

Рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. holci* 8299

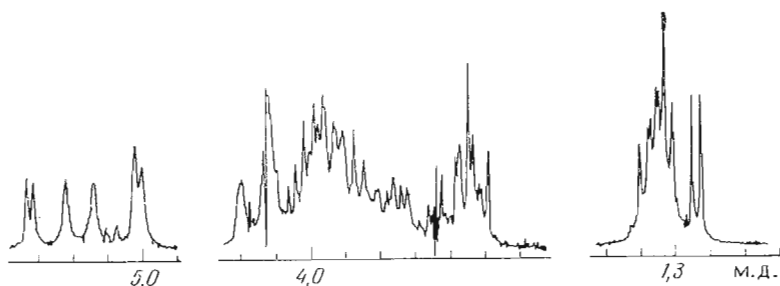


Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. holci* 8299 (область резонанса метильных групп уменьшена в 2 раза)

лисахаридов были практически идентичны друг другу (на рис. 1 приведен один из них), и также близкими были величины их удельного оптического вращения, $[\alpha]_D +78-85^\circ$ (c 0,5). Таким образом, исследуемые полисахариды имеют одинаковый состав и строение, и дальнейшее изучение было проведено на полисахариде *P. syringae*, патовар *atrofaciens* 2399.

В ^1H -ЯМР-спектре полисахарида (рис. 2) присутствовали сигналы пяти метильных групп 6-дезоксахаров при 1,2–1,45 м.д. (дублеты, $J_{5,6}$ 6–6,5 Гц), пяти аномерных протонов при 5,02; 5,04; 5,15; 5,22 м.д. (все уширенные синглеты) и 5,33 м.д. (дублет, $J_{1,2}$ 4,5 Гц), а также остальных протонов в области 3,5–4,5 м.д. ^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (рис. 1) содержал сигналы пяти метильных групп 6-дезоксахаров при 17,7–18,8 м.д., пяти аномерных атомов углерода при 101,8–103,5 м.д. и 20 сигналов остальных углеродных атомов в области 69–86 м.д. Из этих данных следует, что полисахарид является регулярным и построен из повторяющихся пентасахаридных звеньев, содержащих четыре остатка рамнозы (им отвечают четыре уширенных синглета H1 в ^1H -ЯМР-спектре) и один остаток фукозы, причем, судя по константе спин-спинового взаимодействия $J_{1,2}$ 4,5 Гц для сигнала H1 в ^1H -ЯМР-спектре (ср. [4]) и положению сигнала C6 при 18,8 м.д. в ^{13}C -ЯМР-спектре (ср. [5]), этот остаток находится в фуранозной форме.

Для определения типов замещения моносахаридов полисахарид был подвергнут метилированию и полученные частично метилированные моносахариды анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов. В результате были идентифицированы 1,2,5-три-О-ацетил-3,4-ди-О-метилрамнит, 1,3,5-три-О-ацетил-2,4-ди-О-метилрамнит и 1,3,4,5-тетра-О-ацетил-2-О-метилрамнит в соотношении $\sim 2:1:1$, а также незначительные количества 1,4-ди-О-ацетил-2,3,5-три-О-метилфуцита и 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилрамнита. Из этих данных, следует, что полисахарид является разветвленным, в узле разветвления лежит остаток рамнозы, замещенный в положения 3 и 4, а терминальный моносахарид боковой цепи представляет собой остаток фукозы, находящийся в фуранозной форме. Низкое содержание производного фукофуранозы в смеси частично метилированных моносахаридов может быть объяснено его лабильностью в условиях кислотного гидролиза метилированного полисахарида (ср., например, с поведением частично метилированного производно-

Рис. 3. ^1H -ЯМР-спектр полисахарида (I) (область резонанса метильных групп уменьшена в 4 раза)

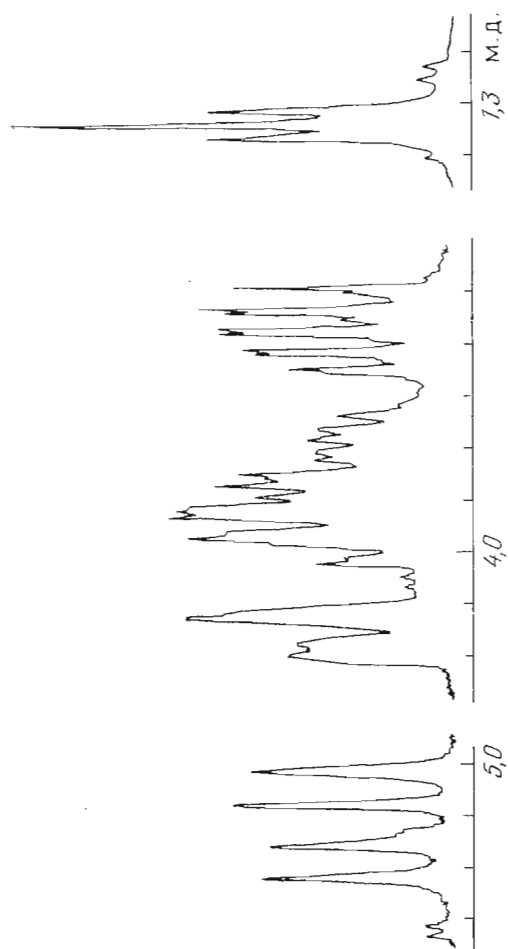


Рис. 4. ^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (I)

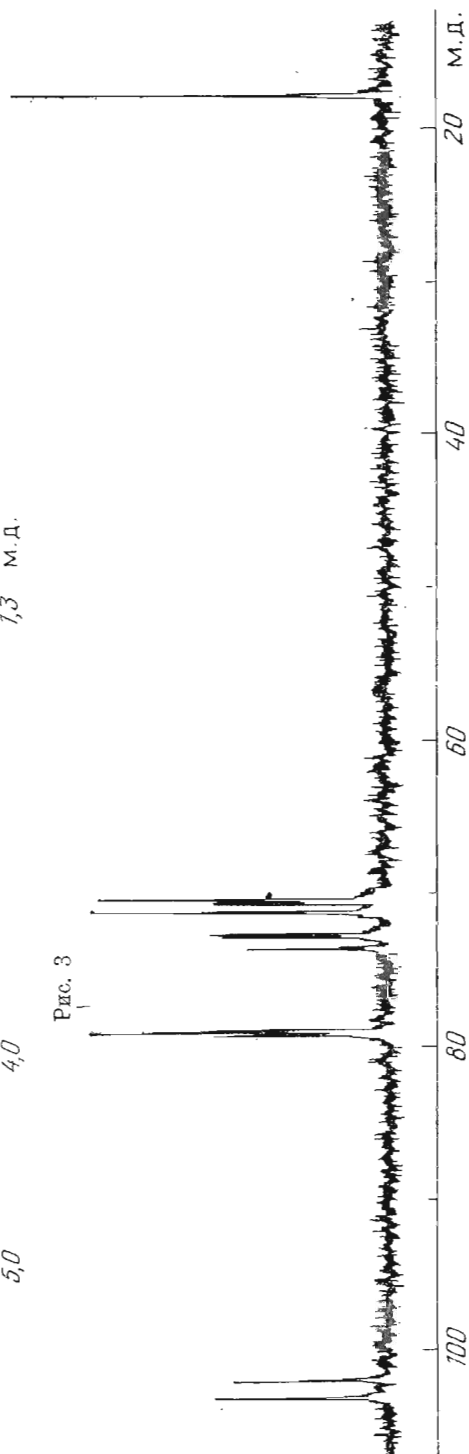


Рис. 3

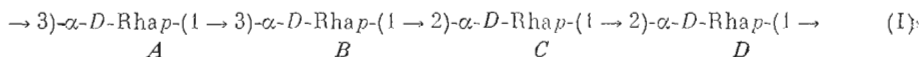
Рис. 4

го галактофуранозы [6]) или неполнотой ацетилирования по О4 [7]. Сполна метилированное производное рамнозы может соответствовать терминальному моносахариду основной цепи или компоненту кора липополисахарида.

Далее полисахарид был подвергнут частичному гидролизу 0,1 М трифторуксусной кислотой, в результате которого был получен полимерный продукт (I) и моносахарид, разделенные гель-хроматографией на геле TSK HW 40. Моносахарид был идентифицирован как фукоза, и на основании величины удельного оптического вращения была установлена ее *D*-конфигурация. Полисахарид (I), по данным кислотного гидролиза, содержал практически только рамнозу. В его ¹H-ЯМР-спектре (рис. 3) присутствовали сигналы четырех метильных групп (H6) при 1,25–1,4 м.д. и четырех аномерных протонов в области 5–5,25 м.д. (уширенные синглеты). ¹³C-ЯМР-спектр полисахарида (рис. 4) содержал сигналы четырех метильных групп (C6) при 17,8 м.д., четырех аномерных углеродных атомов при 101,9–103,1 м.д. и 16 остальных атомов углерода в области 70,4–79,2 м.д. Таким образом, полученный при частичном гидролизе полисахарид представляет собой регулярный рамнан, построенный из тетрасахаридных повторяющихся звеньев.

Константы спин-спинового взаимодействия ¹J_{С₁,H₁}, определенные из снятого без подавления С,Н-взаимодействий ¹³C-ЯМР-спектра модифицированного полисахарида, составляли 168–173 Гц для всех четырех остатков рамнозы. Следовательно, все они паходятся в пиранозной форме и присоединены α-гликозидными связями [8]. Расчет оптического вращения полисахарида по правилу Кляйна [9], результаты которого приведены в табл. 1, показал, что рамноза имеет *D*-конфигурацию.

Структура рамнана (I) была установлена методом ¹H-ЯМР-спектроскопии с использованием ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [11]. ¹H-ЯМР-спектр был расшифрован с использованием селективного гомоядерного двойного резонанса; в частности, были отнесены сигналы H1 всех четырех остатков рамнозы (табл. 2). Затем были определены ЯЭО, возникающие при последовательном предоблучении протонов H1 остатков рамнозы (звеньев А–D). Полученные результаты, приведенные в табл. 3, показали, что рамнан является линейным и два замещенных в положение 3 остатка (звенья А и В) чередуются с двумя остатками рамнозы, замещенными в положение 2 (звенья С и D), что отвечает тетрасахаридному повторяющемуся звену структуры (I):



Эта структура была подтверждена расчетом ¹³C-ЯМР-спектра полисахарида, исходя из химических сдвигов ¹³C α-рамнопиранозы и средних значений эффектов гликозилирования по методу [12, 13]. Расчет для структуры (I) привел к данным, хорошо совпадающим с данными экспериментального ¹³C-ЯМР-спектра полисахарида (сумма квадратов отклонений химических сдвигов сигналов в обоих спектрах друг от друга составляла 2,3). Расчет для альтернативной структуры, в которой звено

Таблица 1

Расчет удельного оптического вращения полисахарида (I) по правилу Кляйна [9]

Соединение	[α] _D , град	M _r	[M] _D , град
Rhapα1-OMe [10]	-67,2	178	-119,6
Полисахарид (I)			
рассчитано для			
4 DRhaα	+81,9	584	+478,4
3 DRhaα, 1 LRhaα	+41,0	584	+239,2
2 DRhaα, 2 LRhaα	0	584	0
Экспериментальное значение	+83,3		

Данные ¹H-ЯМР-спектра полисахарида (I)

Звено	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Наблюдаемая мультиплетность*	КССВ, Гц
-3Rhapα (A)	H1	5,08	с	<i>J</i> _{1,2} 1,5
	H2	4,17	дд	<i>J</i> _{2,3} 3
	H3	3,94	дд	<i>J</i> _{3,4} 9,5
	H4	3,60 ^а	т	<i>J</i> _{4,5} 9,5
	H6 (3 H)	1,32 ^б	д	<i>J</i> _{5,6} 6
-3Rhapα (B)	H1	5,01	с	<i>J</i> _{1,2} 1,5
	H2	4,20	дд	<i>J</i> _{2,3} 3
	H3	3,88	дд	<i>J</i> _{3,4} 9,5
	H4	3,61 ^а	т	<i>J</i> _{4,5} 9,5
	H6 (3 H)	1,32 ^б	д	<i>J</i> _{5,6} 6
2Rhapα (C)	H1	5,16	с	<i>J</i> _{1,2} 1,5
	H2	4,13	дд	<i>J</i> _{2,3} 3
	H3	3,94	дд	<i>J</i> _{3,4} 9,5
	H4	3,52 ^а	т	<i>J</i> _{4,5} 9,5
	H6 (3 H)	1,35 ^б	д	<i>J</i> _{5,6} 6
2Rhapα (D)	H1	5,22	с	<i>J</i> _{1,2} 1,5
	H2	4,12	дд	<i>J</i> _{2,3} 3
	H3	3,99	дд	<i>J</i> _{3,4} 9,5
	H4	3,53 ^а	т	<i>J</i> _{4,5} 9,5
	H6 (3 H)	1,35 ^б	д	<i>J</i> _{5,6} 6

* с — уширенный синглет, д — дублет, т — триплет.
а, б Отнесение может быть обратным.

Таблица 3

Ядерные эффекты Оверхаузера в полисахариде (I), возникающие при предоблучении аномерных протонов

Предоблучаемое звено	Величина эффектов, %					
	Звено A		Звено B		Звено C	Звено D
	H2	H3	H2	H3	H2	H2
-3Rhapα (A)	23			17		
-3Rhapα (B)			10		35	
-2Rhapα (C)					18*	18*
-2Rhapα (D)	8	38				15

* Приведена полусумма эффектов на H2 звеньев C и D.

A или B замещено в положение 4, привел к неудовлетворительным данным (сумма квадратичных отклонений 7,9). Сделанное при расчете отнесение сигналов в экспериментальном ¹³C-ЯМР-спектре, а также химические сдвиги, рассчитанные для полисахарида структуры (I), приведены в табл. 4.

Таким образом, основная цепь исходного полисахарида представляет собой рамнан (I), а остатки фукозы присоединены в виде моносахаридных ответвлений в положение 4 одного из двух замещенных в положении 3 остатков рамнозы (звена A или B). Выбор между этими двумя вариантами был сделан путем детального анализа ¹H-ЯМР-спектра исходного полисахарида. Сравнение области аномерных протонов в этом спектре (рис. 2) и в спектре рамнана (I) (рис. 3) показало, что положения трех из четырех сигналов H1 остатков рамнозы (звеньев B, C и D) практически совпадают в обоих спектрах (5,02; 5,15; 5,22 м.д. и 5,01; 5,16 и 5,22 м.д. соответственно), тогда как сигнал H1 четвертого

Химические сдвиги в ^{13}C -ЯМР-спектрах (δ , м. д.) *

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Полисахарид (I) **						
-3RhapA (A)	103,1 (103,5)	71,3 (71,4)	79,0 (78,8)	72,6 (72,9)	70,4 (70,0)	17,8 (18,0)
-3RhapB (B)	103,0 (103,3)	71,3 (71,4)	79,1 (78,8)	72,8 (72,9)	70,4 (70,0)	17,8 (18,0)
-2RhapC (C)	101,9 (101,9)	79,2 (79,8)	71,3 (71,3)	73,6 (73,5)	70,4 (70,0)	17,8 (18,0)
-2RhapD (D)	102,0 (102,1)	79,2 (79,8)	71,2 (71,3)	73,6 (73,5)	70,6 (70,0)	17,8 (18,0)
Полисахарид (II)						
-3RhapA (A)	103,5	71,4	78,8	72,7	70,3	17,7
-3RhapB (B)	102,8	71,2	78,8	81,5	70,2	18,4
-2RhapC (C)	101,8	79,2	71,2	73,5	70,5	17,8
-2RhapD (D)	102,0	79,2	71,2	73,5	69,2	18,0
FucA (E)	102,7	78,0	76,3	85,5	70,7	18,8
FucA1-OMe **	103,8	78,2	76,2	84,6	71,1	20,1

* Отнесение сигналов, разница между химическими сдвигами которых не превышает 0,5 м. д., может быть обратным.

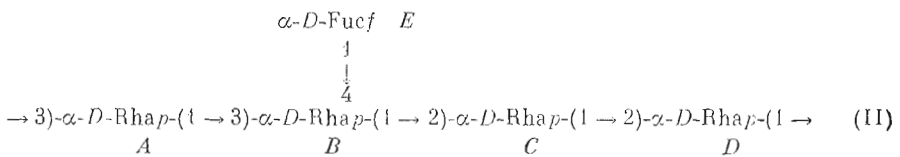
** В скобках приведены данные, рассчитанные по методу [12, 13] для полисахарида структуры (I).

** Химические сдвиги рассчитаны по аддитивной схеме, исходя из данных для метил- α - и - β -D-галактофуранозидов [5] и метил-2-ацетамидо-2,6-дидезокси- β -D-галактофуранозид [14].

остатка рамнозы (звена А) при присоединении остатка фукозы смещается от 5,08 к 5,04 м.д. Это смещение говорит о том, что протон Н1 звена А находится вблизи узла разветвления, т. е. принадлежит остатку рамнозы, гликозилирующему дизамещенный рамнозный остаток. Следовательно, в узле разветвления находится звено В.

В ^{13}C -ЯМР-спектре исходного полисахарида отсутствуют сигналы аномерных атомов углерода в более слабом поле, чем 103,5 м.д., что доказывает α -конфигурацию гликозидной связи остатка фукофуранозы, так как в случае ее β -конфигурации атом С1 этого остатка резонировал бы в более слабом поле, чем 108 м.д. [5].

Таким образом, на основании полученных данных, повторяющееся звено О-специфического полисахарида *P. syringae*, патовар *atrofaciens* 2399, имеет структуру (II)



Эта структура была подтверждена результатами расшифровки ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида (II), которая была проведена путем сравнения со спектром рамнапа (I) и метил- α -фукофуранозид (табл. 4).

Как уже отмечалось, О-специфические полисахариды *P. syringae*, патовар *phaseolicola* 120а, и *P. holci* 8299 идентичны, но данным ^{13}C -ЯМР-спектров и величинам удельного оптического вращения, полисахариду *P. syringae*, патовар *atrofaciens* 2399, и, значит, также имеют структуру (II). Это согласуется с серологической идентичностью их О-антигенов, определившей принадлежность этих штаммов к серогруппе VI [2]. Общность серологических свойств и структуры О-антигенов у различных патоваров фитопатогенных псевдомонад свидетельствует об отсутствии прямой корреляции между этими характеристиками и специализацией по растению-хозяину.

Отметим, что О-специфические полисахариды серогруппы VI имеют такую же по структуре основную цепь, что и полисахариды изученной ранее серогруппы IV [15]. Для липополисахаридов ряда других представителей фитопатогенных псевдомонад также характерны D-рамназы такой же или сходной структуры, а серологическая разнородность определяется природой и местом присоединения моносахаридных ответвлений [16]. Такая близость структурной организации О-антигенов является свидетельством в пользу объединения различных патоваров в составе одного вида *P. syringae* [17]. Кроме основной цепи, построенной из остатков α -D-рамнопиранозы, О-специфический полисахарид серогруппы VI сближает с полисахаридами представителей серогрупп II и III (*P. syringae*, патовар *syringae*, штаммы P-218 и P-55) также присутствие одинаковых боковых цепей в виде остатков α -D-фукофуранозы [1], которые, по-видимому, и обуславливают серологические связи между штаммами этих серогрупп (серологические данные будут опубликованы отдельно).

Экспериментальная часть

Съемка ЯМР-спектров и определение оптического вращения описаны в предыдущем сообщении [1]. Гель-хроматография, анализ методом ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии проводились как ранее [15]. Выращивание бактериальных культур, получение сыворок и серологические тесты, выделение липополисахаридов выполнены как описано в работе [3]; расщепление липополисахаридов и выделение О-специфических полисахаридов, кислотный гидролиз и метилирование см. в работе [1].

Частичный кислотный гидролиз полисахарида проводили 0,1 М трифторуксусной кислотой (100° С, 2 ч), продукты разделяли гель-хроматографией на геле TSK HW 40, получили полисахарид (I) и D-фукозу, $[\alpha]_D^{+65,8^\circ}$ (с 0,15), ср. с данными [18] для L-Фукозы, $[\alpha]_D^{-75,02^\circ}$ (вода).

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Здорovenko Г. М., Шашков А. С., Маман С. С., Яковлева Л. М., Соляник Л. П., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 82-91.
2. Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д. // Микробиол. журн. 1979. Т. 41. № 4. С. 330-339.
3. Здорovenko Г. М., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. П., Захарова И. Я., Кошечкина Л. Н. // Микробиол. журн. 1982. Т. 44. № 2. С. 65-70.
4. Anguyl S. J. // Carbohydr. Res. 1979. V. 77. № 1. P. 37-50.
5. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27-65.
6. Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hofman J. L. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 50. № 3. P. 539-547.
7. Hofman J., Lindberg B., Hofstad T., Lygre H. // Carbohydr. Res. 1977. V. 41. № 2. P. 439-442.
8. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293-297.
9. Klyne W. // J. Biochem. 1950. V. 46. № 4. P. xli-xlii.
10. Fisher E., Bergmann M. // Ber. 1920. B. 53. № 11. S. 2362-2388.
11. Keller R. M., Wüthrich H. // Biol. Magn. Reson. 1981. V. 3. P. 1-52.
12. Липкин Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 833-841.
13. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1987. In press.
14. Knirel Y. A., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 3. P. 639-652.
15. Книрель Ю. А., Здорovenko Г. М., Дашунин В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Гвоздяк Р. И., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1253-1262.
16. Zdorovenko G. M., Yakovleva L. M., Gubanov N. Y., Solyanik L. P., Zakharova I. Y., Gvozdyuk R. I., Knirel Y. A., Dashunin V. M. // Abstr. Pap. 3rd Bratislava Symp. Saccharides. Bratislava, 1986. P. 46-46a.
17. Palleroni N. // Bergcy's manual of systematic bacteriology. V. 1 // Ed. Holt J. C. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. P. 141-199.
18. Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J. // The monosaccharides/Eds Ernest I., Hebký J. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Science, 1963. P. 434.

Поступила в редакцию
17.III.1987

