

Рис. 1

Рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектр
O-специфического поли-
сахарида *P. syringae*, па-
товар *syringae*

Рис. 2. Гель-хроматогра-
фия на геле TSK HW 40
продуктов распада по
Смиту O-специфическо-
го полисахарида

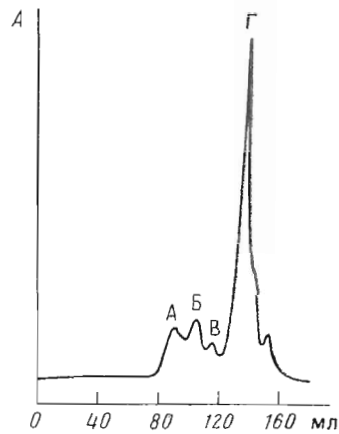


Рис. 2

ции торможения пассивной гемагглютинации 0,48 мкг/мл для липополисахарида и 62,5 мкг/мл для полисахарида). В тесте Оухтерлони у полисахарида выявлялась только одна линия преципитации.

По данным кислотного гидролиза, в состав полисахарида входят рамноза и 3-ацетидамо-3,6-дидезоксигалактоза, которые были идентифицированы методом хроматографии на бумаге и ГЖХ-масс-спектрометрии сравнением с заведомыми образцами. Рамноза была выделена из гидролизата с помощью препаративной хроматографии на бумаге, и на основании величины удельного оптического вращения полученного из нее метилрамнозида была установлена *L*-конфигурация этого моносахарида. Абсолютная конфигурация аминсахара была определена при анализе олигосахаридных фрагментов полисахарида методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии (см. ниже).

В ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида (рис. 1) присутствовали сигналы метильных групп (С6) остатка 3-амино-3,6-дидезоксигалактозы при 16,3 м.д. и четырех остатков рамнозы при 17,8–18,1 м.д., одной *N*-ацетильной группы (CH_3 при 23,2 м.д. и CO при 175,6 м.д.), пяти аномерных атомов углерода в области 97–103 м.д., одного углеродного атома, свя-

занного с азотом, при 52,4 м.д. (С3 аминсахара) и 19 атомов углерода, связанных с кислородом, в области 67–80 м.д. Некоторые сигналы спектра имели некратные интегральные интенсивности, были несимметричны или имели «плечи», что давало основание предполагать присутствие дополнительной серии сигналов меньшей интенсивности, перекрывающихся или частично перекрывающихся с сигналами основной серии спектра. Таким образом, полисахарид построен в основном из пентасакхаридных звеньев, включающих четыре остатка рамнозы и один остаток 3-ацетиамидо-3,6-дидезоксигалактозы, и, по-видимому, некоторого количества звеньев другой структуры, т. е. он не обладает истинно регулярной структурой.

В ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида, снятом без подавления С,Н-взаимодействий, были определены константы спин-спинового взаимодействия сигналов аномерных атомов углерода. Величины всех этих констант находились в интервале 169–171 Гц. Следовательно, гликозидные связи всех моносахаридных остатков в полисахариде имеют α -конфигурацию [5].

При анализе полисахарида методом метилирования были обнаружены 3,4-ди-О-, 2,4-ди-О- и 4-О-метилрамнозы в соотношении $\sim 1:2,5:1$, которые были идентифицированы методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов [6]. Кроме того, было обнаружено соответствующее производное 2,4-ди-О-метил-3-(N-метил)ацетиамидо-3,6-дидезоксигалактозы, идентифицированное сравнением его масс-спектра со спектром заводского образца [1]. Таким образом, полисахарид является разветвленным, терминальным моносахаридом боковой цепи является остаток 3-ацетиамидо-3,6-дидезоксигалактозы, в узле разветвления лежит остаток рамнозы, замещенный в положения 2 и 3, а остальные остатки рамнозы монозамещенные в положение 2 или 3.

Далее полисахарид был подвергнут распаду по Смиту, и продукты были разделены гель-хроматографией на геле TSK HW 40 (рис. 2). По данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров (табл. 1 и 2), наиболее низкомолекулярная фракция Г представляет собой олигосахарид, включающий три остатка рамнозы, остаток 3-ацетиамидо-3,6-дидезоксигалактозы и остаток глицерина. Анализ этого олигосахаридного продукта методом метилирования привел к идентификации 2,3,4-три-О-метилрамнозы, 2,4-ди-О-метилрамнозы, 4-О-метилрамнозы и 2,4-ди-О-метил-3-(N-метил)ацетиамидо-3,6-дидезоксигалактозы. Таким образом, олигосахарид (I), образовавшийся в результате расщепления полисахаридной цепи по местам окислившихся периодатов замещенных в положение 2 остатков рамнозы, является разветвленным.

Для установления полной структуры олигосахарид (I) был подвергнут повторному распаду по Смиту, и образовавшийся при этом олигосахарид (II) третьим расщеплением по Смиту был превращен в олигосахарид (III). Строение этих олигосахаридов было установлено методом ^1H -ЯМР-спектроскопии с использованием ядерных эффектов Оверхаузера (ЯЭО). ^1H -ЯМР-спектры олигомеров (I)–(III) были расшифрованы с помощью селективного гомоядерного двойного резонанса (табл. 1) и были определены ЯЭО (6–9%), возникающие при последовательном облучении аномерных протонов. Во всех олигосахаридах предоблучение H1 одного из остатков рамнозы (звена C) вызывало ЯЭО на H2 остатка глицерина (звена D), а предоблучение H1 остатка 3-ацетиамидо-3,6-дидезоксигалактозы (звена E) приводило к ЯЭО на H2 и H3 звена C, что указывало на 1 \rightarrow 3-связь между звеньями E и C и одновременно на D-конфигурацию аминсахара [4, 7]. При предоблучении H1 второго остатка рамнозы (звена B) в олигосахаридах (I) и (II) наблюдались ЯЭО на H2 звена C. Следовательно, эти олигомеры являются разветвленными. И наконец, предоблучение третьего остатка рамнозы (звена A) в олигосахаридах (I) вызывало ЯЭО на H3 звена B. Из этих данных вытекает, что олигосаха-

Данные ^1H -ЯМР-спектров

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Наблюдаемая мультиплетность	КССВ, Гц
Олигосахарид (III)				
Fuc3NA α (E)	H1	5,14	д	$J_{1,2}$ 4,0
	H2	3,95	дд	$J_{2,3}$ 11,6
	H3	4,35	дд	$J_{3,4}$ 3,3
	H4	3,85	д	$J_{4,5}$ <1
	H5	4,49	дк	$J_{5,6}$ 6,8
-3Rha α (C)	H6 (3H)	1,26	д	
	H1	5,11	д	$J_{1,2}$ 1,7
	H2	4,27	дд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	3,96	дд	$J_{3,4}$ 9,7
	H4	3,68	т	$J_{4,5}$ 9,7
-2Gro (D)	H5	3,99	дк	$J_{5,6}$ 6,4
	H6 (3H)	1,40	д	
	H2	3,88	м	
Олигосахарид (II)				
Fuc3NA α (E)	H1	5,09	д	$J_{1,2}$ 3,8
	H2	3,94	дд	$J_{2,3}$ 11,4
	H3	4,28	дд	$J_{3,4}$ 3,2
	H4	3,80	д	$J_{4,5}$ <1
	H5	4,40	дк	$J_{5,6}$ 6,7
	H6 (3H)	1,21	д	
Rha α (B)	H1	5,13	д	$J_{1,2}$ 2,0
	H2	4,08	дд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	3,83	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,47	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H5	3,77	м	
-2,3Rha α (C)	H6 (3H)	1,30	д	$J_{5,6}$ 6,3
	H1	5,15	д	$J_{1,2}$ 2,0
	H2	4,23	дд	$J_{2,3}$ 3,1
	H3	4,00	дд	$J_{3,4}$ 9,8
	H4	3,68	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H5	3,95	м	
-2Gro (D)	H6 (3H)	1,36	д	$J_{5,6}$ 6,3
	H2	3,79	м	
Олигосахарид (I)				
Fuc3NA α (E)	H1	5,10	д	$J_{1,2}$ 3,5
	H2	3,95	дд	$J_{2,3}$ 11
	H3	4,27	дд	$J_{3,4}$ 3
	H4	3,81	дд	$J_{4,5}$ 1,4
	H5	4,42	дк	$J_{5,6}$ 6,5
	H6 (3H)	1,22	д	
Rha α (A)	H1	5,09	д	$J_{1,2}$ 1,7
	H2	4,11	дд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	3,89	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,50	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H6 (3H)	1,37 *	д	$J_{5,6}$ 6
	-3Rha α (B)	H1	5,17	д
H2		4,17	дд	$J_{2,3}$ 3,3
H3		3,90	дд	$J_{3,4}$ 9,5
H4		3,58	т	$J_{4,5}$ 9,5
H6 (3H)		1,32 *	д	$J_{5,6}$ 6
-2,3Rha α (C)	H1	5,16	д	$J_{1,2}$ ~2
	H2	4,23	дд	$J_{2,3}$ 3,1
	H3	3,99	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,68	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H6 (3H)	1,32 *	д	$J_{5,6}$ 6
-2Gro (D)	H2	3,85	м	

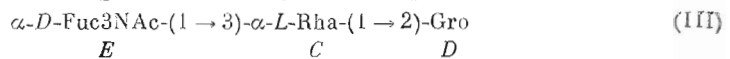
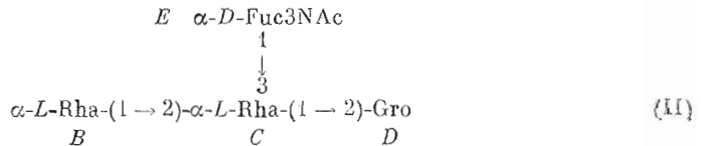
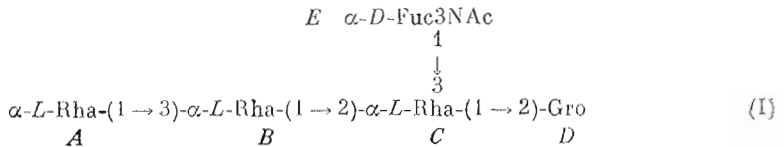
* Отнесение может быть обратным.

Данные ^{13}C -ЯМР-спектров (δ, м. д.) *

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Олигосахарид (III)						
Fuc3NAcα (E)	96,7	67,2	52,4	71,7	68,1	16,3
-3Rhaα (C)	100,2	68,5	77,2	71,6	70,1	17,9
-2Gro (D)	61,5	79,6	62,6			
Олигосахарид (II)						
Fuc3NAcα (E)	96,4	66,9	52,4	71,8	68,1	16,5
Rhaα (B)	103,0	71,3	71,3	73,3	70,4	17,9
-2,3Rhaα (C)	99,7	75,6	76,2	71,6	70,3	18,0
-2Gro (D)	61,9	79,9	62,6			
Олигосахарид (I)						
Fuc3NAcα (E)	97,3	67,0	52,4	72,2	68,1	16,3
Rhaα (A)	103,3	71,5	71,4	73,3	70,5	17,8
-3Rhaα (B)	102,8	71,2	78,8	72,7	70,1	17,8
-2,3Rhaα (C)	99,5	76,4	77,4	71,6	70,2	18,0
-2Gro (D)	61,9	79,8	62,6			
Полисахарид (IV)						
Fuc3NAcα (E)	97,1	67,1	52,4	72,2	68,1	16,3
-3Rhaα (A)	103,0	71,2	79,1	72,7	70,3	17,9
-3Rhaα (B)	102,6	71,2	79,3	72,8	70,3	17,8
-2,3Rhaα (C)	101,9	75,8	77,1	71,6	70,5	18,1
-2Rhaα (D)	101,9	78,7	71,2	73,6	70,5	17,9

* Сигналы C1 — C6 остатка 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозы и C1 — C4 остатков рамнозы в спектрах олигосахаридов (I) и (II) отнесены с использованием селективного гетероядерного двойного резонанса $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$; в остальных случаях отнесение сигналов, разница между химическими сдвигами которых не превышает 0,5 м. д., может быть обратным.

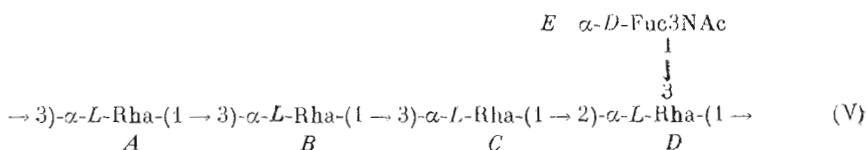
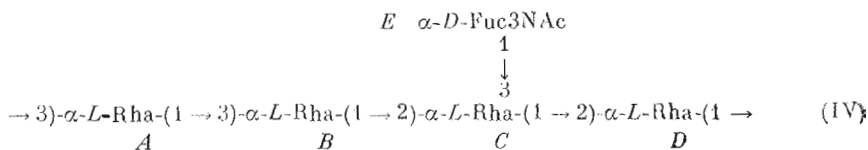
риды (I) — (III) имеют следующие структуры:



Эти структуры были подтверждены данными ^{13}C -ЯМР-спектров (табл. 2), которые были расшифрованы с использованием селективного гетероядерного двойного резонанса $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$. Относительно небольшой α -эффект на C1 остатка 3-ацетамидо-3,6-дидезоксигалактозы (~3,5 м.д.) и относительно большой (по модулю) β -эффект гликозилирования на C2 замещаемого им в положении 3 остатка рамнозы (~3 м.д.) в олигосахариде (III) характерны для различной абсолютной конфигурации этих пиранозных остатков, связанных α -гликозидной связью [8], что еще раз подтверждает D-конфигурацию аминсахара.

Строение олигосахаридов (I) однозначно определяет структуру (IV) пентасахаридных звеньев исходного полисахарида, из которых этот олигосахарид образуется при распаде по Смитту. Эта структура согласуется с результатами метилирования (см. выше) и с отнесением сигналов доминирующей серии в ^{13}C -ЯМР-спектре исходного полисахарида (табл. 2),

которое было проведено путем сравнения со спектром олигосахарида (I).



По данным ^1H -ЯМР-спектров, выделенные при распаде по Смитту фракции А—В (рис. 2) имеют такой же моносахаридный состав, что и исходный полисахарид. ^1H -ЯМР-спектр наиболее высокомолекулярной из них фракции А был идентичен спектру полимера, полученного при распаде по Смитту О-специфического полисахарида *Pseudomonas holci* 8300 [1]. Для этого полимера была установлена структура (V) [1]. Следовательно, такую же структуру имеет полисахарид фракции А. Фракции В и С, по данным ^1H -ЯМР-спектров и времени удерживания при геле-хроматографии на геле TSK HW 40, были аналогичны соответствующим олигосахаридным фрагментам, выделенным при распаде по Смитту полисахарида *P. holci* 8300 [1]. Таким образом, их образование является, очевидно, результатом присутствия в исходном полисахариде смешанных участков, включающих неокисляющиеся периодатом пентасахаридные звенья структуры (V) и пептасахаридные звенья структуры (IV), за счет периодатного окисления которых происходит разрыв цепи исходного полисахарида. Присутствие звеньев структуры (V) хорошо объясняет происхождение минорной серии сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектре исходного полисахарида (ср. с данными [1]), причем, судя по соотношению интенсивностей сигналов основной и минорной серий, а также по результатам метилирования и распада по Смитту, количество пентасахаридных звеньев структуры (IV) в ~ 3 раза превышает количество звеньев структуры (V).

Таким образом, О-специфический полисахарид *P. syringae*, патовар *syringae* 281, построен из пентасахаридных звеньев структуры (IV) и (V), отличающихся друг от друга только типом замещения одного из остатков рамнозы (в положение 2 или 3 соответственно). Аналогично из пентасахаридных звеньев двух типов построен и О-специфический полисахарид *P. holci* 8300 [1], причем присутствующие в меньшем количестве звенья в обоих полисахаридах имеют структуру (V), а основные звенья отличаются друг от друга только местом присоединения к рамнановой цепи остатков 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы (к звену С или D). Судя по значительно меньшему содержанию фракции А в продуктах распада по Смитту, для полисахарида *P. syringae*, патовар *syringae* 281, менее характерны длинные участки цепи, построенные из пентасахаридных звеньев структуры (V), которые в полисахариде *P. holci* 8300 включали большую часть от общего числа таких звеньев [1]. Наличие в О-специфических полисахаридах одинаковых «ветвящихся» заместителей (остатков 3-ацетида-3,6-дидезоксигалактозы) и, кроме того, одинаковых по структуре пентасахаридных звеньев (V), очевидно, обуславливает серологическое родство между штаммами *P. syringae*, патовар *syringae* 281, и *P. holci* 8300, послужившее основой для их объединения в классификационной схеме [3] в серогруппу I.

О-Специфический полисахарид неатипового штамма *P. syringae*, патовар *syringae* 281, отличается по моносахаридному составу и структуре от ранее изученных [2] полисахаридов других штаммов этого патовара (218 и P-55), относящихся к серогруппам II и III соответственно. Так, основные цепи у этих полисахаридов представлены регулярным $\alpha\text{-D}$ -рамнаном, построенным из трисахаридных повторяющихся звеньев, а в качестве

«ветвящего» моносахаридного заместителя у них выступают остатки α -D-фукофуранозы (друг от друга полисахариды штаммов 218 и P-55 отличаются только степенью замещения основной цепи остатками фукозы, достигающей 30 и 85% соответственно). Таким образом, эти данные в очередной раз показывают отсутствие у фитопатогенных псевдомонад прямой корреляции между строением O-антигенов и специализацией по растению-хозяину.

Экспериментальная часть

Общие методы, выделение липополисахарида и полисахарида, проведение кислотного гидролиза и метилирования описаны в предыдущем сообщении [1]. Выход полисахарида составил ~40% от веса липополисахарида, $[\alpha]_D -5,3^\circ$ (с 1).

Распад по Смигу. Полисахарид (30 мг) окисляли 0,1 М периодатом натрия (2 мл, 20° С, 2 сут в темноте), обрабатывали и разделяли как описано в работе [1], получили фракции А-В (по ~2-3 мг) и Г (~17 мг), $[\alpha]_D +19,7^\circ$ (с 0,5). Аналогичное окисление олигосахаридов (I) — вещества фракции Г, без стадии восстановления натрийборгидридом после гидролиза уксусной кислотой, привело к олигосахариду (II) (12 мг), $[\alpha]_D +40,6^\circ$ (с 0,3), окислением которого в тех же условиях был получен олигосахарид (III) (5 мг), $[\alpha]_D +81,1^\circ$ (с 0,15).

ЛИТЕРАТУРА

1. Кширель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Яковлева Л. М., Губанова Н. Я., Гвоздяк Р. И. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 172-179.
2. Кширель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Мамян С. С., Яковлева Л. М., Соляник Л. П., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 82-91.
3. Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д. // Микробиол. журн. 1979. Т. 41. № 4. С. 330-339.
4. Здоровенко Г. М., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И., Захарова И. Я., Кошечкина Л. И. // Микробиол. журн. 1982. Т. 44. № 2. С. 65-70.
5. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293-297.
6. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönnngren J. // Chem. Commun. Stockholm Univ. 1976. № 8. P. 1-75.
7. Мамян С. С., Липкинд Г. М., Шашков А. С., Байрамова Н. Э., Николаев А. В., Кошечков Н. К. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 205-215.
8. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. 173-185.

Поступила в редакцию
25.V.1987

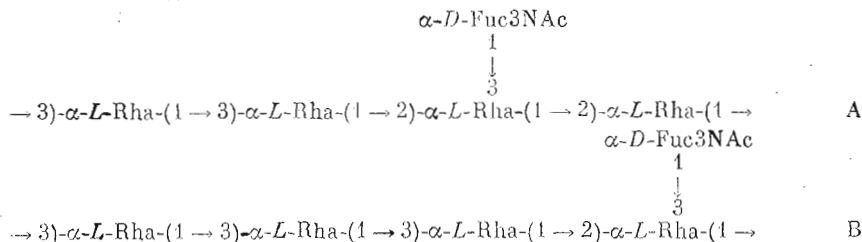
ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 30. STRUCTURE OF THE POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* 281 (SEROGROUP I) LIPOPOLYSACCHARIDE

KNIREL Y. A., ZDOROVENKO G. M.*, SHASHKOV A. S.,
MAMYAN S. S., GUBANOVA N. Y.*, YAKOVLEVA L. M.*,
SOLYANIK L. P.*

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

* *D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev*

O-Specific polysaccharide chain of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 281 (neotype strain, ACTC 19340) contains residues of L-rhamnose and 3-acetamido-3-deoxy-D-fucose in the ratio 4:1. On the basis of methylation, Smith degradation, and ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy, it was concluded that the polysaccharide is mainly built up of pentasaccharide units of A type and also includes ~25% pentasaccharide units of B type.



B units possess the same structure as minor constituent units of the *Pseudomonas holci* 8300 O-specific polysaccharide, whereas predominant units of both polysaccharides differ from each other only by the site of attachment of 3-acetamido-3-deoxyfucose residues to the rhamnan backbone.