

полисахарида *Y. pseudotuberculosis* серовара VI. В спектре ¹H-ЯМР выделенной октозы преобладают сигналы β-пиранозной формы: аномерного протона при 4,57 м.д. (д, $J_{1,2}$ 8,2 Гц), протонов метиленового звена (H-3a при 1,7 м.д., дд, $J_{3a, 3e}$ 13 Гц, $J_{3a, 2}$ 11,6 Гц, H-3e при 2,1 м.д., дд, $J_{3e, 2}$ 5,0 Гц), двух метильных групп (H-6 при 1,22 м.д., ЗН, д, $J_{5,6}$ 6,5 Гц; H-2' при 1,24 м.д., ЗН, $J_{1,2}$ 6,5 Гц) и двух протонов, взаимодействующих с метильными группами (H-5 при 4,02 м.д., к; H-1' при 3,78 м.д., к).

Пространственная ориентация гидроксиэтильной группы установлена с помощью эксперимента ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Так, при предоблучении протона H-3a происходит увеличение интегральной интенсивности сигналов протонов H-2, что однозначно указывает на экваториальную ориентацию гидроксиэтильной группы.

¹³C-ЯМР-спектр полученной нерсиннозы содержит сигналы (для β-формы) аномерного атома углерода (99,3 м.д.), сигнал метиленовой группы (35,4 м.д.), сигналы двух метильных групп (C-6 при 13,9 м.д. и C-2' при 16,8 м.д.) и четыре сигнала атомов углерода, относящихся к связанным с кислородом атомам C-2, C-4, C-5, C-1' при 69,0; 75,6; 75,9 и 70,3 м.д. соответственно. По данным ЯМР-спектроскопии, она идентична нерсиннозе А, выделенной из *Y. pseudotuberculosis* серовара VI.

Выделенная нерсинноза превращена в метилгликозиды, из которых препаративной хроматографией на силикагеле выделен β-метиленерсиннозид $[\alpha]_D^{20} -48,2^\circ$ (с 0,1, вода), который по величине удельного оптического вращения наиболее близок к метил-3,6-дидезокси-4-С-(*L*-глицеро-1'-гидроксиэтил)-β-*D*-ксило-пиранозиду ($[\alpha]_D^{20} -53,0^\circ$ (с 0,2, вода)) — одному из четырех синтезированных нами [3] метилгликозидов нерсинноз.

С помощью иммунохимической реакции ингибирования пассивного гемолиза [4] показано, что из четырех синтетических метилгликозидов нерсинноз [3] специфически связываются с антителами против микроба способен только метил-3,6-дидезокси-4-С-(*L*-глицеро-1'-гидроксиэтил)-β-*D*-ксило-пиранозид (дает 20% ингибирования при дозе 500 мкг), что указывает на его антигенное родство с липополисахаридом *Y. frederiksenii* серовара O : 16,29.

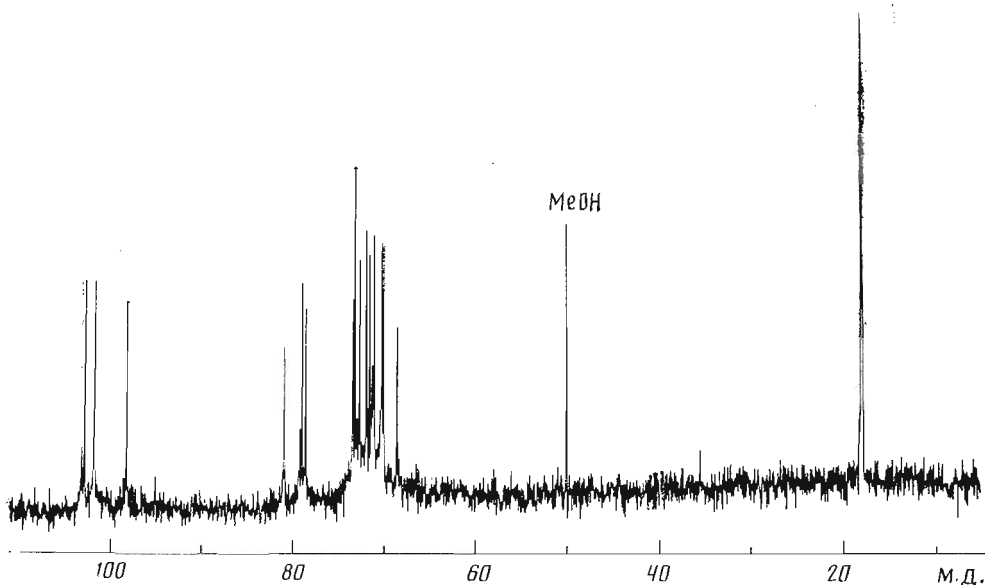
Из вышеприведенных данных следует, что выделенная октоза является 3,6-дидезокси-4-С-(*L*-глицеро-1'-гидроксиэтил)-*D*-ксило-гексозой.

Полисахаридная фракция, полученная при уксуснокислотном гидролизе, подвергнута гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50, при этом первым пиком выходит глюкан с незначительной примесью рамнана, вторая фракция представляет рамнан с незначительной примесью других полисахаридов, и третья соответствует олигосахариду кора с примесью рамнана и глюкана. Вторую фракцию подвергали рехроматографии на колонке с сефадексом G-25. Основная фракция представляет собой рамнан $[\alpha]_D^{20} +56,6^\circ$ (с 0,1, вода), в гидролизате которого с помощью ГЖХ идентифицирована в основном рамноза с незначительным количеством нерсиннозы.

Рамнан тормозит взаимодействие липополисахарида *Y. frederiksenii* серовара O : 16,29 с антисывороткой в реакции ингибирования пассивного гемолиза (дает 50% ингибирования при дозе 80 мкг), в то время как фракция олигосахарида кора неактивна. Это указывает на то, что рамнан, содержащий незначительное количество нерсиннозы, имеет участки связывания с антителами и проявляет серологическую активность.

Для определения абсолютной конфигурации рамнозы ($[\alpha]_D^{20} -6,9^\circ$ (с 0,7, вода)) выделена из гидролизата полисахарида с помощью препаративной бумажной хроматографии и превращена в α-метилрамнопиранозид, индивидуальность которого подтверждена ГЖХ. Полученный α-метилрамнопиранозид имеет $[\alpha]_D^{20} +53,0^\circ$ (с 0,5, вода), что в соответствии с литературными данными [5] указывает на *D*-конфигурацию остатка рамнозы в полисахариде.

Для определения типов замещения *D*-рамнозных остатков полисахарид подвергали метилированию [6], затем метанолизу, метанолизат исследовали методом хромато-масс-спектрометрии, анализируя производные рамнозы в виде частично метилированных метилрамнопиранозидов. В результате



Спектр ^{13}C -ЯМР рамнана, полученного из липополисахарида *Y. frederiksenii* серовара О : 16,29

были идентифицированы 3,4-ди-О-метил- и 2,4-ди-О-метилрамноза в соотношении 1 : 2.

Таким образом, исследуемый полисахарид представляет собой линейный рамнан, в состав которого входят два остатка *D*-рамнозы, замещенной в положение 3, и один остаток *D*-рамнозы, замещенной в положение 2.

В ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида (рисунок, таблица) присутствуют три сигнала аномерных атомов углерода единичной интегральной интенсивности при 103,0; 101,9 и 98,3 м.д. и сигналы при 17,9 и 17,8 м.д. в интегральном соотношении 2 : 1, характерные для метильных групп 6-дезоксисахаров. Кроме того, в спектре наблюдаются 3 сигнала при 81,0; 79,0 и 78,7 м.д., соответствующие неаномерным атомам углерода, соединенным гликозидной связью, а также 9 сигналов в области 68,7–73,5 м.д.

Конфигурация гликозидных связей установлена в результате определения констант спин-спинового взаимодействия аномерных атомов углерода с соответствующими аномерными протонами ($J_{\text{C,H}}$). В ^{13}C -ЯМР-спектре, снятом без подавления взаимодействия ^{13}C - ^1H , найдены КССВ $J_{\text{C,H}}$ 160 Гц для сигнала при 98,3 м.д. и $J_{\text{C,H}}$ 173 и 170 Гц для сигналов аномерных атомов углерода при 103,0 и 101,9 м.д. Следовательно, сигнал при 98,3 м.д. принадлежит β -пиранозиду, а два других — α -пиранозидам [7].

Таким образом, из первичного анализа спектра следует, что рамнан построен из регулярно повторяющихся трисахаридных звеньев, включающих в себя три остатка рамнозы, причем два из них имеют α -, а один —

Химические сдвиги атомов углерода в спектрах ^{13}C -ЯМР (м.д.)

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Рамнан (I)	Звено А	98,3 (98,1) *	71,6 (71,4)	81,0 (81,5)	72,7 (72,5)	73,2 (73,2)	17,9 (18,0)
	Звено Б	103,0 (103,2)	68,7 (68,9)	78,7 (78,4)	72,1 (71,8)	70,1 (70,0)	17,9 (18,0)
	Звено С	101,9 (102,0)	79,0 (79,8)	71,1 (71,3)	73,5 (73,5)	70,3 (70,0)	17,8 (18,0)
Модифицированный рамнан (II)	Звено А	98,6	71,5	81,1	73,1	73,3	17,9
	Звено В	100,5	68,9	78,9	72,1	69,7	17,9
	Звено С	90,3	73,7	60,7	64,1	67,6	19,2

* В скобках приведены расчетные данные.

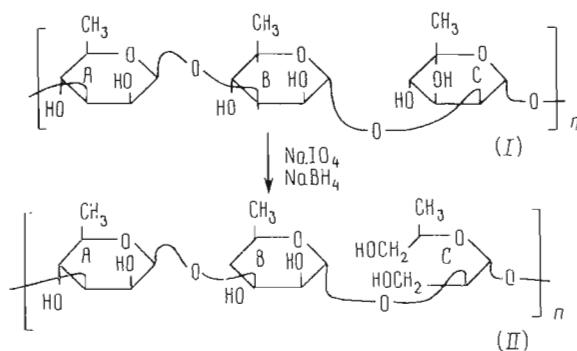
β -конфигурацию гликозидной связи. Невьясненным оставался вопрос о последовательности рамнозных остатков. Результаты по эффектам гликозилирования [8] не позволяют дать однозначного ответа на этот вопрос, так как сигнал с химическим сдвигом 98,3 м.д. ($^1J_{C,H}$ 160 Гц) может принадлежать как 2-О- [9], так и 3-О-замещенному остатку рамнозы [8]. Для решения этой задачи получен модифицированный полисахарид (II) (схема), который был выделен из рамнана путем периодатного окисления с последующим восстановлением натрийборгидридом. В спектре ^{13}C -ЯМР модифицированного рамнана в области резонанса аномерных атомов углерода наблюдаются три сигнала с химическими сдвигами 100,5; 98,6 и 90,3 м.д. Сигнал с химическим сдвигом 98,6 м.д., который практически не изменяется при сравнении со спектром рамнана, указывает на то, что β -конфигурацию имеет 3-О-замещенный остаток рамнозы, причем он гликозилирует другой остаток α -рамнозы в положении 3. На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что повторяющееся звено рамнана имеет структуру (I), приведенную на схеме.

Для подтверждения структуры рамнана использовали компьютерный метод, основанный на расчете с помощью ЭВМ ^{13}C -ЯМР-спектров теоретически возможных линейных регулярных полисахаридов данного моносахаридного состава, исходя из химических сдвигов свободных моносахаридов и средних величин эффектов гликозилирования [10]. Проводили поиск структуры, теоретический спектр которой наиболее близок к экспериментальному. При расчете принималось во внимание, что каждый из остатков может иметь *D*- или *L*-конфигурацию. В результате расчета были найдены четыре структуры (A — D), для которых сумма квадратичных отклонений ($\epsilon\Delta^2$) сигналов расчетного и экспериментального спектров была наименьшей:

- A \rightarrow 3)- β -*D*-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -*D*-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -*D*-Rhap-(1 \rightarrow $\Sigma\Delta^2$ 1,5,
- B \rightarrow 3)- α -*D*-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -*D*-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -*D*-Rhap-(1 \rightarrow $\Sigma\Delta^2$ 2,2,
- C \rightarrow 3)- α -*D*-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -*D*-Rhap-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-Rhap-(1 \rightarrow $\Sigma\Delta^2$ 2,4,
- D \rightarrow 3)- β -*D*-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -*D*-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -*D*-Rhap-(1 \rightarrow $\Sigma\Delta^2$ 3,0.

Структуры B и C не удовлетворяют данным метилирования, а структура D не удовлетворяет величинам КССВ $^1J_{C,H}$ (на основании этих констант сигнал при 98,3 м.д. принадлежит α -аномеру, а при 103,0 м.д. — β -аномеру).

Таким образом, структура A с наименьшей величиной $\Sigma\Delta^2$ является единственной, удовлетворяющей всем полученным данным и совпадающей со структурой (I), приведенной на схеме.



Для определения места привязки концевой персильнозы липополисахарид метилировали, подвергали метанолизу и исследовали методом хромато-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных метилгликозидов. Идентифицированы перметилированная персильноза, 3,4-ди-О-метил-*D*-рамноза, 2,4-ди-О-метил-*D*-рамноза и 4-О-метил-*D*-рамноза в соотношении 0,6 : 1 : 1,4 : 0,6 соответственно и другие метиловые эфиры, относящиеся к глюкану и олигосахариду кора.

Наличие 4-О-метил-*D*-рамнозы в липополисахариде и уменьшение количественного содержания 2,4-ди-О-метил-*D*-рамнозы по сравнению с рам-

се G-50, выделяли: фракция 1 (45 мг) — глюкоан, фракция 2 (95 мг) — рамнан, фракция 3 (120 мг) — олигосахарид кора. Вторую фракцию рехроматографировали на колонке с сефадексом G-25. Собирали фракцию рамнана, идущую за свободным объемом колонки. Выход 50 мг, $[\alpha]_D^{20} +56,6^\circ$ (с 0,11, вода).

Этанольный раствор упаривали (120 мг) и исследовали хроматографией на бумаге.

Препаративной БХ выделено 7 мг иерсиниозы ($R_{\text{Hna}} 1,2$, $[\alpha]_D^{20} -6,1^\circ$ (с 0,6, вода)) и 60 мг низкомолекулярной полисахаридной фракции.

Иерсиниозу (4 мг) обрабатывали 1 М раствором хлористого водорода в метаноле (1 мл, 100°C , 1 ч), получали метилгликозиды иерсиниозы, которые разделяли на пластинке с силикагелем, выделяли β -метил-иерсиниозид (1 мг), $[\alpha]_D^{20} -48,2^\circ$ (с 0,1, вода).

Кислотный гидролиз. Липополисахарид (10 мг) и полисахариды (5 мг) гидролизовали 0,5 н. трифторуксусной кислотой (0,5 мл, 100°C , 3 ч), упаривали 3 раза с метанолом и гидролизат исследовали с помощью бумажной хроматографии. $1/2$ часть гидролизата восстанавливали боргидридом натрия (4 ч при 20°C), ацетиловали и ацетаты полиолов исследовали с помощью ГЖХ.

Рамнан (20 мг) гидролизовали 0,5 н. трифторуксусной кислотой (100°C , 2 ч). Гидролизат упаривали с метанолом 3 раза и подвергали препаративной бумажной хроматографии, соответствующую зону элюировали водой, выделяли 8,5 мг D-рамнозы, $[\alpha]_D^{20} -6,9^\circ$ (с 0,7, вода).

Рамнозу (5 мг) обрабатывали 1 М раствором хлористого водорода в метаноле (1 мл, 100°C , 1 ч), получали 4 мг метил- α -D-рамнопиранозид, $[\alpha]_D^{20} +53,0$ (с 0,5, вода).

Метилирование. Липополисахарид (15 мг) и рамнан (10 мг) метилировали иодистым метилом в присутствии метилсульфиниланиона по методу [4]. Метилированные липополисахарид и рамнан очищали диализом, подвергали метанолизу, ацетиловали и исследовали ацетаты частично метилированных метилгликозидов методом хроматомасс-спектрометрии.

Периодатное окисление. Рамнан (20 мг) растворяли в 0,1 М растворе периодата натрия, выдерживали 65 мин в темноте при комнатной температуре, прибавляли 30 мг боргидрида натрия, выдерживали 4 ч, избыток боргидрида разрушали уксусной кислотой, диализовали, лиофильно сушили. Выход 15 мг.

Ингибирование пассивного гемолиза [4]. В реакции использовали 0,05 М вероналовый буфер (рН 7,2), содержащий 0,15 М NaCl и 1 мг/мл яичного альбумина. К 0,4 мл раствора ингибитора (0,5 мг—1 мг) добавляли 0,1 мл антисыворотки в разведении 1 : 2000. После инкубирования (30 мин, 37°C) добавляли 0,1 мл компонента (разведение 1 : 20) и 0,1 мл 0,25% суспензии сенсibilизированных эритроцитов. Сенсibilизацию эритроцитов барана (1 мл плотного осадка) проводили липополисахаридом (1 мг), предварительно активированным щелочью (0,1 н. NaOH, 90°C , 5 мин). После выдерживания в течение 30 мин при 37°C определяли поглощение сувернатанта при 413 нм.

Авторы благодарят Г. М. Лицкинда и А. С. Шашкова, сотрудников ИОХ АН СССР (Москва), за снятие ^{13}C -ЯМР-спектра рамнана и расчет его структуры на ЭВМ БЭСМ-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gorshkova R. P., Zubkov V. A., Isakov V. V., Ovodov Yu. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 126. P. 308—312.
2. Горшкова Р. П., Зубков В. А., Исаков В. В., Оводов Ю. С. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1146—1147.
3. Зубков В. А., Свиридов А. Ф., Горшкова Р. П., Шашков А. С., Оводов Ю. С. // Биоорг. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 192—198.
4. Konrohr T., Peterffy K. // J. Immunol. Methods. 1976. V. 13. P. 271—277.
5. Fisher E., Bergmann M., Rabe A. // Ber. 1920. B. 53. № 11. S. 2362—2388.
6. Nakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 2. P. 205—208.
7. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans II. 1984. № 3. P. 293—297.

8. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. 173-185.
9. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1851-1859.
10. Липкин Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 833-840.
11. Gorshkova R. P., Kalmykova E. N., Isakov V. V., Ovodov Yu. S. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 150. № 3. P. 527-531.

Поступила в редакцию
6.XII.1988

После доработки
3.V.1989

**STRUCTURAL STUDIES OF SIDE CHAINS OF THE O-SPECIFIC
POLYSACCHARIDE FROM LIPOPOLYSACCHARIDE OF *YERSINIA
FREDERIKSENII*, SEROVAR O : 16,29**

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

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch, Academy of Sciences
of the USSR, Vladivostok*

A branched chain octose, 3,6-dideoxy-4-C-(*L*-glycero-1'-hydroxyethyl)-*D*-xylo-hexose, was isolated from the lipopolysaccharide of *Yersinia frederiksenii*, serovar O: 16,29 and identified as yersiniose A from *Y. pseudotuberculosis*, serovar VI. Mild hydrolysis of the lipopolysaccharide with acetic acid afforded a rhamnan. Structural features of the trisaccharide repeating unit were elucidated on the basis of ¹³C NMR spectral data, methylation studies and periodate oxidation. Using these data as well as data on sugar composition and methylation studies of the lipopolysaccharide, the following structural pattern of the repeating unit of O-specific polysaccharide was proposed:

