



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 9 \* № 8 \* 1983

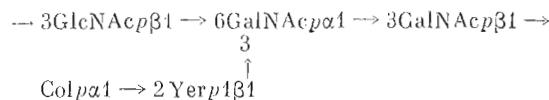
УДК 577.114.5:543.422.23

## СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА ИЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *YERSINIA* *PSEUDOTUBERCULOSIS VI* СЕРОВАРА

Горшкова Р. П., Зубков В. А., Исааков В. В.,  
Оводов Ю. С.

Тихоокеанский институт биоорганической химии  
ДВНЦ Академии наук СССР, Владивосток

С помощью методов метилирования, частичного гидролиза и спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР для повторяющегося звена полисахарида О-специфических боковых цепей липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* VI серовара предложена следующая структура:



Ранее было показано [1], что в состав специфического полисахарида липополисахарида *Yersinia pseudotuberculosis* VI серовара входят два остатка 2-ацетамидо-2-дезокси-D-галактозы и по одному остатку 2-ацетамидо-2-дезокси-D-глюкозы, 3,6-дидезокси-L-ксило-гексозы (колитозы) и 3,6-дидезокси-4-C-(1-оксиэтил)гексозы, названной нами иерсиниозой [2]. Для определения типов связей специфический полисахарид дважды метилировали иодистым метилом в присутствии метилсульфиниламина [3], подвергали метанолизу, ацетилировали. Ацетаты частично метилированных метилгликозидов исследовали методом хроматомасс-спектрометрии, при этом идентифицированы следующие производные метилированных сахаров: метил-2-(N-метил)ацетамидо-2-дезокси-3-O-ацетил-4,6-ди-O-метил-глюкопиранозид, метил-2-(N-метил)ацетамидо-2-дезокси-3-O-ацетил-4,6-ди-O-метилгалактопиранозид, метил-2-(N-метил)ацетамидо-2-дезокси-3,6-di-O-ацетил-4-O-метилгалактопиранозид, масс-спектры которых были практически идентичны масс-спектрам ранее описанных заведомых образцов [4], а также метил-2,4-ди-O-метил-3,6-дидезоксигексопиранозид.

Полученные данные указывают на то, что все моносахаридные звенья находятся в пиранозной форме, а полисахарид имеет разветвленную цепь. Точкой разветвления служит остаток 2-ацетамидо-2-дезокси-D-галактозы, включенный в углеводную цепь 1,3- и 1,6-гликозидными связями.

На рис. 1 приведен масс-спектр производного иерсиниозы, метил-2-O-ацетил-4-O-метил-3,6-дидезокси-4-C-(1-метоксиэтил)гексозида. Отнесение основных пиков в масс-спектре сделали путем соотставления со спектрами 3,6-дидезоксигексопиранозидов [5]. При отрыве от молекулы метоксильной группы образуется ион с  $m/z$  245. При дальнейшем отщеплении молекул уксусной кислоты и метанола образуются ионы с  $m/z$  185 и 153 соответственно. При разрыве связи  $\text{C}_4-\text{C}'_1$  образуются ионы с  $m/z$  59 и 217. Дальнейшая фрагментация иона с  $m/z$  217 приводит к ионам с  $m/z$  186 и 126. Распад цикла 2-O-ацетил-4-O-метил-3,6-дидезоксигексопиранозида протекает в основном по трем направлениям с образованием ионов с  $m/z$  130, 116 и 216 соответственно. Наличие иона с  $m/z$  116 свидетельствует о том, что в положении 2 частично метилированного производного иерсиниоз-

Сокращения: Col – колитоза (3,6-дидезокси-L-ксило-гексоза), Yer – иерсиниоза (3,6-дидезокси-4-C-(1-оксиэтил)гексоза).

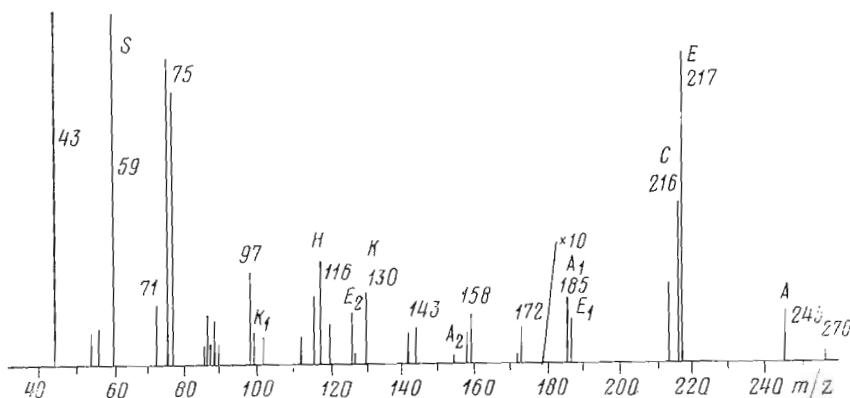


Рис. 1. Масс-спектр метил-2-О-ацетил-4-О-метил-3,6-дезокси-4-С-(1-метоксиэтил)гексозида

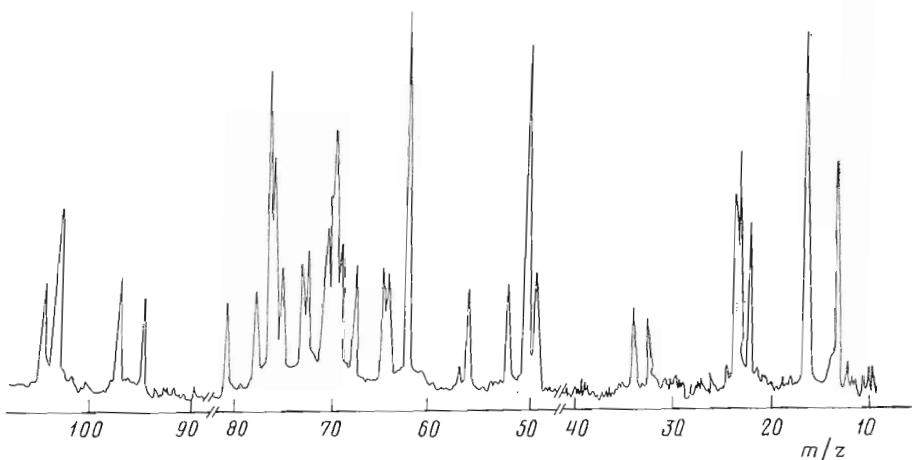
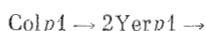


Рис. 2. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР О-специфического полисахарида из липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VI серовара

зы локализована О-ацетильная группа и что иерсиниоза включена в полисахаридную цепь 1,2-гликозидной связью.

Для установления последовательности моносахаридных звеньев полисахарид был подвергнут частичному кислотному гидролизу. Препаративной хроматографией на бумаге из гидролизата полисахарида выделен дисахарид, состоящий из остатков колитозы и иерсиниозы. Для определения моносахарида, находящегося на восстанавливающем конце, дисахарид восстанавливали боргидридом натрия, гидролизовали, ацетилировали и исследовали методом хроматомасс-спектрометрии. В гидролизате идентифицированы в виде ацетатов аномеры колитозы и полиол персинит. Таким образом, из данных частичного гидролиза и результатов метилпропания полисахарида следует, что в полисахариде имеется дисахаридный фрагмент



В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида (рис. 2) в области резонанса атомов углерода наблюдаются четыре сигнала (один из них двойной интегральной интенсивности) с химическими сдвигами 94,4; 96,8; 103,0 и 104,3 м.д. Это указывает на то, что специфический полисахарид построен из регулярно повторяющихся пентасахаридных звеньев. Отнесение некоторых сигналов в спектре очевидно из общих закономерностей в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР углеводов [6]. Так, сигнал двойной интегральной интенсивности с химическим сдвигом 16,7 м.д. относится к С-атомам метильных групп 6-дезоксисахаров, а сигнал при 13,6 м.д. принадлежит С-атому

Отнесение сигналов атомов углерода в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида  
*Y. pseudotuberculosis* VI серовара

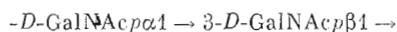
Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C'1	C'2
A	103,0 (102,2) *	55,6 (54,4)	80,4 (83,6)	70,2 (69,4)	77,2 (76,2)	62,0 (61,4)		
B	94,4 (98,7)	49,1 (49,2)	76,0 (77,2)	68,8 (65,1)	69,7 (69,1)	72,1 (72,3)		
C	103,0 (103,0)	51,8 (51,7)	77,5 (80,7)	64,4 (64,4)	76,0 (75,6)	62,0 (61,7)		
D	104,3 (106,3)	74,6 (70,1)	32,6 (34,9)	72,6 (72,3)	75,5 (75,9)	16,6 (16,3)	69,4 (69,1)	13,6 (13,3)
E	96,8 (100,2)	67,3 (67,2)	34,2 (34,2)	69,4 (69,4)	63,9 (64,1)	16,6 (16,6)		

\* В скобках приведены химические сдвиги для заведомых образцов метил-2-ацетамило-2-дезокси-3-O-метил- $\beta$ -D-глюкопиранозида (A), метил-2-ацетамило-2-дезокси-3,6-ди-O-метил- $\alpha$ -D-галактопиранозида (B), метил-2-ацетамило-2-дезокси-3-O-метил- $\beta$ -D-галактопиранозида (C), метил-3,6-дидезокси-4-C-(1-оксигенатил)- $\beta$ -D-гексопиранозида (D) и метил-3,6-дидезокси- $\alpha$ -L-псилогексопиранозида (E).

метильной группы в боковой цепи иерсиниозы. Два сигнала при 32,6 и 34,2 м.д. принадлежат С-атомам метиленовых групп в цикле. О наличии трех остатков 2-ацетамило-2-дезоксигексоз свидетельствуют сигналы C2-атомов, связанных с ацетамидной группой (49,1; 51,8; 55,6 м.д.), а также сигналы с химическими сдвигами 23,3; 23,4; 22,1 и 174,0; 174,8 м.д. (двойной интенсивности), относящиеся к CH<sub>3</sub>- и CO-атомам ацетамидных групп соответственно. В области резонанса С-атомов оксиметильных групп наблюдается один сигнал двойной интенсивности при 61,9 м.д. Общее количество сигналов C6-атомов (б-дезокси- и оксиметильных) соответствует четырем. Это означает, что в составе повторяющегося звена имеется 1,6-замещенный углеводный остаток. Общее количество сигналов в спектре (не считая сигналов CH<sub>3</sub>CO-) составляет 32, что отвечает четырем гексозам и одной октозе и соответствует приведенным выше результатам анализа моносахаридного состава полисахарида.

Более подробный анализ спектра позволяет определить конфигурацию гликозидных связей. Конфигурация аномерного центра колитозы следует из химического сдвига C3-атома, равного 34,2 м.д., который может отвечать только  $\alpha$ -колитозе в пиранозной форме [7]. Величины химических сдвигов C2-атомов аминосахаров с учетом замещения по C3 доказывают, что  $\beta$ -конфигурацию имеет остаток 2-ацетамило-2-дезокси-D-глюкозы (55,6 м.д.), а остатки 2-ацетамило-2-дезокси-D-галактозы имеют  $\alpha$ - (49,1 м.д.) и  $\beta$ -конфигурацию (51,8 м.д.). В спектре в области 75–85 м.д. [6] имеется семь сигналов: четыре из них соответствуют неаномерным кольцевым С-атомам, участвующим в образовании гликозидной связи, и два – C5-атомам остатков 2-ацетамило-2-дезокси- $\beta$ -D-глюкозы и 2-ацетамило-2-дезокси- $\beta$ -D-галактозы. Следовательно, оставшийся сигнал относится к C5-атому остатка  $\beta$ -D-иерсиниозы.

Анализ аномерной области показывает, что сигнал с химическим сдвигом 94,4 м.д. отвечает  $\alpha$ -D-моносахаридному остатку, гликозилирующему D-моносахаридный остаток с галакто-конфигурацией в положение 3 [8]. Отсюда следует, что в составе повторяющегося звена полисахарида имеется фрагмент



Сигналы с химическим сдвигом 103 м.д. обусловлены C1-атомами 2-ацетамило-2-дезокси- $\beta$ -D-глюкозы и 2-ацетамило-2-дезокси- $\beta$ -D-галактозы на основании их положения в спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР соответствующих метиловых эфиров метилгликозидов [9, 10].

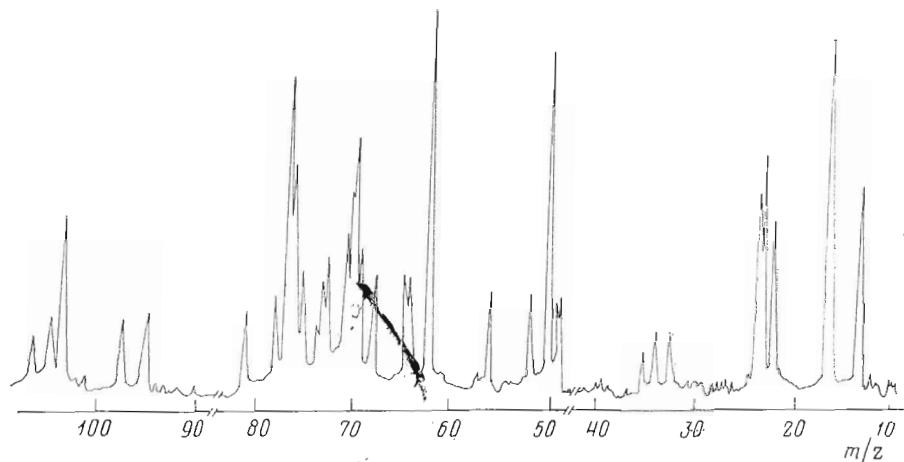
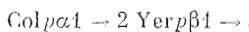


Рис. 3. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида I липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VI серовара

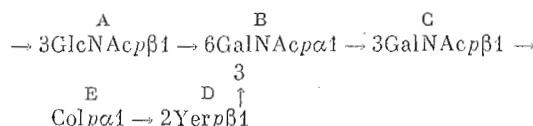
Сигнал с химическим сдвигом 96,8 м.д. может относиться только к  $\alpha$ -моносахаридному остатку, в нашем случае — к  $\alpha$ -колитозе. Следовательно, сигнал с химическим сдвигом 104,3 м.д. относится к  $\beta$ -иерсиниозе. Сопоставление данных спектров метилгликозидов иерсиниозы и колитозы и спектра полисахарида позволяет выделить сигналы, относящиеся к остаткам иерсиниозы и колитозы (таблица). Сигнал с химическим сдвигом 34,2 м.д. относится к C3-атому  $\alpha$ -колитозы, а сигнал с химическим сдвигом 32,6 м.д. — к C3  $\beta$ -иерсиниозы. Сдвиг сигналов C1- и C3-атомов иерсиниозы в спектре полисахарида на 2 и 2,3 м.д. соответственно в сильное поле ( $\beta$ -эффект) относительно их положения в спектре метилгликозида указывает на гликозилирование остатка  $\beta$ -иерсиниозы по C2.

Для получения дополнительных сведений о последовательности моносахаридных остатков О-специфический полисахарид был подвергнут мягкому гидролизу 1% уксусной кислотой. В результате был получен полисахарид I, в состав которого входят остатки колитозы, иерсиниозы, 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-глюкозы и 2-ацетамидо-2-дезокси-*D*-галактозы в соотношении 0,5 : 1 : 1 : 2. В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида I (рис. 3) наблюдаются дополнительные сигналы с химическими сдвигами 106 и 35,3 м.д., практически совпадающие с химическими сдвигами C1- и C3-атомов метилгликозида иерсиниозы. Их появление объясняется частичным удалением при гидролизе остатков колитозы и подтверждает наличие в исходном полисахариде фрагмента



В то же время незначительное расщепление сигнала в области 49 м.д., относящегося к C2-атому остатка 2-ацетамидо-2-дезокси- $\alpha$ -*D*-галактозы, позволяет сделать вывод о присоединении дисахаридного фрагмента по C3-атому данного моносахаридного остатка.

Таким образом, на основании вышеуказанных результатов для повторяющегося звена О-специфического полисахарида из липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VI серовара предложена следующая структура:



В таблице сделана попытка отнесения всех сигналов в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР\*

полисахарида О-специфических боковых цепей липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* VI серовара в соответствии с предложенной структурой и основными закономерностями по влиянию структурных факторов на химические сдвиги сигналов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах углеводов.

## Экспериментальная часть

Аналитическую и препаративную хроматографию выполняли на бумаге Filtrak FN-3 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3. Обнаружение моносахаридов и олигосахарида осуществляли щелочным раствором серебра. Гель-хроматографию проводили на колонке с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (4 мл уксусной кислоты и 10 мл пиридина на 1 л воды).

ГЖХ выполняли на хроматографе Рье Unicam-104 на стеклянной колонке (150×0,4 см), используя жидкую фазу OF-1, 3% на газхроме Q (100—120 mesh), в режиме температур 125—225°C (5°/мин) для ацетатов частично метилированных метилгликозидов и 175—225°C для ацетатов полиолов. Хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе LKB-9000s, используя стеклянную колонку (200×0,4 см), заполненную указанной выше фазой. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin-Elmer-141. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР снимали на приборе Bruker-Physics HX-360 с рабочей частотой по углероду 90,55 МГц в  $\text{D}_2\text{O}$ , внутренний стандарт — метanol (50,1 м.д. относительно тетраметилсилина).

*Выделение специфического полисахарида и полисахарида I.* Липополисахарид (800 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (80 мл, 2 ч, 100°C), осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизовали и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Выход специфического полисахарида 80 мг. Полисахарид I получали при гидролизе 75 мг специфического полисахарида 1% уксусной кислотой (2 ч, 100°C). Гидролизат лиофилизовали и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50. Выход полисахарида I 65 мг.

*Определение моносахаридного состава.* Полисахариды (3 мг) гидролизовали 1 н. трифтормукосной кислотой (3 ч, 100°C), гидролизат упаривали с метанолом (3×0,5 мл) и исследовали с помощью хроматографии на бумаге. Часть гидролизата восстанавливали боргидридом натрия (10 мг, 4 ч, 20°C), добавляли разбавленную уксусную кислоту и упаривали с метанолом (3×0,5 мл), ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине (30 мин, 90°C), упаривали и анализировали методом ГЖХ.

*Выделение олигосахарида.* Полисахарид (40 мг) гидролизовали 0,1 н. HCl (100°C, 30 мин). Гидролизат упаривали с метанолом и хроматографировали препаративно на бумаге. Получили олигосахарид, выход 3 мг,  $R_{\text{Gal}}$  0,6;  $[\alpha]_{578}^{20} +62,6^\circ$  (с 0,5; вода).

*Метилирование полисахарида* (7 мг) осуществляли иодистым метилом в присутствии метилсульфинилкарбаниона по методу [3], смесь разбавляли водой, дигализовали и упаривали. Сполна метилированный полисахарид нагревали с 1 н. HCl в метаноле (100°C, 20 ч), упаривали, ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине и исследовали методом ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gorshkova R. P., Zubkov V. A., Ovodov Yu. S. Immunochimistry, 1976, v. 13, № 2, p. 581—583.
2. Зубков В. А., Горшкова Р. П., Исааков В. В., Оводов Ю. С. Тез. докл. VII Всес. конф. по химии и биохимии углеводов. Пущино, 1982, с. 88.
3. Nakomori S. J. Biochem., 1964, v. 55, № 2, p. 205—208.
4. Fournet B., Strecher G., Leroy J., Montreuil J. Analyt. Biochem., 1981, v. 116, № 3, p. 489—502.
5. Елькин Ю. Н., Томич С. В., Горшкова Р. П. Химия природ. соедин., 1982, № 5, с. 569—575.

6. Шашков А. С., Чижов О. С. Биоорганическая химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437–497.
7. Bundle R. D., Josephson S. Can. J. Chem., 1978, v. 56, № 20, p. 2686–2690.
8. Шашков А. С. Биоорганическая химия, 1983, т. 9, № 2, с. 246–253.
9. Шашков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1495–1505.
10. Деревицкая В. А., Шашков А. С., Новикова О. С., Евстигнеев А. Ю. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 3, с. 410–421.

Поступила в редакцию  
24.I.1983

**STRUCTURAL FEATURES OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM  
LIPOPOLYSACCHARIDE OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS VI*  
SEROVAR**

GORSHKOVA R. P., ZUBKOV V. A., ISAKOV V. V., OVODOV Yu. S.

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

Using methylation studies, partial hydrolysis and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy data, the following structure for O-specific polysaccharide from lipopolysaccharide of *Yersinia pseudotuberculosis VI* serovar has been proposed:

