



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Том 19 * № 11 * 1993

УДК 577.114.5.088:579.842.17

© 1993 г. Е. В. Виноградов, Ю. А. Книрель, Н. К. Кочетков,
И. Радзиевска-Лебрехт *, В. Каца *

СТРУКТУРНОЕ ИЗУЧЕНИЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Proteus mirabilis* O28 и 3/6, СОДЕРЖАЩИХ АМИДЫ D-ГАЛАКТУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ С L-АМИНОКИСЛОТАМИ; С-МЕТИЛИРОВАНИЕ И β-ЭЛИМИНИРОВАНИЕ В ОСТАТКАХ L-СЕРИНА И L-ТРЕОНИНА ПРИ АНАЛИЗЕ МЕТОДОМ МЕТИЛИРОВАНИЯ

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;

* Институт микробиологии и иммунологии, Лодзинский университет, Лодзь

Ключевые слова: *Proteus mirabilis*, полисахариды О-специфические, амиды уроновых кислот, аминокислоты, метилирование.

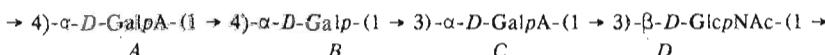
Среди О-антителенов энтеробактерий *Proteus* известны полисахариды, содержащие *L*-лизин [1—5] и *L*-аланин [4—6], присоединенные через аминогруппу к карбоксильной группе *D*-глюкуроновой [4, 5] или *D*-галактуроновой кислоты [1—6]. В настоящей работе приведены данные по структурному изучению О-антителенов *Proteus mirabilis* O28 и 3/6 *, содержащих амиды *D*-галактуроновой кислоты с *L*-серином и *L*-тронином.

О-Специфические полисахариды были получены мягкой кислотной деградацией липополисахаридов, выделенных экстракцией водным фенолом [7], как описано ранее [3].

Гидролиз полисахарида *P. mirabilis* O28 (2 М CF_3COOH , 121° С, 2 ч) привел к *D*-галактозе, *D*-галактуроновой кислоте, 2-амино-2-дезокси-*D*-глюкозе, *L*-серину и *L*-лизину, которые были идентифицированы с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов и ГЖХ ацетилированных (*R*)-2-бутилгликозидов [8, 9] и (*R*)-2-бутиловых эфиров аминокислот.

Анализ ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида показал, что обе аминокислоты присоединены через α -аминогруппу по карбоксильной группе остатков галактуроновой кислоты (присутствовали сигналы свободных карбоксильных групп остатков серина и лизина при 178,0 и 177,6 м.д. и амидированных карбоксильных групп остатков галактуроновой кислоты при 170,1 и 171,0 м.д.—ср. лит. данные [5]).

Бездеструктивный анализ полисахарида методами ЯМР-спектроскопии, включая одностороннюю ЯЭО-спектроскопию и двумерную корреляционную ^1H , ^1H и ^{13}C , ^1H -спектроскопию COSY, позволил установить следующую структуру углеводной цепи О-антителена:



*Мутантный штамм, полученный из *P. mirabilis* O3 переносом транспозона Tn5phoA.

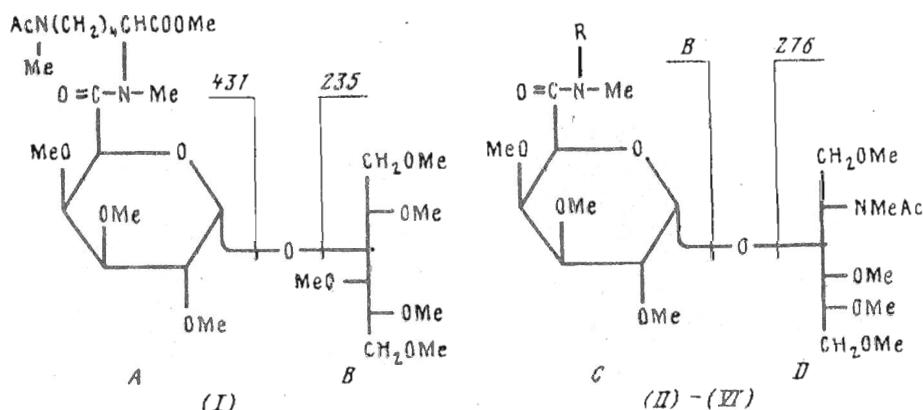
Характерные ионы в масс-спектрах электронного удара метилированных производных (II—XI)

Соединение	R	<i>m/z</i> ионов	
		[M + H] ⁺	B
(II)	MeOOCCHCH ₂ OMe	641	348
(III)	MeOOCMeCH ₂ OMe	655	362
(IV)	MeOOCC=CH ₂	609	316
(V)	MeOOCC=CHMe	623	330
(VI)	MeOOCC=CMe ₂	637	344
(VII)	MeOOCMeCM ₂ OMe	683	390
(VIII)	MeOOCC=CMe ₂	637	344
(IX)	MeOOCC=CHMe	623	330
(X)	Me	539	246
(XI)	H	525	232

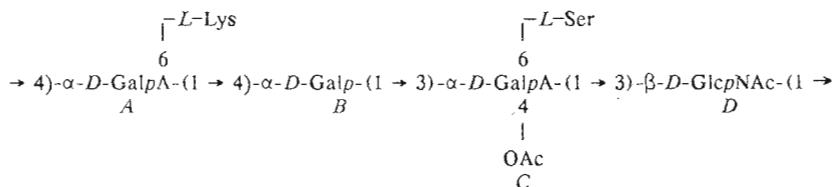
и определить локализацию О-ацетильной группы в положении 4 звена С.

Для установления мест присоединения аминокислот полисахарид ацетилировали по ε-аминогруппам остатков лизина и подвергали частичному гидролизу (0,1 М HCl, 100° С, 16 ч) с последующим боргидридным восстановлением и метилированием MeI в диметилсульфоксиде в присутствии твердой NaOH [10]. Полученную смесь олигосахаридов анализировали методом ГЖХ/масс-спектрометрии с использованием химической ионизации и электронного удара.

В результате в качестве единственного лизинсодержащего продукта был идентифицирован гликозид (I), соответствующий фрагменту A—B. Вместо ожидаемого серинсодержащего гликозида (II) с *M*, 640 неожиданно было обнаружено гомологичное соединение (III) с *M*, 654, являющееся продуктом 2-C-метилирования остатка серина. Другими идентифицированными продуктами, соответствующими фрагменту C—D, были гликозид (IV) с *M*, 608, образующийся путем отщепления метанола от гликозида (II), и, в меньшем количестве, два гомологичных соединения с *M*, 622 и 636, также являющиеся продуктами С-метилирования и имеющие предположительно структуры (V) и (VI) (таблица).

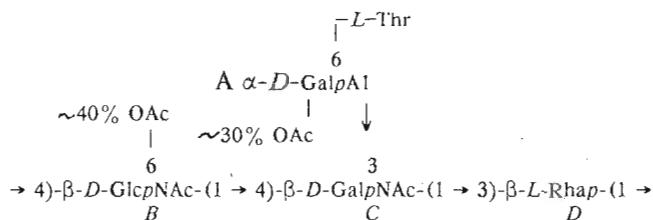


Таким образом, на основании полученных данных О-антителен *P. mirabilis* O28 имеет следующую структуру:



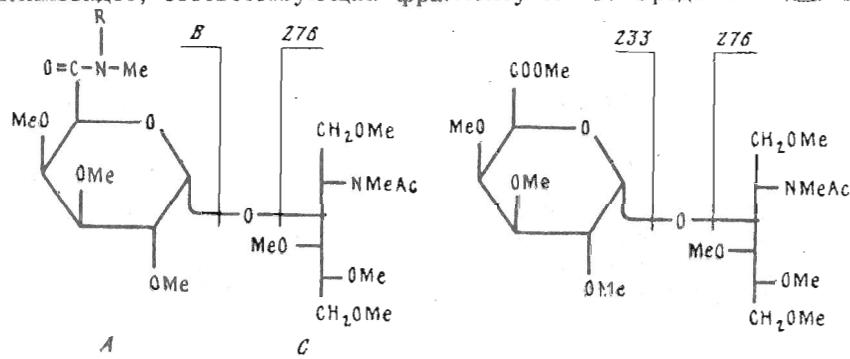
P. mirabilis O28

На основании данных моносахаридного состава и анализа методами ЯМР-спектроскопии [11] была установлена следующая структура О-специфического полисахарида *P. mirabilis* 3/6:



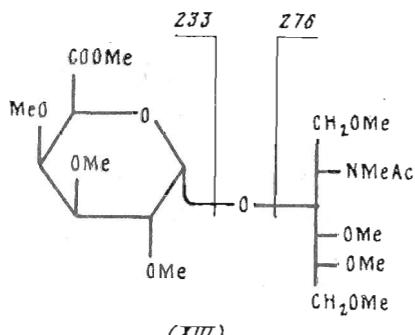
P. mirabilis 3/6

Применение к этому полисахариду описанного выше подхода, включающего частичный гидролиз, боргидридное восстановление и метилирование, также сопровождалось аналогичными реакциями в остатке аминокислоты и привело к смеси гликозидов, соответствующих фрагменту А—С. Среди них два изомера



(XII) + (XI)

(XIII)

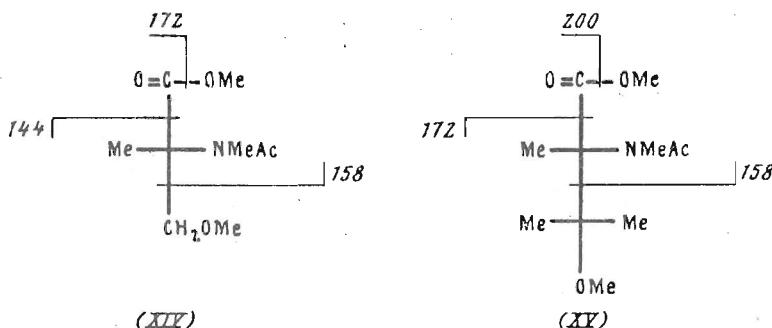


(XIII)

гликозида (VII) с M_r 682, являющегося продуктом 2,3-ди-С-метилирования остатка треонина, оказались миорными компонентами, а главными компонентами были 3-С-метилированный и неметилированный продукты отщепления метанола (VIII) и (IX) с M_r 636 и 622 соответственно (таблица). В качестве миорных компонентов были обнаружены также диметиламид (X) и монометиламид (XI) с M_r 538 и 524 соответственно. Соединения (X) и (XI) не могли быть получены из основного повторяющегося звена полисахарида, включающего амид галактуроновой кислоты с треонином, и, следовательно, их образование указывает на присутствие миорных олигосахаридных звеньев, содержащих галактуронамид.

Кроме того, неамидированные производные (XII) и (XIII) с M_r 525 были получены из обоих исследованных полисахаридов. Они могли образоваться в результате кислотного гидролиза амида или из миорных олигосахаридных звеньев, содержащих галактуроновую кислоту со свободной карбоксильной группой.

С-Метилирование гидроксилированных аминокислот в условиях метилирования [10] было подтверждено нами также на модельных соединениях: N-ацетил-L-серине и N-ацетил-L- треонине. Из первой аминокислоты образовалось только одно детектируемое ГЖХ производное (XIV) с M_r 203, являющееся продуктом 2-С-метилирования. Вторая аминокислота дала продукт 2,3-ди-С-метилирования (XV) с M_r 231.



Образование из остатка треонина непредельного производного было описано при метилировании капсулльного полисахарида *Escherichia coli* O6 : K54 : H10, содержащего амид D-глюкуроновой кислоты с треонином [12]. С-Метилирование гидроксилированных аминокислот в составе углеводов описано в настоящей работе впервые.

Полученные данные показывают, что, несмотря на повышенную реакционную способность серина и треонина в щелочных условиях, частичный гидролиз с последующим метилированием и ГЖХ/масс-спектрометрическим анализом может быть успешно применен для структурного анализа углеводов, содержащих амиды уроновых кислот не только с негидроксилированными, но и с гидроксилированными аминокислотами. Описанный подход позволяет быстро получать информацию о последовательности сахаров и локализации аминокислот при минимальных затратах исследуемого материала.

Авторы благодарят Г. Молля (Борстельский исследовательский институт, ФРГ) за съемку масс-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gromska W., Mayer H. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 62. № 2. P. 391—399.
2. Виноградов Е. В., Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К., Холодкова Е. В., Станиславский Е. С. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 660—669.
3. Kaca W., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kotelko K. // Arch. Immunol. Ther. Exp. 1987. V. 35, - P. 431—437.

4. Виноградов Е. В., Петрашик Д., Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1282—1286.
5. Vinogradov E. V., Krajewska-Pietrasik D., Kaca W., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Kochetkov N. K. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 185. № 3. P. 645—650.
6. Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Sidorchuk Z., Swierzko A. // Carbohydr. Res. 1991. V. 219. P. C1—C3.
7. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83—91.
8. Leontine K., Lindberg B., Lonngren J. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. № 2. P. 350—362.
9. Gerwig G. J., Kamerling J. P., Vliegenthart J. F. G. // Carbohydr. Res. 1979. V. 77. № 1. P. 1—7.
10. Ciucanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. № 2. P. 209—217.
11. Книрель Ю. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Сидорчук З., Каца В., Рожальски А., Котелко К., Кочетков Н. К. // Докл. АН СССР. 1992. Т. 324. № 2. С. 333—338.
12. Hofmann P., Jann B., Jann K. // Carbohydr. Res. 1985. V. 139. P. 261—271.

Поступило в редакцию
9.VI.1993

*E. V. Vinogradov, Yu. A. Knirel, N. K. Kochetkov,
J. Radzijewska-Lebrecht*, W. Kaca **

STRUCTURAL STUDY OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDES
OF *Proteus mirabilis* O28 AND 3/6 CONTAINING AMIDES
OF D-GALACTURONIC ACID WITH L-AMINO ACIDS;
C-METHYLATION AND β -ELIMINATION IN RESIDUES
OF SERINE AND THREONINE IN THE COURSE OF METHYLATION
ANALYSIS

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

** Institute of Microbiology and Immunology, University of Lodz,
Lodz*

Structures of the O-specific polysaccharides of *Proteus mirabilis* O28 and 3/6 were studied by partial acid hydrolysis followed by borohydride reduction and methylation and GLC/MS analysis of the resulting glycosyl alditol derivatives. C-Methylation and β -elimination in serine and threonine attached to the carboxyl group of galacturonic acid were observed in the course of the methylation analysis.

Технический редактор И. Н. Беляева

Сдано в набор 18.08.93	Подписано к печати 23.09.93	Формат бумаги 70×100 ¹ /16
Офсетная печать Усл. печ. л. 9,1	Усл. кр.-отт. 6,1 тыс.	Уч.-изд. л. 10,0
Тираж 568 экз. Зак. 202 Цена 29 р.		Бум. л. 3,5

Адресс редакции: 117871, ГСП-7, Москва В-437 ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, ком. 306

Телефон: 330-60-38

Московская типография № 2 ВО «Наука», 121099, Москва Г-99, Шубинский пер., 6