



УДК 577.114.5:543.422.23:579.842.15

СТРОЕНИЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA DYSENTERIAE*, ТИП 7

*Книрель Ю. А., Данишин В. М., Шапков А. С.,
Дмитриев В. А., Кочетков Н. Б., Гофман И. Л.**

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

** Институт эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР, Москва*

Ранее было установлено строение О-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов 9 из 10 серологических типов бактерий *Shigella dysenteriae* [1]. В составе полисахарида типа 7 были обнаружены *D*-глюкозамин, *D*-галактозаминуроовая кислота и глицин [2], однако структура полимера не была определена. В настоящем сообщении приведены данные по установлению полного состава и строения повторяющегося звена этого полисахарида.

Полисахарид был получен как описано ранее [2]. Его гидролиз (2M HCl, 100° С, 2 ч) привел наряду с олигомерами к трем моносахаридам (I) — (III), которые были выделены препаративной хроматографией на бумаге. При более продолжительном гидролизе соединений (II) и (III) образовались глицин и аминоксахар (I), который по времени удерживания при анализе на аминокислотном анализаторе совпадал с 4-амино-4,6-дидезокси-

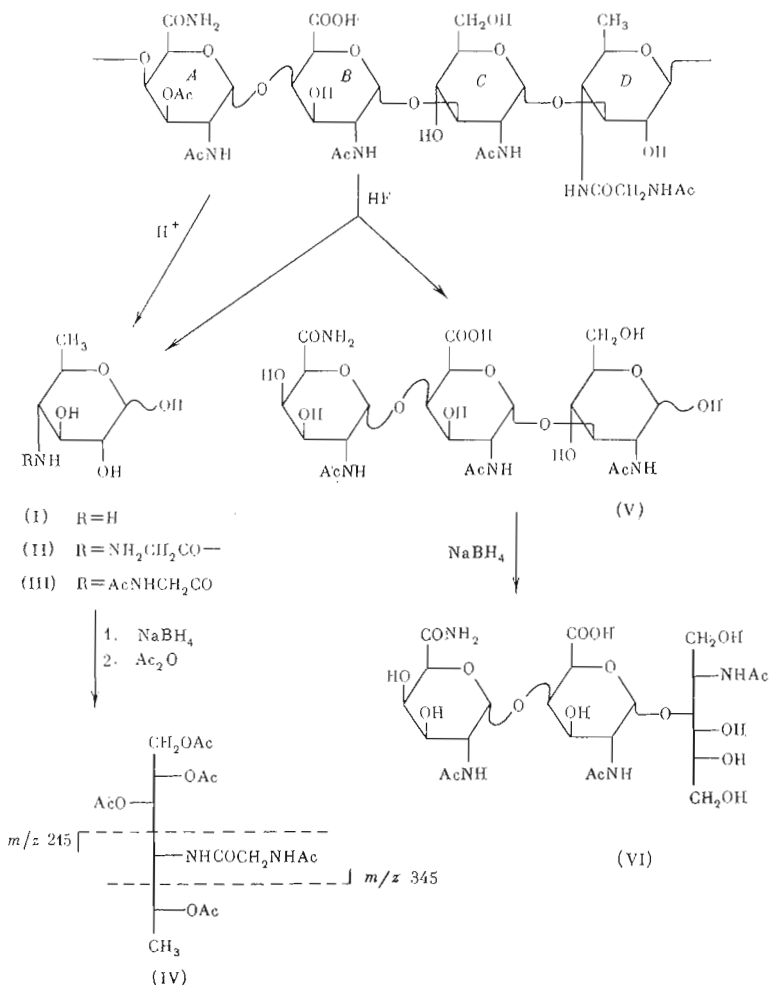
Химические сдвиги в ¹³C-ЯМР-спектрах (м. д.) *

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Звено А						
Интактный ПС	99,9	48,9	71,9	76,7	72,1	
Деацетилированный ПС	100,2	51,2	69,8	79,7	72,8	
Олигосахарид (V)	100,0	50,5	68,7	70,0	72,7	
(VI)	99,9	50,5	68,2	69,9	72,7	
Звено В						
Интактный ПС	99,9	50,9	67,9	78,4	72,1	
Деацетилированный ПС	99,9	50,9	68,3	78,2	72,4	
Олигосахарид (V)	99,2	50,5	68,0	79,6	72,5	
(VI)	99,8	50,6	67,2	78,6	71,7	
Звено С						
Интактный ПС	97,9	53,3	79,4	71,9	72,7	61,4
Деацетилированный ПС	97,7	53,3	79,7	72,1	72,8	61,4
Олигосахарид (V) α	92,1	53,8	79,2	72,3	72,7	61,6
β	96,1	56,5	80,7	72,2	77,0	61,7
(VI)	61,8	55,0	78,0	71,1	71,5	64,0
Звено D						
Интактный ПС	104,7	74,0	80,0	57,8	71,9	17,7
Деацетилированный ПС	104,9	74,2	80,1	57,8	72,1	17,7
Моносахарид (II) α	93,1	73,2	71,7	58,2	67,3	18,0
β	96,8	75,9	74,5	58,1	71,7	18,0

* Химические сдвиги сигналов $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{COO}$ 21,4, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CON}$ 22,9—23,6, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$, COOH , CONH_2 и C1 остатка глицина 172,3—176,1 м. д., C2 остатка глицина 41,8 (в спектре моносахарида (II)) или 44,1 м. д. (в спектрах полисахаридов).

Отнесение сигналов, для которых разница между химическими сдвигами не превышает 0,5 м. д., может быть обратным. ПС — полисахарид.

глюкозой. В масс-спектре ацелированного альдитола (IV), полученного из моносахарида (II), присутствовали пики ионов с m/z 345 и 215, относящихся к фрагментам C1-C4 и C4-C6 соответственно и указывающих на присутствие дезоксиэвена при C6 и (N-ацетилглицил)амидогруппы в положении 4. По данным ^{13}C -ЯМР-спектра (таблица), моносахарид (II) является 6-дезоксаминосахаром, несущим остаток глицина; моносахарид (III) содержит дополнительно N-ацетильную группу, очевидно замещающую аминогруппу глицина. Константы спин-спинового взаимодействия $J_{2,3}$ 9,5, $J_{3,4}$ 9,5 и $J_{4,5}$ 10 Гц, определенные из ^1H -ЯМР-спектров, доказывали *глико*-конфигурацию аминосугаров (I)-(III), а на основании удельного оптического вращения соединения (II), $[\alpha]_D^{20} +125^\circ \text{C}$ (с 0,4, вода), они были отнесены к *D*-ряду. Полученные данные свидетельствуют о том, что в состав полисахарида *S. dysenteriae*, тип 7, входит 4-(N-ацетилглицил)амидо-4,6-дидезокси-*D*-глюкоза (III), а моносахариды (I) и (II) образуются из нее в ходе кислотного гидролиза. Ранее аминосугара с остатком глицина в качестве N-ацильного заместителя в природе известны не были.



При сольволизе полисахарида HF (20° С, 3 ч) образовались моносахарид (III) и трисахарид (V), который был выделен гелем-фильтрацией на TSK HW 40, очищен ионообменной хроматографией на анионите DEAE-Trisacryl M и восстановлен NaBH₄ в олигосахарид (IV). При гидролизе трисахарид (V) были идентифицированы с помощью аминокислотного анализатора глюкозамин и галактозаминуриновая кислота, отнесение которых к *D*-ряду было сделано ранее [2]. ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры олигосахарид (VI) были расшифрованы с помощью селективного гомо- и гетеро-

ядерного $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ двойного резонанса. На основании констант спин-спинового взаимодействия $J_{1,2}$ 3,7, $J_{2,3}$ 11, $J_{3,4}$ 3, $J_{4,5}$ 0,8 Гц было найдено, что оба входящих в него пиранозидных остатка (звенья А и В) — производные галактозаминуровой кислоты, присоединенные α -гликозидными связями; следовательно, агликоном в нем является остаток глюкозаминитола (звено С); из спектров также вытекало, что все аминоксахара присутствуют в форме N-ацетильных производных. Ядерные эффекты Оверхаузера, возникающие при облучении протонов Н1 звеньев А и В в олигосахариде (VI), показали, что звено В замещено в положение 4, а звено С — в положение 3 [3]. Химический сдвиг сигнала Н5 звена В показывал выраженную зависимость от рН водного раствора, изменяясь от 4,40 м.д. при рН 5 до 4,63 м.д. при рН 1, в то время как Н5 звена А резонировал при 4,86 м.д. независимо от рН. Это указывает на то, что карбоксильная группа в звене А замещена; наиболее вероятно, судя по отсутствию в ^{13}C -ЯМР-спектре каких-либо дополнительных углеродных сигналов, оно представляет собой первичный амид галактозаминуровой кислоты (N-ацетилгалактозаминуронамид был идентифицирован ранее в O-специфических полисахаридах *Pseudomonas aeruginosa* О4 [4]). Этот вывод подтвержден определением молекулярной массы, M_r 656, олигомера (VI) методом масс-спектрометрии при ионизации бомбардировкой ускоренными атомами. Таким образом, олигосахариды (V) и (VI) имеют строение, приведенное на схеме.

^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (таблица) показал, что он построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, включающих остатки аминоксахара (III) и трех компонентов трисахарид (V), а также O-ацетильную группу. Деацетилирование полисахарида действием 3% водного Et_3N (20° С, 16 ч) привело к удалению этой группы, а в результате ацетилирования по методу [5] был получен сполна ацетилированный полисахарид.

Как видно из сравнительного анализа ^{13}C -ЯМР-спектров O-деацетилированного полисахарида, моносахарида (II) и олигосахаридов (V) и (VI) (таблица), сигнал при 53,3 м. д. в спектре полисахарида относится к С2 N-ацетилглюкозамина (звено С), а сигнал при 57,8 м. д. — к С4 4-(N-ацетилглицил)амидо-4,6-дидезоксиглюкозы (звено D). Следовательно, первый из этих двух моносахаридов присоединен α -гликозидной связью [6] и ему принадлежит сигнал С1 при 97,9 м. д., а второму моносахариду принадлежит сигнал С1 при 104,9 м. д., отвечающий β -конфигурации его гликозидной связи. Этот вывод подтвержден определением констант спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 161,8 Гц для сигнала С1 необычного аминоксахара при 104,9 м. д. и 172–175 Гц для сигналов С1 остальных трех моносахаридов [7].

Сравнение ^{13}C -ЯМР-спектров сполна ацетилированного и деацетилированного полисахаридов показало, что за счет β -эффектов ацетилирования [8] происходит смещение в сильное поле сигналов всех неаномерных углеродных атомов, участвующих в образовании гликозидных связей, из области 78–80 м. д. в область 74–76 м. д.; следовательно, в полисахариде отсутствуют дизамещенные аминоксахара и он является линейным. За счет β -эффекта ацетилирования наблюдается также смещение сигналов С2 обоих производных галактозаминуровой кислоты от 51 к 48,5 м. д. и С1 производного 4-амино-4,6-дидезоксиглюкозы от 104,9 к 101,7 м. д., тогда как положенные сигналы С4 этого аминоксахара при 57,8 м. д. и С2 N-ацетилглюкозамина при 53,3 м. д. практически не изменялось. Из этих данных следует, что производные галактозаминуровой кислоты замещены в положение 4, а два других аминоксахара — в положение 3. После этого становится возможным отнесение остальных сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектре деацетилированного полисахарида (таблица).

Сопоставление этого спектра со спектром исходного полисахарида показывает, что заметно смещению за счет α - и β -эффектов ацетилирования [8] подвергаются сигналы С2, С3 и С4 звена А (от 51,2; 69,8 и 79,7 к 48,9; 71,9 и 76,7 м. д. соответственно), что позволяет локализовать O-ацетильную группу в положении 3 этого остатка.

Таким образом, O-специфический полисахарид *S. dysenteriae*, тип 7, имеет строение, приведенное на схеме. Сходный дисахаридный фрагмент,

включающий два производных *D*-галактозаминуроной кислоты, присутствует в *O*-специфических полисахаридах *P. aeruginosa* O4 [4], что позволяет обосновать на молекулярном уровне известную перекрестную серологическую реактивность [9] между штаммами этих двух отдаленных в таксономическом отношении видов бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев В. А., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 245. № 3. С. 765–768.
2. Дмитриев В. А., Дашунин В. М., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. // Биоорганич. химия. 1979. Т. 5. № 1. С. 77–82.
3. Keller R. M., Wüthrich K. // Biol. Magn. Reson. 1981. V. 3. P. 1–52.
4. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 3. P. 541–550.
5. Hoffman J., Lindberg B., Svensson S. // Acta. chem. scand. 1972. V. 26. № 2. P. 661–666.
6. Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. // Биоорганич. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1495–1506.
7. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
8. Gagnaire D., Mancier D., Vincendon M. // Org. Magn. Reson. 1978. V. 11. № 7. P. 344–349.
9. Lányi B., Vörös S., Adam M. M. // Acta microbiol. Acad. sci. hung. 1973. V. 20. P. 249–254.

Поступило в редакцию
26.I.1987

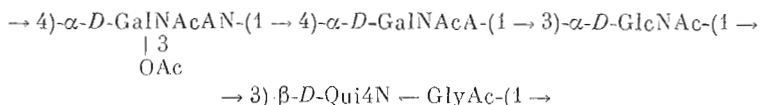
THE STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *SHIGELLA DYSENTERIAE* TYPE 7 LIPOPOLYSACCHARIDE

KNIREL Y. A., DASHUNIN V. M., SHASHKOV A. S., DMITRIEV B. A.,
KOCHETKOV N. K., HOFMAN I. L.*

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

**Institute of Epidemiology and Microbiology,
Health Ministry of the USSR, Moscow*

The structure of the *O*-specific polysaccharide chain of the *Shigella dysenteriae* type 7 lipopolysaccharide has been established mainly by ¹³C NMR analysis of the intact and modified (acetylated and de-*O*-acetylated) polymers, as well as of products of its solvolysis with anhydrous hydrogen fluoride. The polysaccharide contains two unusual sugar derivatives, *N*-acetyl-*D*-galactosaminuronamide and 4-(*N*-acetylglycyl)amido-4,6-dideoxy-*D*-glucose (GalNAcAN and Qui4N←GlyAc, respectively) and is built up of tetrasaccharide repeating units of the following structure:



Serological cross-reaction of *S. dysenteriae* type 7 and *Pseudomonas aeruginosa* O4 (Lányi) is accounted for by the similarity of their *O*-specific polysaccharides.

Правила для авторов см. в № 2, 6 — 1987 г.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20.04.87 Подписано к печати 04.06.87 Т.06197 Формат бумаги 70×108^{1/8}
Высокая печать Усл. печ. л. 12,6 Усл. кр.-отг. 12,0 тыс. Уч.-изд. л. 14,6 Бум. л. 4,5
Тираж 933 экз. Зак. 382

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21

2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6