадочного раствора при осаждении этанолом выделена гаптенная фракция. В надосадочном этанольном растворе хроматографией на бумаге обнаружены КДО и липофильный моносахарид, который выделен препаративной хроматографией на бумаге, R_{Fha} 1,16, $[\alpha]_{578}^{20}$ —5,6° (с 1,0, вода). По хроматографической подвижности и временам удерживания при газожидкостной хроматографии выделенный моносахарид совпадает с синтетической абеквозой. Сравнением с литературными данными [4] по величине удельного вращения моносахарид отнесен к 3,6-дидезокси-*D*-ксило-гексозе (абеквозе).

При эксклюзионной хроматографии гаптенной фракции на сефадексе G-50 за свободным объемом выходит специфический полисахарид, $[\alpha]_{578}^{20}$

Сокращения: Abe — абеквоза (3,6-дидезокси-*D*-ксило-гексоза), КДО — 2-кето-3-дидезоксиоктоновая кислота.



Спектр ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида из ЛПС *Y. pseudotuberculosis* серовара ПС

+132° (с 0,25, вода), и две фракции, которые в дальнейшем не исследовались.

Хроматографией на бумаге в гидролизате специфического полисахарида обнаружены остатки абеквозы, маннозы и галактозамина. Газо-жидкостной хроматографией идентифицированы абеквоза, манноза и галактозамин в соотношении 0,8 : 3 : 1.

В спектре ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида (рисунок) в области резонанса аномерных атомов углерода наблюдается пять сигналов с химическими сдвигами 98,3; 100,4; 101,5; 102,4 и 103,5 м.д. единичной интегральной интенсивности. Это указывает на то, что полисахарид построен из регулярно повторяющихся пентасахаридных звеньев. Кроме того, в спектре присутствуют характеристичные сигналы, соответствующие одной 6-дезоксигруппе (16,6 м.д.), одной N-ацетильной группе (23,3 и 174,2 м.д.), одной дезоксигруппе моносахаридного цикла (34,3 м.д.), а также атому углерода, несущему ацетамидную группу (50,2 м.д.).

Результаты анализа спектра ^{13}C -ЯМР специфического полисахарида падаются в соответствии с химическими данными и свидетельствуют о том, что повторяющимся звеном полисахарида является пентасахарид, содержащий три остатка маннозы и по одному остатку абеквозы и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы. В спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида, полученном без подавления С,Н-взаимодействия, аномерные С-атомы имеют следующие величины констант спин-спинового взаимодействия: $^1J_{\text{C,H}}$ 170,1 Гц для сигналов при 98,5; 100,4 и 101,5 м. д.; 172,6 Гц для сигнала при 103,5 м. д. и 163,6 Гц для сигнала при 102,4 м. д. Из значения констант спин-спинового взаимодействия [5] аномерных атомов углерода следует, что четыре моносахаридных остатка включены в углеводную цепь α -гликозидными связями, а один — β -связью. Для ряда моносахаридных остат-

ков конфигурация гликозидной связи вытекает из величин химических сдвигов характеристичных сигналов.

Конфигурация аномерного центра абеквозы следует из химического сдвига С3-атома (34,3 м. д.), который может отвечать только α -абеквозе в пиранозной форме [6], а величина химического сдвига С3-атома (50,1 м. д.) 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы соответствует α -*D*-галактозамину, замещенному по С3-атому [7].

Спектр ^{13}C -ЯМР полисахарида, полученный с использованием эксперимента по неселективному переносу поляризации [8], свидетельствует о том, что сигналы при 61,7; 62,1 и 66,1 м. д. принадлежат гидроксиметильным группам. Наличие сигнала гидроксиметильной группы при 66,1 м. д. означает, что в состав повторяющегося звена полисахарида входит моносахаридный остаток, гликозилированный α -гликозидной связью и имеющий заместитель по С6-атому.

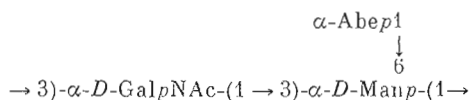
Для определения типов замещения моносахаридов полисахарид метилировали и полученные частично метилированные моносахариды анализировали методом хроматомасс-спектрометрии в виде соответствующих ацетатов полиолов и ацетатов метилгликозидов. В результате были идентифицированы: 2,4-ди-О-метил-3,6-дидезокси-*ксило*-гексопираноза, 3,4,6-три-О-метил-*D*-маннопираноза, 2,4-ди-О-метил-*D*-маннопираноза и 2-(*N*-метил)-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-ди-О-метил-*D*-галактопираноза. Количество 3,4,6-три-О-метил-*D*-маннозы вдвое больше, чем 2,4-ди-О-метил-*D*-маннозы и 2-(*N*-метил)-ацетамидо-2-дезоксид-4,6-ди-О-метилгалактозы. Незначительное количество 2,4,6-три-О-метил-*D*-маннозы обусловлено, вероятно, частичным отщеплением абеквозы при выделении специфического полисахарида. Из-за высокой летучести сполна метилированную абеквозу удалось обнаружить только в виде ацетата полиола. Из приведенных данных следует, что специфический полисахарид разветвлен. В основную цепь входят два остатка маннозы, замещенные при С2, остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-галактозы, замещенный при С3; в узле разветвления находится остаток маннозы, имеющий заместители в положениях 3 и 6, в боковую цепь входит терминальный остаток абеквозы.

Для получения дополнительных сведений о присоединении терминальной абеквозы специфический полисахарид подвергали уксуснокислотному гидролизу с последующим осаждением этанолом полисахаридной фракции и хроматографией на сефадексе G-50. При этом выделили модифицированный полисахарид с меньшим содержанием абеквозы. В этанольном растворе бумажной и газожидкостной хроматографией обнаружена абеквоза.

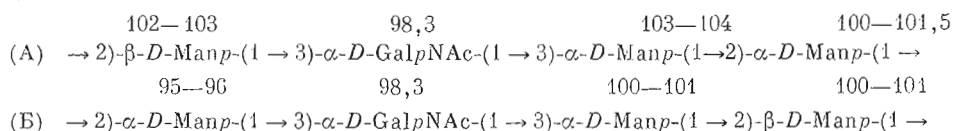
В спектре ^{13}C -ЯМР модифицированного полисахарида наблюдается значительное уменьшение интенсивности сигналов (по отношению к исходному) при 101,5; 69,5; 68,1; 64,8; 34,3 и 16,6 м. д. Эти значения химических сдвигов характерны для абеквозы [6]. В то же время в спектре модифицированного полисахарида наблюдается уменьшение интенсивности сигнала при 66,1 и появляется дополнительный сигнал при 73,6 м. д., характерный для С5-атома α -*D*-маннопиранозы [9]. Из приведенных данных следует, что остаток абеквозы является терминальным и гликозилируется по положению 6 остаток α -*D*-маннопиранозы.

Для установления структуры специфического полисахарида его подвергали периодатному окислению. При сопоставлении спектров ^{13}C -ЯМР исходного и окисленного полисахаридов обращает на себя внимание отсутствие в спектре окисленного полисахарида сигналов с химическими сдвигами 67,7; 68,0; 71,2 и 75,1, характерными для С4- и С3-атомов α - и β -маннопираноз, имеющих замещение по С2-атому [9]. В то же время наблюдается сдвиг сигналов аномерных С-атомов при 100,4; 102,4 и 103,5 м. д. в более слабое поле до 104,5 м. д., а также сдвиг сигналов кольцевых С-атомов, участвующих в образовании гликозидной связи, в слабое поле на 2—3 м. д. Из данного сопоставления следует, что два остатка *D*-маннопираноз имеют замещение по С2-атому, один из них включен в углеводную цепь β -связью. С другой стороны, из сопоставления спектров полисахаридов видно, что неокисленными звеньями остались остатки *D*-галактозамина и α -*D*-маннопиранозы, гликозилированной по С6-атому остатком

α -абеквзы. Изменения сигналов неокисленных звеньев коснулись только С-атомов, лежащих вблизи связи с модифицированными остатками. Так, наблюдается сдвиг сигнала С2-атома остатка α -D-галактозамина в более сильное поле на 0,6 м. д. [7]. Неизменный сигнал при 98,3 м. д. обычен для С1-атома 2-ацетида-2-дезоксид- α -D-галактозы, если он замещает пиранозный остаток с D-манно-конфигурацией [7] по С3-атому. Учитывая вышесказанное, можно утверждать, что в составе повторяющегося звена полисахарида имеется фрагмент

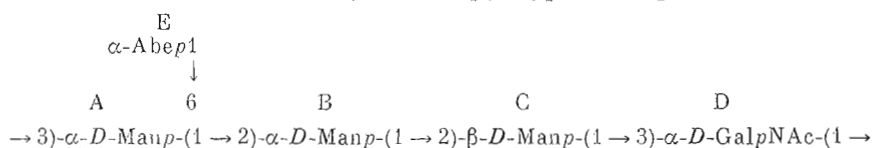


Дальнейший анализ области резонанса аномерных С-атомов с учетом конформационной зависимости аномерных С-атомов в олиго- и полисахаридах [10] позволяет определить последовательность моносахаридных остатков. Рассмотрим два варианта размещения 2-замещенных α - и β -маннопиранозных остатков в повторяющемся звене полисахарида без учета остатка абеквзы:



В варианте В наблюдались бы два сигнала с химическим сдвигом в более высоком поле, чем 99 м. д., тогда как для варианта А мы имеем полное совпадение ожидаемых сигналов с наблюдаемыми в спектре исходного полисахарида.

Таким образом, из анализа спектров ^{13}C -ЯМР полисахарида *Y. pseudotuberculosis* ПС вытекает следующая структура повторяющегося звена:



В таблице приводится отнесение всех сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида, которое не противоречит предложенной структуре и основным закономерностям по влиянию структурных факторов на химические сдвиги ^{13}C в углеводах.

Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 и Whatman 3ММ в системе растворителей *n*-бутанол—пиридин—вода (6 : 4 : 3). Моносахариды обнаруживали щелочным раствором азотнокислого серебра, аминсахара — 0,2% раствором нингидрина в ацетоне.

Оптическое вращение (в воде) измеряли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141, растворы лиофилизировали или упаривали в вакууме при 40° С.

Гель-хроматографию проводили на колонке (3 × 100 см) с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере (рН 4,5).

Газожидкостную хроматографию выполняли на приборе Pye-Unicam-104 с использованием стеклянных колонок (0,4 × 150 см), упакованных фазой QF-1 (3%) на Gas-Chrom Q (100—120 меш). Ацетаты полиолов анализировали в программе температур 175—225° С (5°/мин); ацетаты полиолов и ацетаты частично метилированных метилгликозидов — 135—225° С (5°/мин). Хроматомасс-спектрометрию выполняли на приборе LKB 900s с использованием той же фазы.

Спектры ^{13}C -ЯМР снимали на приборе Bruker-Physics WM-250 (ФРГ) в D₂O при 60° С с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц. В качестве вну-

**Химические сдвиги сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР О-специфического
полисахарида (δ , м.д., от TMS)**

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	NCОСН ₂
A	103,5	71,2	79,6	66,2	72,9	66,2	
B	100,4	80,1	71,2	67,7	73,5	61,7	
C	102,4	76,7	75,1	68,1	77,9	62,2	
D	98,3	50,2	78,2	69,8	72,0	62,2	23,3; 174,9
E	101,5	64,8	34,3	69,5	68,1	16,6	

треннего стандарта использовали метанол (δ 50,15 м. д. относительно тетраметилсилана).

Использовали микроорганизм *Y. pseudotuberculosis*, серовар IIC (штамм 274), любезно предоставленный в наше распоряжение М. Tsubokura (Япония). Выращивание микроорганизма, выделение липополисахарида проводили как описано ранее [11].

Выделение специфического полисахарида и абеквозы. 1 г липополисахарида растворяли в 100 мл 1% уксусной кислоты, нагревали 1,5 ч с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Липид А (379 мг) отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочный раствор упаривали до 20 мл и осаждали пятью объемами этанола. Осадок полисахаридной фракции лиофильно сушили. Выход 350 мг.

Полисахаридную фракцию (350 мг) подвергали гель-хроматографии на сефадексе G-50. Выделили 130 мг специфического полисахарида, $[\alpha]_{576}^{20} +132^\circ$ (с 0,25, H_2O), 100 мг фракции 2 и 70 мг фракции 3 (олигосахарид кора).

Этанольный раствор (210 мг) упаривали и исследовали хроматографией на бумаге. Обнаружили абеквозу и KDO. Препаративной хроматографией выделили 13 мг абеквозы, R_{Rha} 1,15, $[\alpha]_{576}^{20} -5,6^\circ$ (с 1,1, вода).

Кислотный гидролиз. Липополисахарид (10 мг) и полисахариды (5 мг) гидролизовали 0,5 н. трифторуксусной кислотой (0,5 мл, 100°C , 3 ч), упаривали 3 раза с метанолом и гидролизат исследовали с помощью БХ. Часть гидролизата восстанавливали боргидридом натрия (4 ч при комнатной температуре), ацетилировали и ацетаты полиолов исследовали с помощью газожидкостной хроматографии.

Частичный гидролиз. Полисахарид (52 мг) растворяли в 5 мл 1% уксусной кислоты и гидролизовали 5 ч на кипящей водяной бане, раствор упаривали, осаждали пятью объемами этанола. В этанольном растворе обнаруживали абеквозу (6,8 мг). Полисахаридную фракцию хроматографировали на сефадексе G-50, выделяли две фракции по 20 мг.

Периодатное окисление. Специфический полисахарид (100 мг) растворяли в 5 мл 0,1 н. NaIO_4 , выдерживали 65 ч в темноте при комнатной температуре, прибавляли 100 мг боргидрида натрия, выдерживали 4 ч, избыток боргидрида разрушали уксусной кислотой, диализовали, лиофильно сушили. Выход 64 мг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hellerqvist C. G., Lindberg B., Samuelsson K., Brubaker R. R. // Acta chem. scand. 1972. V. 26. № 4. P. 1389—1393.
2. Hellerqvist C. G., Lindberg B., Samuelsson K., Brubaker R. R. // Acta chem. scand. 1972. V. 26. № 4. P. 1394—1398.
3. Tsubokura M., Otsuki K., Kawaoka Y., Fukushima H., Ikemura K., Kanazawa Y. // Cur. Microbiol. 1984. V. 11. № 1. P. 89—91.
4. Fouquey C., Lederer E., Lüderitz O., Polonsky J., Staub A. M., Stirn S., Tinelly R., Westphal O. // C. r. Acad. sci. 1958. V. 246. P. 2417—2420.
5. Edwards M. P., Ley S. V., Lister S. G., Palmer B. D. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1983. № 11. P. 630—633.
6. Bundle D. R., Josephson S. // Can. J. Chem. 1978. V. 56. № 20. P. 2686—2690.
7. Шапков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1495—1506.
8. Doddrell D. M., Pegg D. D., Bendal M. P. // J. Org. Res. 1982. V. 48. № 3. P. 323—327.

9. Шапков А. С., Чижов О. С. // Биоорг. химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437—497.
10. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. P. 173—185.
11. 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
26.II.1990

R. P. GORSHKOVA, V. V. ISAKOV, L. S. SHEVCHENKO, Yu. S. OVODOV
THE STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN
OF THE LIPOPOLYSACCHARIDE *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*
SEROVAR II C

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

An O-specific polysaccharide has been isolated on mild acid hydrolysis of lipopolysaccharide from *Yersinia pseudotuberculosis* serovar IIc and shown to consist of abequose, *D*-mannose and 2-acetamido-2-deoxy-*D*-galactose residues in the ratio 0.8 : 3 : 1. From the results of acid hydrolysis, ¹³C NMR, methylation and periodate oxidation studies the structure of the repeating unit of the O-specific polysaccharide is deduced as follows:

