



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 20 \* № 11 \* 1994

УДК 547.114.5:579.842.23

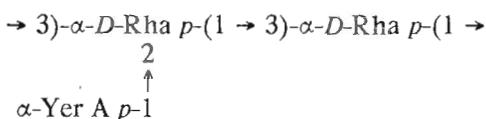
© 1994 Р. П. Горшкова, В. В. Исаков, В. А. Зубков,  
Ю. С. Оводов

## СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Yersinia bercoivieri* O:19

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

**Ключевые слова:** липополисахарид *Yersinia bercovieri*; полисахариды О-специфические, структура.

Выделен и охарактеризован О-специфический полисахарид из *Yersinia bercoivierei* серовара 0 : 10. На основании данных метилирования, распада по Смиту, спектроскопии  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР предложена структура трисахаридного повторяющегося звена О-специфического полисахарида:



Штаммы *Yersinia enterocolitica* биогруппы 3A и 3B, впервые описанные в 1978 г. [1], были отнесены позднее [2] на основании биохимической и серологической характеристики и ДНК-ДНК-гибридизации к двум новым видам иерсиний: *Y. mollaretii* и *Y. bercovieri* — вместо биогрупп 3A и 3B соответственно.

Настоящая работа является продолжением систематического изучения строения О-специфических полисахаридов рода *Yersinia* и содержит данные по структурному исследованию полисахаридной цепи липополисахарида *Y. bercovieri* серовара 0 : 10 (штамм WA 315).

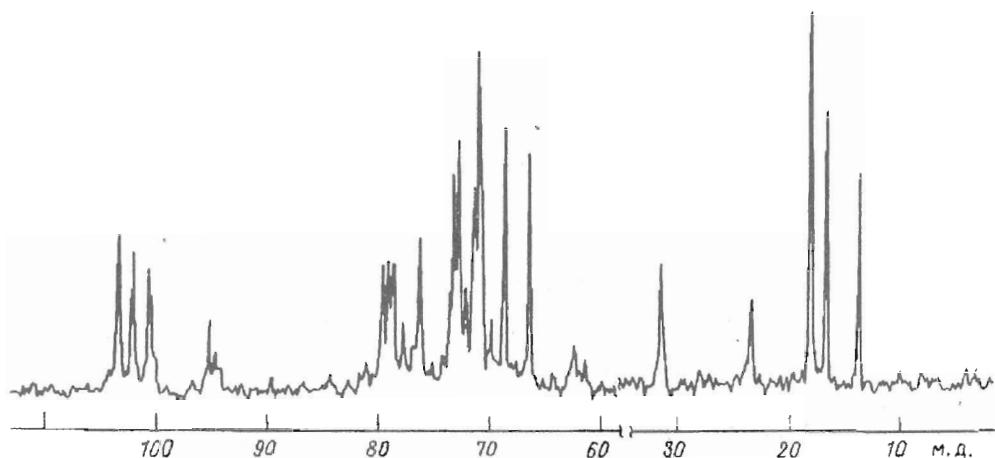
Липополисахарид (ЛПС) выделяли из ацетонового порошка фенол-водной экстракцией, нуклеиновые кислоты удаляли осаждением 50% трихлоруксусной кислотой. Выход ЛПС составлял 4,6%.

ЛПС обладает серологической активностью, дает одну полосу преципитации при двойной диффузии в агаре и перекрестно реагирует с антисывороткой *Y. bercovier* серовара 0 : 58,16 (штамм CNY 7506).

В гидролизате ЛПС с помощью БХ и ГЖХ идентифицированы иерсиниоза, рамноза, галактоза, глюкоза, *L*-глициро-*D*-манно-гептоза и глюказамин в соотношении 1,5 : 2,5 : 1,4 : 4,2 : 1,4 : 1.

При уксуснокислотном гидролизе ЛПС разрушался, липид А выпадал в осадок (выход 15%). Полосахаридную фракцию осаждали этанолом. В этанольном

Сокращения: YerA — иерсиниоза A (3,6-дидезокси-4-C-(L-глициро-1-гидроксиэтил)-D-ксило-гексоза).



Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР специфического полисахарида из липополисахарида *Y. bercoiviry* серовара 0 : 10

растворе с помощью БХ и ГЖХ обнаружили иерсиниозу и кетодезоксиоктоновую кислоту. Иерсиниоза выделена препаративной БХ и очищена ВЭЖХ на колонке с Silasorb SPH C<sub>18</sub> (LC),  $[\alpha]_D +6,3^\circ$  (с 0,5, вода). Масс-спектры ацетатов полиола и метилгликозида иерсиниозы идентичны масс-спектрам соответствующих производных выделенных ранее иерсиниоз [3, 4]. По времени удерживания при ГЖХ ацетат полиола совпадает с ацетатом полиола иерсиниозы А, выделенной из ЛПС *Y. pseudotuberculosis* серовара VI [3].

В спектре  $^1\text{H}$ -ЯМР полученной иерсиниозы А преобладают сигналы  $\beta$ -пиранозной формы: аномерного протона (4,71 м. д., д,  $J_{1,2} 8,2$  Гц), протонов дезоксизвена ( $\text{H-3a}$  при 1,70 м. д., дд,  $J_{3a,3e} 13,3$  Гц,  $J_{3a,2} 11,6$  Гц;  $\text{H-3e}$  при 2,09 м. д., дд,  $J_{3e,2} 5,2$  Гц) и двух метильных групп ( $\text{H-6}$  при 1,22 м. д., 3Н, д,  $J_{5,6} 6,7$  Гц;  $\text{H-2}'$  при 1,24 м. д., 3Н, д,  $J_{1',2'} 6,5$  Гц).

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр иерсиниозы А содержит сигналы аномерных атомов углерода при 91,7 и 98,7 м. д. (для  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномерных форм соответственно) в соотношении 1 : 3, сигналы дезоксизвена при 29,9 и 35,9 м. д. (C3 $\alpha$  и C3 $\beta$  соответственно), двух метильных групп при 15,9; 16,4; 13,4 и 13,8 м. д. (C2' $\alpha$ , C2' $\beta$ , C6 $\alpha$  и C6 $\beta$  соответственно), а также еще 8 сигналов в области 66,4—75,5 м. д., относящихся к атомам, связанным с кислородом (C2, C4, C5 и C1'). Сигналы для C4 $\alpha$  и C4 $\beta$  (75,5 и 75,8 м. д.) были идентифицированы с помощью метода неселективного переноса поляризации [5].

Таким образом, по данным ЯМР-спектроскопии, в выделенном нами образце иерсиниозы А присутствует преимущественно пиранозная форма, полученный образец полностью идентичен заведомым образцам природной и синтетической [6] иерсиниозы А и, следовательно, в углеводную цепь липополисахарида входят остатки иерсиниозы А, представляющей собой 3,6-дидезокси-4-C-(*L*-глициро-1-гидроксиятил)-*D*-ксило-гексозу.

При гель-фильтрации полисахаридной фракции на сепадекс G-50 сразу за свободным объемом выходит резервный глюкан,  $[\alpha]_D +180^\circ$  (с 0,5, вода), в гидролизате которого с помощью БХ и ГЖХ идентифицирована только глюкоза. В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР этого полисахарида наблюдаются шесть сигналов с химическими сдвигами 100,4; 78,0; 74,0; 72,3; 72,0 и 61,3 м. д., значения которых характерны для  $\alpha$ -1,4-связанного глюкана [7].

Второй фракцией выходит специфический полисахарид с примесью глюкана и коры, третья фракция представляет собой олигосахарид коры, в гидролизате которого идентифицированы рамноза, иерсиниоза, галактоза, глюкоза, *D*- и *L*-глициро-*D*-манно-гептоза и глюказамин в соотношении 1,6 : 1,6 : 1,2 : 2,7 : 0,3 :

<sup>13</sup>C-ЯМР-спектр полисахарида ( $\delta$ , м. д.)

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1'	C2'
-3D Rha $\rho\alpha 1-$	103,4	71,3	79,0	73,2	70,8	18,0		
-2,3D Rha $\rho\alpha 1-$	102,0	79,5	78,5	72,9	70,8	18,0		
YerA $\rho\alpha 1-$	100,5	66,3	31,4	76,2	68,5	13,7	72,6*	16,6

\* Отнесение сигналов в спектре полисахарида проведено на основании литературных данных [10, 14] в соответствии с общими закономерностями расшифровки <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров.

3,2 : 1,0 соответственно. При этом содержание *D*-глициро-*D*-манно-гептозы было значительно ниже, чем во всех изученных нами ранее видах *Yersinia* [8, 9].

Специфический полисахарид после дополнительной очистки хроматографией на TSK-50 и TSK-40 имел  $[\alpha]_D +104,0^\circ$  (с 0,4, вода), однако выделить его полностью свободным от примеси олигосахарида кора не удалось. В гидролизате специфического полисахарида идентифицированы рамноза и иерсиниоза в соотношении 2,5 : 1 с незначительной примесью глюкозы, гептозы и глюказамина. Из гидролизата ЛПС с помощью препаративной БХ выделили рамнозу, которую превратили в  $\alpha$ -метилрамнопиранозид и очистили с помощью ВЭЖХ. Его оптическое удельное вращение —  $[\alpha]_D +60,0^\circ$  (с 0,2, вода) — указывает на *D*-конфигурацию остатка рамнозы в полисахариде.

В спектре <sup>1</sup>H-ЯМР полисахарида наблюдаются три сигнала аномерных протонов при 4,96; 5,05 и 5,22 м. д. с КССВ  $J_{1,2}$  3 Гц и четыре дублетных сигнала метильных групп при 1,05; 1,13; 1,25 и 1,28 м. д. с КССВ 6 Гц. Кроме того, в спектре присутствуют сигналы дезоксизвена в пиранозном цикле с центром при 1,85 м. д. В спектре <sup>13</sup>C-ЯМР полисахарида (рисунок, таблица) наблюдаются три сигнала аномерных атомов углерода при 103,4; 102,0 и 100,5 м. д. с КССВ  $^1J_{C,H}$  170 Гц, сигналы метильных групп при 13,7; 16,6 и 18,0 (двойной) м. д. и дезоксизвена при 31,4 м. д. Эти данные указывают на то, что полисахарид имеет трисахаридное повторяющееся звено, в состав которого входят один остаток иерсиниозы и два остатка рамнозы, причем все моносахаридные остатки соединены  $\alpha$ -гликозидными связями [7].

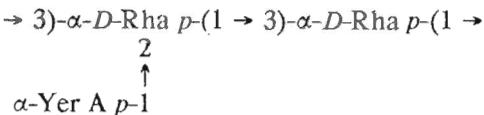
Расчет с учетом данных метилирования и эффектов гликозилирования [10] показывает, что сигналы при 103,4 и 102,0 м. д. относятся к аномерным атомам углерода остатков *D*-рамнозы. Величина химического сдвига C1-атома иерсиниозы (100,5 м. д.) подтверждает ее *D*-конфигурацию, так как в случае *L*-конфигурации величина химического сдвига C1-атома должна составлять около 97 м. д. [10]. Сигналы в спектре полисахарида в области 94—97 и 23,5 м. д. характерны для С-атомов 2-ацетамило-2-дезоксиглюкозы, входящей в состав кора, от примеси которой полностью освободиться не удалось.

При обработке периодатом иерсиниоза окисляется до 3,6-дидезокси-*D*-эритро-гексоз-4-улопиранозы; дальнейшее восстановление боргидридом натрия приводит к паратозе [11]. В гидролизате модифицированного по методу Смита полисахарида с помощью БХ и ГЖХ сравнением с заведомыми образцами идентифицировали рамнозу и паратозу ( $R_{Rha}$  1,38). В <sup>13</sup>C-ЯМР-спектре модифицированного полисахарида исчезает сигнал при 13,7 м. д., а сигнал дезоксизвена при C3 смещается в слабое поле на 4,2 м. д., что характерно для  $\alpha$ -паратозы [11]. Сигналы, относящиеся к остаткам рамнозы, не изменяются, что однозначно указывает на то, что один из остатков рамнозы замещен в положение 3, а другой является точкой разветвления.

Порядок замещения моносахаридных остатков в полисахаридной цепи установлен на основании данных метилирования ЛПС и полисахарида. Метилирование проводили по методу Хакомори [12]. Частично метилированные моносахариды анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией в виде ацетатов полиолов. В результате

в гидролизате метилированного ЛПС идентифицировали сполна метилированную иерсиниозу, 2,4-ди-О-метилрамнозу и 4-О-метилрамнозу в соотношении 1 : 1 : 1 наряду с другими метилированными моносахаридами, относящимися к олигосахариду кора и липиду А. В гидролизате специфического полисахарида соотношение сполна метилированной иерсиниозы, 2,4-ди-О-метилрамнозы и 4-О-метилрамнозы составляет 1 : 1,9 : 1, что указывает на частичное отщепление детерминантной иерсиниозы при уксуснокислотном гидролизе и на присоединение ее к 1,3-связанной рамнозе в положение 2. Из приведенных данных следует, что полисахарид разветвлен: основная цепь построена из двух остатков 1,3-связанной D-рамнозы, при этом к одному из них в положение 2 присоединяется остаток терминальной иерсиниозы А.

Таким образом, на основании данных метилирования, периодического окисления, <sup>1</sup>Н- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии для повторяющегося звена специфического полисахарида *Y. bercovieri* серовара 0 : 10 предложена следующая структура:



### Экспериментальная часть

<sup>1</sup>Н- и <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker WM-250 при 60° С, в качестве внутреннего стандарта использовали метанол ( $\sigma$  50,15 м. д.).

Аналитическую и препаративную хроматографию, измерение оптического вращения, гель-хроматографию, ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрию, полный кислотный гидролиз ЛПС и полисахарида, метилирование, наработку микробной массы, выделение ЛПС, получение сывороток выполняли, как описано ранее [13].

Использовали следующие микроорганизмы: *Y. bercovieri* серовара 0 : 10 (штамм WA 315), выделенный из сырых овощей, и *Y. bercovieri* серовара 0 : 58,16 (штамм CNY 7506), полученный из человеческого организма. Штаммы микроорганизмов были любезно предоставлены в наше распоряжение проф. Г. Уотерсон (Бельгия).

*Выделение специфического полисахарида и иерсиниозы.* 1 г ЛПС растворяли в 100 мл 1% уксусной кислоты, нагревали 2 ч с обратным холодильником на кипящей водяной бане. Липид А (150 мг) отделяли центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин.

Надосадочный раствор упаривали до 20 мл и осаждали пятью объемами этанола. Этанольный раствор (130 мг) упаривали, препартивной БХ выделяли иерсиниозу (38 мг), которую очищали ВЭЖХ (12 мг),  $R_{\text{Rha}}$  1,18,  $[\alpha]_D +6,3^\circ$  ( $c$  0,5, вода).

Осадок полисахаридной фракции лиофильно сушили (выход смеси полисахаридов 600 мг). Полученную смесь полисахаридов (500 мг) подвергали гель-хроматографии на сепадексе G-50. Выделяли 32 мг глюкана, 220 мг второй фракции, представляющей смесь специфического полисахарида и кора, и 50 мг третьей фракции — олигосахарида кора.

210 мг второй фракции делили на колонке с Fractogel TSK HW 50 (S) в воде, выделяли 180 мг специфического полисахарида.

*Выделение рамнозы.* 200 мг ЛПС нагревали с 0,25 М трифтормукусной кислотой (2 мл, 100° С, 30 мин), упаривали 3 раза с метанолом, растворяли в воде и осаждали этанолом. Этанольный раствор (170 мг) делили препартивной БХ, выделяли рамнозу (18 мг), которую метанолизом 1 н. хлористым водородом в метаноле (1 мл, 100° С, 1 ч) превращали в метил- $\alpha$ -D-рамнопиранозид и очищали ВЭЖХ,  $[\alpha]_D +60^\circ$  ( $c$  0,2, вода).

*Распад по Смиту.* 90 мг полисахаридной фракции растворяли в 5 мл 0,1 М NaIO<sub>4</sub>, выдерживали 74 ч в темноте при комнатной температуре, добавляли

100 мг боргидрида натрия, выдерживали 4 ч, избыток боргидрида натрия разрушали уксусной кислотой, смесь диализовали против дистиллированной воды, раствор подвергали лиофилизации, остаток гидролизовали 1% уксусной кислотой (10 мл, 100° С, 2 ч). Гидролизат восстанавливали и делили на колонке с TSK-40, выделяли 32 мг первой фракции модифицированного полисахарида  $[\alpha]_D +120^\circ$  (с 1,0, вода).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bercovier H., Brault J., Barre N., Treignier M., Alonso J. M., Mollaret H. H.//Curr. Microbiol. 1978. V. 1. P. 353—357.
2. Wauters G., Janssens M., Steigerwalt A. G., Brenner D. J.//Int. J. Syst. Bacteriol. 1988. V. 38. № 4. P. 427—429.
3. Gorshkova R. P., Zubkov V. A., Isakov V. V., Ovodov Yu. S.//Carbohydr. Res. 1984. V. 126. P. 308—311.
4. Горшкова Р. П., Зубков В. А., Исаков В. В., Оводов Ю. С.//Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1146—1147.
5. Doddrell D. M., Pegg G. T., Bendal M. R.//J. Magn. Reson. 1982. V. 48. P. 323—327.
6. Zubkov V. A., Gorshkova R. P., Ovodov Yu. S., Sviridov A. F., Shashkov A. S.//Carbohydr. Res. 1992. V. 225. P. 189—207.
7. Dutton G. G. S., Folkman T. E.//Carbohydr. Res. 1980. V. 80. P. 147—161.
8. Оводов Ю. С., Горшкова Р. П.//Химия природн. соедин. 1988. N 2. C. 163—171.
9. Ovodov Yu. S., Gorshkova R. P., Tomshich S. V., Komandrova N. A., Zubkov V. A., Kalmykova E. N., Isakov V. V.//J. Carbohydr. Chem. 1992. V. 11. № 1. P. 21—35.
10. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K.//Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59—75.
11. Bock K., Pedersen C.//Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 27—65.
12. Hakomori S.//J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. P. 205—207.
13. Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S.//Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 3. P. 527—531.
14. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Кисянчук Н. В., Захарова И. Я.//Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1851—1857.

Поступила в редакцию  
6.VII.1993

После доработки  
25.II.1994

R. P. Gorshkova, V. V. Isakov, V. A. Zubkov, Yu. S. Ovodov

#### STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE OF LIPOPOLYSACCHARIDE FROM *Yersinia bercovieri* 0 : 10

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok

O-specific polysaccharide composed of D-rhamnose and 3,6-dideoxy-4-C-(L-glycero-1-hydroxyethyl)-D-xylo-hexopyranose (yersinirose A) residues was obtained on mild acid degradation of the *Yersinia bercovieri* lipopolysaccharide. On the basis of <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data, methylation studies and Smith degradation, the following structure was suggested for the polysaccharide repeating unit:

