

Аналитические данные для ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* IVA-серовара, штаммы 32 и 31Д

Штамм	Выход, %	Содержание, %						
		моносахариды	белок	гептозы	аминосахара	KDO	3,6-ди-дезоксигексозы	Липид А
32	1,2	69,9	6,6	3,0	25,5	1,6	4,4	28,0
31Д	1,1	68,8	8,1	2,5	26,6	2,5	4,6	20,0

Таблица 2

Моносахаридный состав ЛПС из *Y. pseudotuberculosis* IVA-серовара

Штамм	Содержание, молярные %					
	Tuv	Man	Glc	Глицеро- <i>D</i> -манно-гептоза		Аминосакхара
				<i>D</i>	<i>L</i>	
32	20,3	44,2	9,4	5,0	12,4	8,7
31Д	23,5	50,0	6,2	3,2	8,3	8,8

цепей. Специфические полисахариды обоих штаммов идентичны по моносахаридному составу. В их гидролизатах с помощью ГЖХ и хроматографии на бумаге идентифицированы тивелоза, *D*-манноза и *D*-галактозамин в соотношении 0,9 : 3 : 1. Количественное соотношение моносахаридов было дополнительно подтверждено методом дезаминирования [3]. В гидролизате полисахаридов после дезаминирования методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов идентифицированы тивелоза, *D*-манноза и 2,5-ангидро-*D*-талоза в мольном соотношении 0,9 : 3 : 1. Таким образом, повторяющееся звено полисахаридов представляет собой пентасахарид, содержащий три остатка *D*-маннозы и по одному остатку тивелозы и *D*-галактозамина. Абсолютная конфигурация моносахаридов определена по величине оптического вращения после выделения их из гидролизатов с помощью препаративной хроматографии на бумаге.

Во второй фракции обнаружены все моносахариды, входящие в состав ЛПС. В дальнейшем данная фракция не исследовалась.

В третьей, низкомолекулярной фракции хроматографией на бумаге обнаружены тивелоза и KDO. Тивелозу выделяли препаративной хроматографией на бумаге, ее удельное вращение, $[\alpha]_{578}^{20} +16^{\circ}$ (с 0,5; вода), согласуется с литературными данными [4].

Поскольку специфические полисахариды обоих штаммов идентичны по моносахаридному составу, далее исследование проводили с *O*-специфическим полисахаридом из ЛПС штамма 32.

Для определения характера замещения моносахаридных остатков специфический полисахарид метилировали по методу Хакомори [5]. Полноту метилирования проверяли отсутствием полос поглощения вблизи 3400 см^{-1} в ИК-спектре. Сполна метилированный полисахарид подвергали метанолизу с последующим ацетилированием частично метилированных метилгликозидов в пиридине уксусным ангидридом.

В гидролизате сполна метилированного полисахарида хроматомасс-спектрометрией ацетатов частично метилированных метилгликозидов обнаружены: метил-2,4-ди-*O*-метилтивелозид, метил-2,4,6-три-*O*-метил-3-*O*-ацетилманнопиранозид, метил-3,4-ди-*O*-метил-2,6-ди-*O*-ацетилманнопиранозид, метил-2-(*N*-метил)ацетамидо-2-дезоксид-4,6-ди-*O*-метил-3-*O*-ацетилгалактопиранозид и незначительное количество метил-3,4,6-три-*O*-метил-2-*O*-ацетилманнопиранозид, образующегося в результате частичного отщепления тивелозы. Следовательно, повторяющееся звено является разветвленным, точкой разветвления служит 1,2-связанная манноза, которая одновременно имеет заместитель (тивелозу) в положении 6.

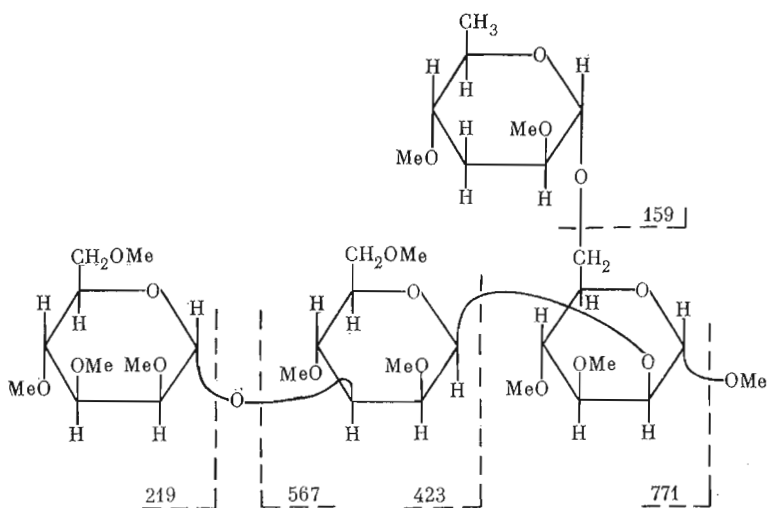


Рис. 1. Масс-спектрометрическая фрагментация сполна метилированного тетрасахарида из О-специфического полисахарида *Y. pseudotuberculosis* IVA-серовара

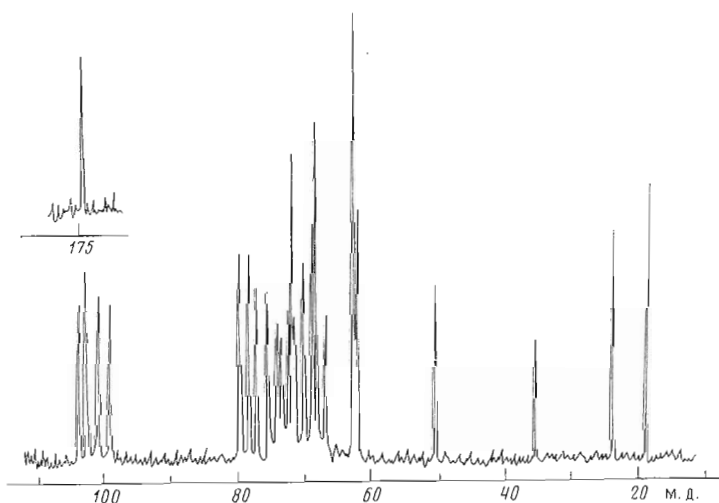


Рис. 2. Спектр ¹³С-ЯМР О-специфического полисахарида *Y. pseudotuberculosis* IVA-серовара

Для определения последовательности моносахаридных звеньев полисахарид N-деацетилировали щелочью в водном диметилсульфоксиде [6] и подвергали специфическому расщеплению нитритом натрия в присутствии уксусной кислоты [3]. Препаративной хроматографией на бумаге из продуктов дезаминирования выделен тетрасахарид, который состоял из остатков D-маннозы и тивелозы в соотношении 3 : 1. В гидролизате сполна метилированного олигосахарида после ацетилирования обнаружены: метил-2,4-ди-O-метилтивелозид, метил-2,3,4,6-тетра-O-метилманнопиранозид, метил-2,4,6-три-O-метил-3-O-ацетилманнопиранозид и метил-3,4-ди-O-метил-2,6-ди-O-ацетилманнопиранозид.

Масс-спектр сполна метилированного олигосахарида соответствует разветвленному тетрасахариду (рис. 1).

В спектре ¹³С-ЯМР полисахарида (рис. 2) в области резонанса аномерных атомов углерода имеются четыре сигнала (один двойной интенсивности) с химическими сдвигами 98,4; 100,3; 102,1; 103,3 м.д., что подтверж-

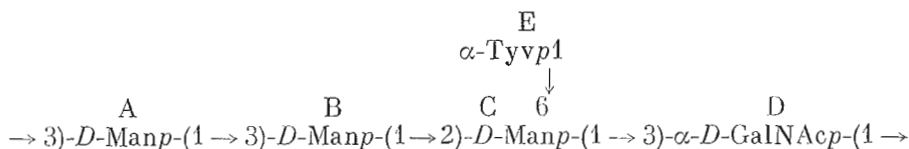
Отнесение сигналов углерода в спектре ^{13}C -ЯМР полисахарида из *Y. pseudotuberculosis* IVA-серовара

Остаток	Хим. сдвиги ^{13}C , м.д. от TMS						NHCOCH ₃
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
A	103,3	71,3	76,7	68,2	75,0	62,1	174,9; 23,2
B	102,1	71,3	79,3	68,1	77,8	62,1	
C	98,4	79,3	73,1	68,6	73,6	69,7	
D	100,3	50,1	77,8	66,3	71,9	61,8	
E	102,1	68,1	34,6	71,2	68,6	17,8	

дает пентасахаридный состав регулярно повторяющегося звена. В спектре в области сильного поля имеется сигнал при 17,8 м.д., свидетельствующий о наличии 6-дезоксисахара в составе повторяющегося звена. Из других характерных сигналов следует отметить пики при 23,2 и 174,9 м.д., относящиеся к CH_3 - и CO -атомам ацетиамидогруппы, 34,6 м.д. (сигнал дезокси-звена) и 50,1 м.д.— сигнал атома углерода, связанного с атомом азота. Наличие этих сигналов свидетельствует о том, что в состав повторяющегося звена входят остатки дезокси- и ацетиамидосахара. Число сигналов в области резонанса свободных оксиметильных групп (61,8 и 62,1 м.д.) отвечает трем атомам углерода. Общее количество сигналов C6-атомов (6-дезоксидных и оксиметильных) составляет четыре. При пентасахаридном составе повторяющегося звена и единственном сигнале в области резонанса карбонильных групп, принадлежащих ацетиамидогруппе, это означает, что в составе повторяющегося звена имеется 1,6-замещенный моносахаридный остаток.

Конфигурация гликозидных связей определяется из следующих соображений. Сигнал при 34,6 м.д. для тивелозы означает, что она имеет α -конфигурацию [7]. Сигнал при 50,1 м.д. указывает на то, что 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактоза имеет α -конфигурацию и замещена по C3 [8].

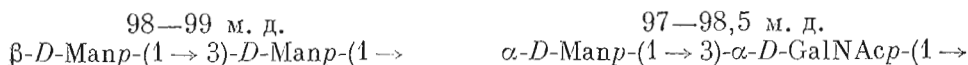
Наличие вышеуказанных данных позволяет представить следующую структуру повторяющегося звена О-специфического полисахарида *Y. pseudotuberculosis* IVA-серовара:



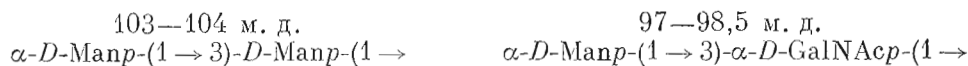
Анализ области спектра ^{13}C -ЯМР кольцевых (кроме аномерных) атомов углерода, связанных гликозидной связью, и C5-атомов β -пиранозных остатков (75—80 м.д., см. табл. 3) показывает, что лишь один маннозный остаток имеет β -конфигурацию, так как тивелоза и 2-ацетиамидо-2-дезоксид-*D*-галактоза, как показано выше, имеют α -конфигурацию и их C5-атомы не могут резонировать в этой области. Действительно, в этой области находится пять сигналов; четыре из них следует отнести за счет резонанса кольцевых атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей (C3 двух маннозных остатков, C3 галактозаминидного остатка и C2 третьего маннозного остатка). Пятый сигнал может быть отнесен лишь за счет C5-атома β -маннозного остатка.

Конфигурация гликозидных связей маннозных остатков независимым способом доказывается из анализа области резонанса аномерных атомов углерода с учетом конформационной зависимости аномерных атомов угле-

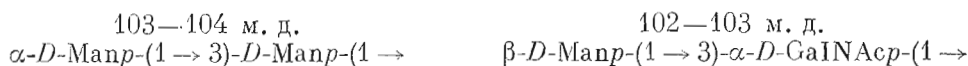
рода в олиго- и полисахаридах [9]. Рассмотрим все три варианта размещения β -маннопиранозного остатка.



В этом варианте в спектре будут наблюдаться два сигнала с химическими сдвигами в более высоком поле, чем 99 м.д.



Здесь мы имеем как раз то, что наблюдается в спектре.



При такой ситуации невозможно объяснить наличие сигнала с химическим сдвигом 98,4 м.д., так как С1-атом α -галактозы имеет химический сдвиг 102,1 м.д. [7], а С1-атом α - или β -маннозы, соединенной с С2, С4 или С6-атомами другой маннозы, — 100—103 м.д. [10]. Следовательно, единственно приемлемым является второй вариант.

Из оставшихся трех сигналов даже сигнал в самом сильном поле при 100,3 м.д. необычен для С1-атома 2-ацетида-2-дезоксид- α -D-галактозы. Однако в той же работе [9] отмечалось, что химический сдвиг 100,5—102 м.д. характерен для С1 пиранозидов с α -D-глюко- или -галакто-конфигурацией, если они замещают пиранозный остаток с D-манно-конфигурацией по С3. С учетом замены ОН-группы на NНас-группу в гликозилирующей пиранозе указанный интервал должен быть 99—100,5 м.д., и тогда сигнал при 100,3 м.д. в нашем случае может быть отнесен к С1 2-ацетида-2-дезоксид- α -D-галактозы. Следовательно, оставшийся сигнал двойной интегральной интенсивности с химическим сдвигом 102,1 м.д. относится к остаткам α -галактозы и маннозы с β -конфигурацией.

В табл. 3 приводится отнесение всех сигналов в спектре ^{13}C -ЯМР О-специфического полисахарида из *Y. pseudotuberculosis* IVA-серовара, 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 выполняли на бумаге Filtrak FN-3 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3, обнаружение аминсахаров осуществляли раствором нингидрина в ацетоне, КДО — тиобарбитуровой кислотой, а остальные моносахариды — щелочным раствором нитрата серебра. Гель-хроматографию проводили на колонке с сефадексом G-50 (100×3 см) в пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5 (4 мл уксусной кислоты и 10 мл пиридина на 1 л воды). ГЖХ выполняли на газовом хроматографе Pye-Unicam-104 на стеклянных колонках (150×0,4 см), используя следующие жидкие фазы: QF-1, 3% на газхроме Q 100—120 меш, колонка А, и SE-30, 5% на хроматоне, 100—120 меш, колонка Б. ГЖХ-анализ ацетатов полиолов проводили на колонке А от 175 до 225°С (5°/мин), ацетатов частично метилированных метилгликозидов — на колонке А от 125 до 225°С (5°/мин). Метилированный олигосахарид анализировали на колонке Б от 250 до 320°С (5°/мин). Хромато-масс-спектрометрию выполняли на приборе LKB-9000s, используя стеклянные колонки (200×0,4 см), заполненные указанными выше фазами. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin Elmer 141. Спектр ^{13}C -ЯМР получен для раствора в D₂O на приборе Bruker-Physics NХ-360 с рабочей частотой по углероду 90,55 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали метанол (50,4 м.д. относительно тетраметилсилана).

Аналитические методы. Общее содержание углеводов определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [11], гексозаминов — по методу

Моргана — Эльсона [12], гептоз — по методу Синиловой [13], белка — по Лоури [14]. КДО и 3,6-дидезоксигексозы определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [15], содержание липида А — взвешиванием осадка, образующегося при гидролизе ЛПС 1% уксусной кислотой при 100° С в течение 2,5 ч.

Выделение ЛПС и специфического полисахарида. Сухие клетки *Y. pseudotuberculosis* IV-серовара, штаммы 31Д и 32, экстрагировали 45% фенолом по стандартной методике [2]. Выход ЛПС составил 1,1 и 1,2% соответственно.

ЛПС штамм 32 (350 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (40 мл, 2 ч, 100° С), осадок липида отделяли центрифугированием (105 000g, 1 ч), супернатант лиофилизировали и хроматографировали на колонке (100×3 см) с сефадексом G-50. Из фракции, выходящей со свободным объемом, получили 56 мг О-специфического полисахарида, $[\alpha]_{578}^{20} +117^{\circ}$ (с 0,5; вода).

ЛПС штамм 31Д (350 мг) обрабатывали как описано выше; выход О-специфического полисахарида 70 мг, $[\alpha]_{578}^{20} +139^{\circ}$ (с 0,5; вода).

Определение моносахаридного состава полисахарида. Полисахарид (10 мг) гидролизировали 1 н. трифторуксусной кислотой (3 ч, 100° С), гидролизат упаривали и исследовали хроматографией на бумаге. Часть гидролизата (5 мг) восстанавливали боргидридом натрия (10 мг, 4 ч, 20° С), добавляли разбавленную уксусную кислоту, упаривали с метанолом (3 раза по 0,5 мл), ацетиловали уксусным ангидридом в пиридине и исследовали методом ГЖХ.

Другую часть гидролизата (5 мг) растворяли в 0,1 мл воды, добавляли 0,5 мл 5% раствора NaNO₂ и 0,5 мл 33% уксусной кислоты. Смесь выдерживали 40 мин при 20° С, обрабатывали КУ-2 (H⁺), лиофилизировали, восстанавливали боргидридом натрия, ацетиловали и исследовали методом ГЖХ.

Выделение олигосахарида. Полисахарид (40 мг) обрабатывали щелочью в водном диметилсульфоксиде [6] (100° С, 15 ч). N-Деацетилованный полисахарид (30 мг) растворяли в 1 мл воды, добавляли 2 мл 5% раствора NaNO₂ и 2 мл 33% уксусной кислоты, смесь выдерживали 40 мин при 20° С, пропускали через колонку с КУ-2 (H⁺), лиофилизировали, препаративной хроматографией на бумаге выделили олигосахарид (3,5 мг), $R_{\text{Gal}} 0,3$; $[\alpha]_{578}^{20} +14,4^{\circ}$ (с 0,3; вода).

Анализ методом метилирования. Полисахарид (10 мг) и олигосахарид (2 мг) метилировали по методу [5]. В случае полисахарида смесь разбавляли водой, диализовали, упаривали. Метилированный олигосахарид экстрагировали СНCl₃, экстракт высушивали K₂CO₃ и упаривали. Сполна метилированные полисахарид и олигосахарид нагревали с 1 н. HCl в метаноле (100° С, 20 ч), упаривали, ацетиловали и исследовали методами ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Samuellsen K., Lindberg B., Brubaker R. R. J. Bacteriol., 1974, v. 117, № 3, p. 1010–1016.
2. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. Z. Naturf., 1952, v. 7B, p. 148–150.
3. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. Carbohydr. Res., 1975, v. 44, № 1, p. 77–85.
4. Davies D. A. L. Nature (London), 1961, № 191, p. 43–44.
5. Hakomori S. J. Biochem., 1964, v. 55, p. 205–208.
6. Erbing C., Granath K., Kenne L., Lindberg B. Carbohydr. Res., 1976, v. 47, № 2, p. C5–C7.
7. Kochetkov N. K., Torgov V. J., Malysheva N. N., Sahshkov A. S. Tetrahedron, 1980, v. 36, № 8, p. 1099–1105.
8. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В., Рабовский А. Б. Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1489–1494.
9. Шашков А. С. Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 246–253.
10. Gorin P. A. J. Can. J. Chem., 1973, v. 51, № 14, p. 458–461.
11. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Anal. Chem., 1956, v. 28, p. 350–354.
12. Morgan W. T. J., Elson L. A. Biochem. J., 1943, v. 28, p. 288–292.

