



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.114.5.088.53:579.841.11

СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
II (СЭНДВИК) И V (ВЕРДЕР-ЭВАНС), СОДЕРЖАЩИХ N-АЦЕТИЛ-D-
ГАЛАКТОЗАМИНУРОНОВУЮ КИСЛОТУКнирель Ю. А., Кочарова Н. А., Шашков А. С.,
Кочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Производные аминокислот (N-ацетил-L-галактозаминуроновая кислота, N-формил-D-галактозаминуроновая кислота, N-ацетил-D-галактозаминурамид) были найдены ранее в липополисахаридах *Pseudomonas aeruginosa* O1, O2 и O4 (Лани) [1-3]. В настоящем сообщении приведены результаты структурного анализа О-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов *P. aeruginosa* II (Сэндвик) (ПС-1) и V (Вердер-Эванс) (ПС-2) и идентификации в их составе N-ацетил-D-галактозаминуроновой кислоты.

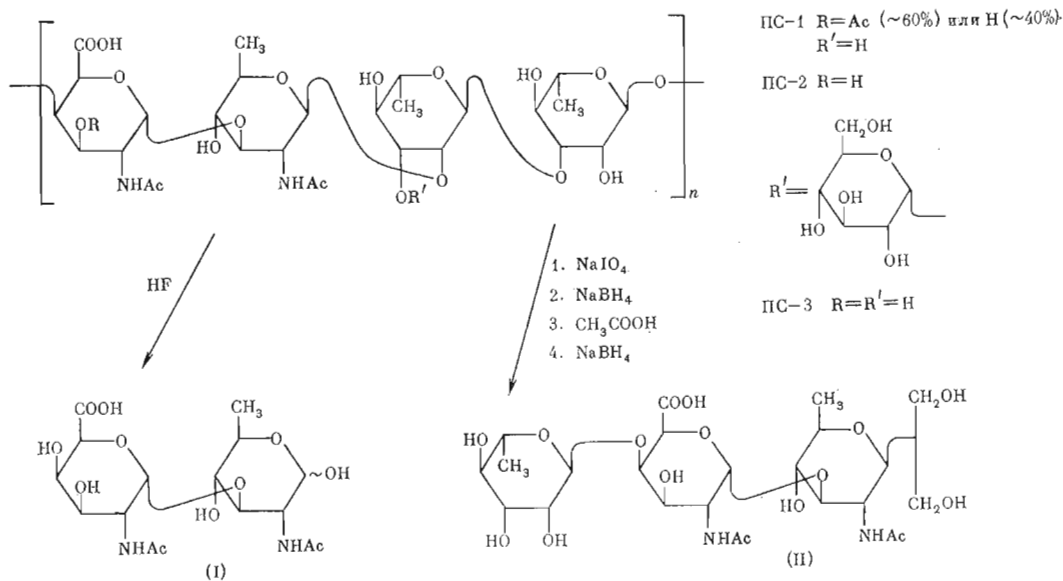
ПС-1 и ПС-2 были получены при расщеплении (1% CH_3COOH , 100° С, 3 ч) соответствующих липополисахаридов, выделенных из бактериальных клеток по методу [4]. Они были кислыми по данным электрофореза на бумаге. При гидролизе ПС-1 (2 М HCl , 100° С, 4 ч) с помощью аминокислотного и углеводного анализатора, хроматографии на бумаге и по данным оптического вращения были идентифицированы D-хиновозамин, галактозаминуроновая кислота и L-рамноза.

^{13}C -ЯМР-спектр ПС-1 указывал на его нерегулярность, наиболее вероятно связанную с присутствием О-ацетильных групп (δ 21,4 м.д., CH_3) в нестехиометрическом количестве. Действительно, при обработке полисахарида 2% водным триэтиламином (60° С, 1,5 ч) был получен О-деацетилированный полимер (ПС-3), который был регулярным по данным ^{13}C -ЯМР-спектра. В спектре ПС-3 присутствовали сигналы метильных групп трех 6-дезоксисахаров при 17,7 м.д., двух гексозаминов (δ 50,7 и 56,0 м.д., оба С2), двух N-ацетильных групп (δ 23,5 и 23,1 м.д., CH_3 ; 175,5 и 175,6 м.д., СО), одной карбоксильной группы при 173,6 м.д., четырех аномерных атомов углерода в области 99,7-103,6 м.д. и 14 сигналов в области 69,2-81,7 м.д. Из этих данных следовало, что ПС-3 построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, включающих два остатка L-рамнозы и по одному остатку N-ацетил-D-хиновозамина и N-ацетилгалактозаминуроновой кислоты.

Анализ ПС-3 методом метилирования [5] с идентификацией частично метилированных моносахаридов в виде ацетатов альдитолов методом хроматомасс-спектрометрии показал, что остаток N-ацетилхиновозамина и один из остатков рамнозы замещены в положение 3, а второй остаток рамнозы замещен в положение 2.

Далее ПС-3 был подвергнут избирательному расщеплению: сольволизу безводным HF (0° С, 1 ч) и распаду по Смиту, которые привели к дисахариду (I) и олигозиду (II) соответственно (схема). По данным ^{13}C -ЯМР-спектра, на восстапавливающем конце дисахариде (I) находится остаток N-ацетилхиновозамина (δ , м.д.: 53,8, С2 α ; 56,5, С2 β ; 91,7, С1 α ; 95,6, С1 β), а на невосстапавливающем — остаток N-ацетилгалактозаминуроновой кислоты (δ , м.д.: 50,3, С2; 99,0, С1). Большая положительная величина оптического вращения этого дисахариде, $[\alpha]_D^{20} +92,5^\circ$ (вода), и анализ эффек-

тов гликозилирования на химические сдвиги ^{13}C остатка *N*-ацетилхинозов-амина [6] доказывали, что галактозаминуриновая кислота имеет *D*-кон-фигурацию.



При периодатном окислении олигозида (II) происходило разрушение остатка рамнозы; следовательно, он находится на невозстанавливаемом конце. *N*-Ацетилгалактозаминуриновая кислота в олигозиде (II) замещена рамнозой в положение 4, как это вытекало, в частности, из сравнения химических сдвигов сигнала С4 этого моносахарида (70,8 и 77,2 м.д.) в ^{13}C -ЯМР-спектрах олигомеров (I) и (II) соответственно (α -эффект гликозилирования [7]). Таким образом, олигозид (II) имеет строение, указанное на схеме, что позволяет определить последовательность моносахаридных остатков в ПС-3.

Путем сравнения ^{13}C -ЯМР-спектра ПС-3 со спектрами олигосахаридных фрагментов (I) и (II) и с литературными данными для подходящих модельных соединений была проведена полная расшифровка этого спектра. На основании значений $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$, определенных из снятого без подавления С, Н-взаимодействий ^{13}C -ЯМР-спектра ПС-3, был сделан вывод, что гликозидная связь *N*-ацетилхинозов-амина имеет β -конфигурацию ($^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 163,6 Гц для сигнала С1 при 103,6 м.д.), а гликозидные связи *N*-ацетилгалактозаминуриновой кислоты и обоих остатков рамнозы имеют α -конфигурацию ($^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 173,3–175,8 м.д. для остальных трех сигналов С1) [8].

И наконец, сравнение ^{13}C -ЯМР-спектров ПС-3 и ПС-1 показало, что заметному смещению подвергаются только сигналы С2–С4 остатка *N*-ацетилгалактозаминуриновой кислоты (от 50,7; 69,2 и 77,2 м.д. в спектре ПС-3 к 49,2; 70,4 и 75,7 м.д. в спектре ПС-1). По величине и направлению эти смещения соответствуют α - и β -эффектам ацетилирования этого моносахарида по С3 [9], что позволяет локализовать *O*-ацетильную группу. Судя по соотношению интегральных интенсивностей сигналов остатка *N*-ацетилгалактозаминуриновой кислоты, несущего и не несущего *O*-ацетильную группу, в спектре ПС-1 степень *O*-ацетилирования составляет ~60%.

При кислотном гидролизе ПС-2 были идентифицированы те же моносахариды, что и при гидролизе ПС-1, и дополнительно в его составе была найдена *D*-глюкоза (соотношение рамноза – глюкоза ~2 : 1). В ^{13}C -ЯМР-спектре ПС-2 сигналы *O*-ацетильных групп отсутствовали. Этот спектр в дополнение к сигналам, присутствующим в спектре ПС-3, содержал сигналы еще одного моносахаридного остатка (глюкозы). Относительно большое значение $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 170,1 Гц для сигнала С1 этого остатка при 95,8 м.д. указывало на то, что глюкоза присоединена α -гликозидной связью [8].

Анализ ПС-2 методом метилирования [5] показал, что он является

разветвленным, остаток глюкозы представляет собой терминальный моносахарид боковой цепи, в узле разветвления лежит остаток рамнозы, замещенный в положение 2 и 3, а второй остаток рамнозы и остаток N-ацетилхинозозамина замещены в положение 3. При распаде ПС-2 по Смигу был получен полимерный продукт, который, по данным ^{13}C -ЯМР-спектра, был идентичен ПС-3. Эти данные позволяют определить место присоединения остатка глюкозы в ПС-2, подтвержденное сравнительным анализом ^{13}C -ЯМР-спектров ПС-2 и ПС-3 (эффекты гликозирования [7]).

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует, что O-специфические полисахариды *P. aeruginosa* II (Сэндвик) и V (Вердер-Эванс) имеют одинаковую по структуре основную цепь и отличаются друг от друга присутствием O-ацетильных групп в первом из них и гликозилированием основной цепи во втором (схема). Полимер с разветвленной цепью впервые найден среди O-специфических полисахаридов *P. aeruginosa*. Полученные данные являются химическим обоснованием включения изученных штаммов *P. aeruginosa* в одну серогруппу O13 в качестве самостоятельных серотипов (O13a, b и O13a, c) в серологической классификационной схеме [10].

Авторы благодарят Е. С. Станиславского (Центральный научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова) за предоставление бактериальной массы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Wilkinson S. G., Tahara Y., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1986, v. 155, № 3, p. 659–669.
2. Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 1, p. 221–227.
3. Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1985, v. 150, № 3, p. 541–550.
4. Вестфаль О., Яни К. В кн.: Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967, с. 325–332.
5. Конрад Г. Е. В кн.: Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975, с. 276–278.
6. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. Carbohydr. Res., 1984, v. 133, № 2, p. 173–185.
7. Gorin P. A. J. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1980, v. 38, p. 13–104.
8. Bock K., Pedersen C. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1974, p. 293–297.
9. Gagnaire D., Mancier D., Vincendon M. Org. Magn. Resonance, 1978, v. 11, p. 344–349.
10. Lányi B., Bergan T. Meth. Microbiol., 1978, v. 10, p. 93–168.

Поступило в редакцию
12.V.1986

STRUCTURES OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAINS OF THE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* II (SANDVIK) AND V (VERDER-EVANS) LIPOLYSACCHARIDES CONTAINING N-ACETYL-D- GALACTOSAMINURONIC ACID

KNIREL Yu. A., KOCHAROVA N. A., SHASHKOV A. S., KOCHETKOV N. K.

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow

Acidic polysaccharides were isolated from the *Pseudomonas aeruginosa* II (Sandvik) and V (Verder-Evans) lipopolysaccharides on mild acid hydrolysis followed by gel filtration on Sephadex G-50. The Sandvik II polysaccharide consists of 2-acetamido-2-deoxy-D-galacturonic acid, 2-acetamido-2,6-dideoxy-D-glucose, and L-rhamnose in the ratio 1:1:2. The Verder-Evans V polysaccharide contained the same monosaccharides and, in addition, a D-glucose residue. On the basis of ^{13}C NMR data, methylation analysis, Smith degradation and solvolysis with hydrogen fluoride, the following structures were determined for the repeating units of the polysaccharides:

