



УДК 517.114.5 : 543.422.23

© 1993 В. А. Зубков, Е. Л. Назаренко,  
Р. П. Горшкова, Ю. С. ОводовСТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА  
*Yersinia rohdei*

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Выделен и охарактеризован О-специфический полисахарид из липополисахарида *Yersinia rohdei* типового штамма WA 339. На основании данных метилирования и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии установлена структура повторяющегося звена полисахарида, представляющего собой *L*-рамнан следующего строения:

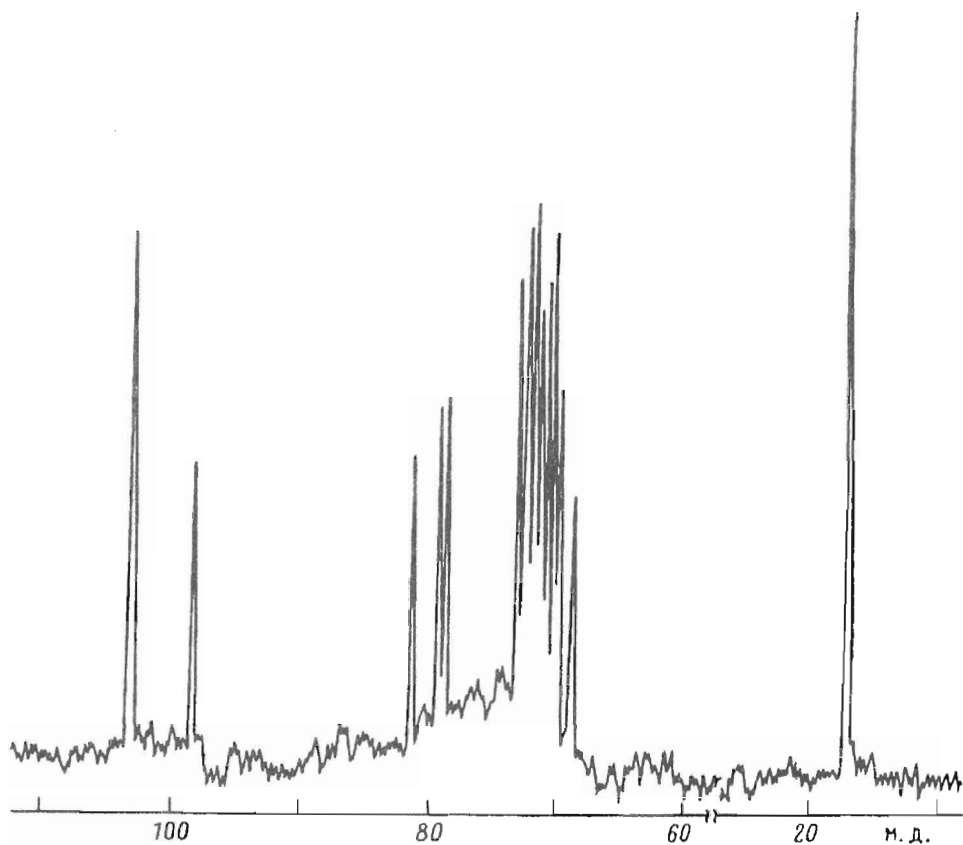


В настоящей работе продолжено изучение О-специфических полисахаридов рода *Yersinia* [1]. Сообщение посвящено установлению структуры повторяющегося звена О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида (ЛПС) нового вида иерсиний — *Y. rohdei*, недавно выделенного в самостоятельный вид на основании морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков [2].

ЛПС получен из бактериальных клеток экстракцией водным фенолом и освобожден от нуклеиновых кислот осаждением трихлоруксусной кислотой. При расщеплении ЛПС разбавленной уксусной кислотой с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-50 получен О-специфический полисахарид.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр полисахарида (рисунок) указывает на регулярный характер и трисахаридный размер его повторяющегося звена. В спектре наблюдаются сигналы метильной группы 6-дезоксисахара при 18,0 м. д. (тройной интегральной интенсивности), аномерных атомов углерода при 103,2 (двойной интенсивности) и 98,5 м. д., трех неаномерных атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей, при 81,5, 79,5 и 79,0 м. д., а также 9 сигналов вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 69,0—73,4 м. д. Таким образом, можно предположить, что полисахарид построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, состоящих из 6-дезоксигексоз, причем химические сдвиги аномерных атомов углерода свидетельствуют о том, что все три моносахаридных остатка находятся в пиранозной форме.

В гидролизате полисахарида бумажной и газофазной хроматографией идентифицирован единственный моносахарид — рамноза. Для определения ее абсолютной конфигурации моносахарид выделен из гидролизата препаративной хроматографией на бумаге с последующей очисткой микропрепаративной ВЭЖХ. На основании величины удельного оптического вращения рамнозы и полученного из нее путем мягкого метанолиза метилрамнозида установлено, что моносахарид имеет *L*-конфигурацию.

Из  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, определены константы спин-спинового взаимодействия (KCCB)  $^1J_{\text{C,H}}$  для аномерных атомов углерода. Относительно меньшая константа (около



$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида

160 Гц) для сигнала при 98,5 м. д. указывает на то, что он принадлежит  $\beta$ -связанному моносахариду, а сравнительно большая константа (170,2 Гц) для сигналов при 103,2 м. д. свидетельствует об  $\alpha$ -конфигурации гликозидных связей моносахаридов [3]. Величины КССВ подтверждают также заключение о пиранозной форме всех моносахаридных остатков (КССВ фуранозидов имеют величины не менее 173 Гц [4]).

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде установлен методом метилирования. После гидролиза метилированного по Хакомори [5] полисахарида методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов была идентифицирована 2,4-ди-O-метилрамноза. Следовательно, все три остатка *L*-рамнозы в полисахариде соединены 1  $\rightarrow$  3-связями.

Таким образом, O-специфический полисахарид *Y. rohdei* построен из линейных трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка  $\alpha$ -*L*-рамнозы и один остаток  $\beta$ -*L*-рамнозы, соединенных 1  $\rightarrow$  3-связями:



Полная расшифровка  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида приведена в таблице. Правильность отнесения сигналов углеродных атомов подтверждена теоретическим расчетом спектра, исходя из химических сдвигов атомов углерода свободных моносахаридов и средних величин эффектов гликозилирования [6]. При этом сумма квадратичных отклонений (*S*) химических сдвигов в расчетном и экспе-

Данные  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида ( $\delta$ , м. д.) \*

Остаток <i>L</i> -рамнозы	C1	C2	C3	C4	C5	C6
-3Rha $\beta$ 1-	98,5	72,1	81,6	72,4	73,4	18,0
	98,1	71,9	81,5	72,5	73,7	18,0
-3Rha $\alpha$ 1-	103,2	69,0	79,0	71,7	70,4**	18,0
	103,5	69,0	78,4	71,8	70,0	18,0
-3Rha $\alpha$ 1-	103,2	71,2	79,5	72,5	70,0**	18,0
	103,5	70,9	79,0	72,9	70,0	18,0

\* Второй строкой для каждого остатка приведены расчетные данные.

\*\* Отнесение может быть обратным.

риментальном спектрах, вычисленная как описано в работе [6], составляет 0,6. Как правило, в качестве кандидата на реальную структуру рассматриваются все структуры, характеризующиеся величиной  $S \leq 1,5$  [7].

### Экспериментальная часть

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр получен на приборе Bruker WM 250 в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $60^\circ\text{C}$  с метанолом (50,15 м. д.) в качестве внутреннего стандарта.

Растворы лиофилизовали или упаривали в вакууме. Оптическое вращение измеряли на приборе Perkin — Elmer 141. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 и Whatman 3MM в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) при обнаружении моносахаридов щелочным нитратом серебра. Гель-хроматографию выполняли на колонке (2,5 × 100 см) с сефадексом G-50 в 0,3 % уксусной кислоте. ВЭЖХ проводили на колонке (0,4 × 25 см) с сорбентом Silasorb SPH  $\text{C}_{18}$  (7,5 мкм) в воде. Элюционные кривые строили с помощью дифференциального рефрактомера RIDK 101 (ЧСФР).

Использовали микроорганизм *Y. rohdei* (штамм WA 339), полученный от Г. Ваутерса (Бельгия). Культивирование микроорганизмов и выделение ЛПС проводили как описано ранее [8].

**Выделение *O*-специфического полисахарида.** ЛПС (1 г) гидролизовали 1% уксусной кислотой (100 мл,  $100^\circ\text{C}$ , 3 ч), осадок липида А удаляли центрифугированием (300 мг), раствор упаривали до небольшого объема, гель-хроматографией на сефадексе G-50 выделяли полисахарид, выходящий за свободным объемом колонки (200 мг), и олигосахаридную фракцию (320 мг), которая в дальнейшем не исследовалась.

**Полный кислотный гидролиз.** Полисахарид (2 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (0,5 мл,  $100^\circ\text{C}$ , 3 ч), гидролизат упаривали и анализировали хроматографией на бумаге и ГЖХ в виде ацетатов полиолов [9]. В препаративном варианте гидролиза использовали 20 мг полисахарида и 2 мл кислоты; препаративной хроматографией на бумаге с последующей ВЭЖХ выделили *L*-рамнозу (8 мг),  $[\alpha]_{578}^{20} +6,8^\circ$  (с 0,8, вода), которую метанолизом 1 М хлористым водородом в метаноле (2 мл,  $100^\circ\text{C}$ , 1 ч) превращали в метил-*L*-рамнозид,  $[\alpha]_{578}^{20} -58^\circ$  (с 0,5, вода) (ср. с данными [10]:  $[\alpha]_{578}^{20} -67,3^\circ$  (вода)).

**Метилирование полисахарида** осуществляли по методу [5], избыток иодистого метила удаляли упариванием, метилированный полисахарид выделяли с помощью патрона Sep Pak  $\text{C}_{18}$  (Waters), подвергали формолизу и гидролизу как описано в работе [11]. Продукты расщепления превращали в ацетаты полиолов и анализировали ГЖХ-масс-спектрометрией.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Aleksić S., Steigewalt A. G., Bockemühl J., Huntley-Carter G. P., Brenner D. J. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1987. V. 37. № 4. P. 327—332.
3. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293—297.
4. Сур N., Perlin A. S. // Can J. Chem. 1979. V. 57. № 18. P. 2504—2511.
5. Nakomori S. // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. № 1. P. 205—208.
6. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59—75.
7. Кочетков Н. К., Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Шашков А. С., Липкинд Г. М. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 116—125.
8. Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 156. P. 391—397.
9. Sawardeker J. S., Sloneker H. J., Jeanes A. // Anal. Chem. 1965. V. 37. № 12. P. 1602—1604.
10. Fisher E., Bergmann M., Rabe A. // Chem. Ber. 1920. V. 53. № 11. P. 2362—2388.
11. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. // Биоорганическая химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1851—1859.

Поступила в редакцию  
2.XI.1992

V. A. Zubkov, E. L. Nazarenko, R. P. Gorshkova, Yu. S. Ovodov

STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE  
OF *Yersinia rohdei*

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

An O-specific polysaccharide composed of *L*-rhamnose was obtained on mild acid degradation of the *Yersinia rohdei* lipopolysaccharide. On the basis of methylation studies and <sup>13</sup>C NMR data, the O-specific polysaccharide is shown to be a linear *L*-rhamnan built up of trisaccharide repeating units of the following structure:



The structure was confirmed by calculations with the use of the known glycosylation effect on <sup>13</sup>C chemical shifts.