



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.114.5.088:579.842.17

СТРУКТУРА O-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *Proteus mirabilis* O27, СОДЕРЖАЩЕГО АМИНОКИСЛОТЫ И ФОСФОЭТАНОЛАМИНВиноградов Е. В., Петрашкин Д. \*, Шапков А. С.,  
Книрель Ю. А., Кочетков Н. К.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва;  
\*Институт микробиологии Университета Лодзи

Настоящая работа продолжает изучение O-антигенных липополисахаридов *Proteus* [1, 2] и посвящена установлению строения O-специфической полисахаридной цепи липополисахарида *Proteus mirabilis* O27.

Ранее [3] было найдено, что в состав этого полисахарида входят уроновые кислоты, N-ацетил-D-глюкозамин, L-лизин, L-аланин, этаноламин и фосфат. Глюкуроновая и галактуроновая кислоты были идентифицированы в гидролизате полисахарида (4 M HCl, 100° C, 3 ч) с помощью углеводного анализатора. Их D-конфигурация была определена окислением глюкозы и галактозы, образующихся при их восстановлении по карбоксильным группам, соответствующими оксидазами [1].

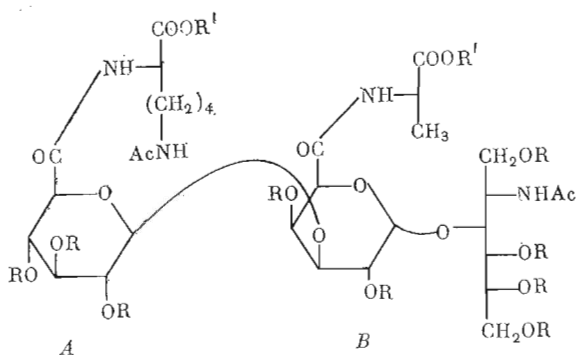
<sup>13</sup>C-ЯМР-спектр полисахарида содержал сигналы 4 аномерных атомов углерода при 98,7–105,1 м.д., 14 атомов углерода, связанных с кислородом, в области 68,2–82,5 м.д., 2 атомов углерода аминосахаров, связанных с азотом, при 55,2 и 56,8 м.д., 2 атомов C6 гексааминов при 61,9 и 65,4 м.д., 2 атомов C6 гексураамидов при 170,3 и 170,5 м.д., а также сигналы остатков лизина, аланина, этаноламина (по одному) и 2 N-ацетильных групп (таблица).

Сигналы остатка этаноламина при 63,2 и 41,5 м.д. и C5 и C6 одного из гексааминов при 75,4 и 65,4 м.д. были расщеплены вследствие взаимодействия атомов углерода с атомом фосфора.

Из этих данных следовало, что полисахарид построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих 2 остатка N-ацетилглюкозамина, по одному остатку глюкуроновой и галактуроновой кислот, лизина, аланина, этаноламина и фосфата, причем остаток этаноламина присоединен фосфодиэфирной связью к первичноспиртовой группе одного из остатков N-ацетилглюкозамина. Положение единственного сигнала в <sup>31</sup>P-ЯМР-спектре полисахарида при 1,33 м.д. подтверждало присутствие фосфодиэфирной группы. Присоединение лизина и аланина своими α-аминогруппами к карбоксильным группам уроновых кислот было показано ранее [3].

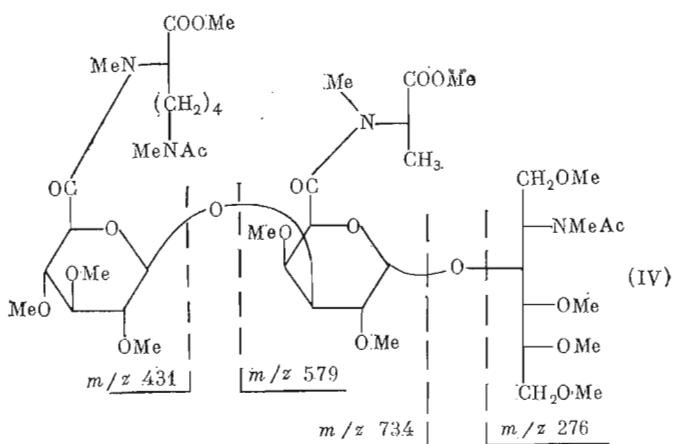
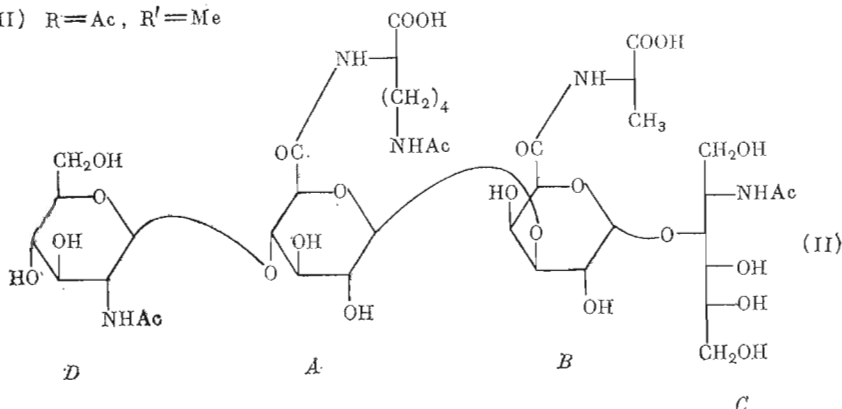
Сольволиз полисахарида безводным HF при 20° C привел к трисахаридному фрагменту в качестве единственного олигомерного продукта, а при 0° C был получен тетрасахаридный фрагмент наряду с более высокомолекулярными продуктами. Оба олигосахариды были выделены гель-хроматографией на геле TSK HW 40, восстановлены NaBH<sub>4</sub> и N-ацетилированы (Ac<sub>2</sub>O в водном NaHCO<sub>3</sub>) по ε-аминогруппе лизина с образованием олигосахаридов (I) и (II). По данным <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров (таблица), трисахарид (I) содержит остаток N-ацетилглюкозаминитола, 2 остатка уроновых кислот, по одному остатку лизина и аланина, а тетрасахарид (II) в допол-

нение к этим компонентам включает остаток N-ацетилглюкозамина; фосфоэтаноламин в составе этих олигомеров отсутствовал.



(I)  $R=R'=H$

(III)  $R=Ac, R'=Me$



Анализ трисахарид (I) методом метилирования показал, что остаток N-ацетилглюкозаминитола и один из остатков уроновой кислоты замещены в положение 3, а второй остаток уроновой кислоты является терминальным. Трисахарид (I) был этерифицирован действием  $CH_2N_2$  и O-ацетилирован ( $Ac_2O$  в пиридине). Исследование полученного производного (III) методом  $^1H$ -ЯМР-спектроскопии показало, что в нем присутствует фрагмент  $\beta$ -GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)-GalA. Для определения мест присоединения лизина и аланина трисахарид (I) был превращен в сполна метилированное производное (IV). В масс-спектре этого производного присутствовали пики ионов первичных фрагментов с  $m/z$  1027 ( $[M+H]^+$ ), 1026 ( $[M]^+$ ), 734 (биозил-катион), 579, 431 (гликозил-катион) и 276 (см. схему). Наличие

ионов с  $m/z$  579 и 431 однозначно указывало на присоединение лизина к остатку глюкуроновой кислоты и аланина — к остатку галактурановой кислоты (при обратном расположении вместо этих ионов наблюдались бы ионы с  $m/z$  692 и 328).

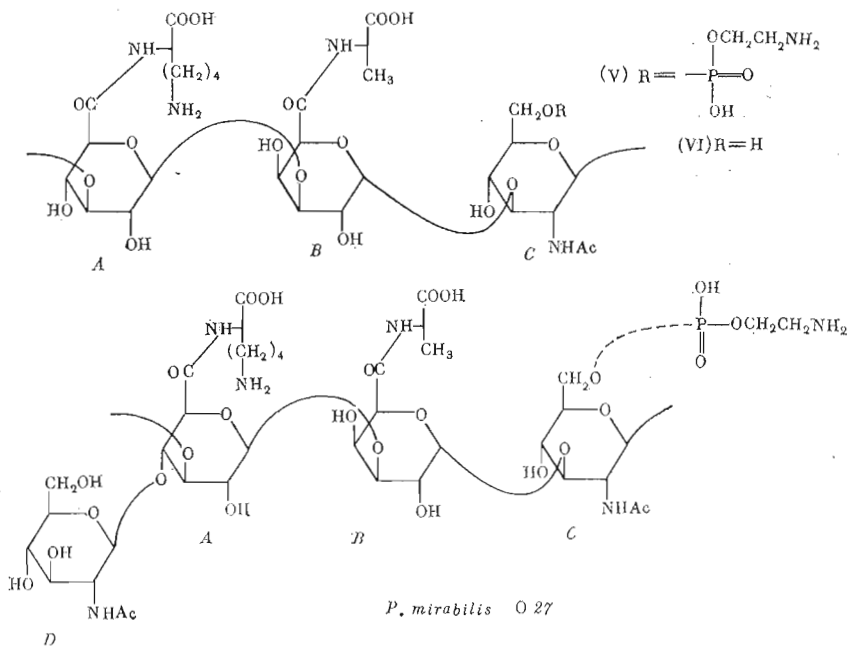
Полная расшифровка  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров олигосахаридов (I) и (II) с учетом полученных данных и данных по эффектам гликозилирования [4] позволила установить их полные структуры.

Ранее [3] было показано, что полисахарид является разветвленным и один из остатков N-ацетилглюкозамина занимает терминальное положение в боковой цепи. Распад полисахарида по Смитту привел к удалению этого остатка и образованию линейного полисахарида, содержащего все остальные компоненты исходного полимера. В этом полисахариде, по данным  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра, наряду со звеньями (V), содержащими фосфоэтаноламины, присутствуют также звенья (VI), не содержащие этого компонента; их соотношение равно 4:1. Основное различие между подспектрами фосфорилированных и нефосфорилированных звеньев заключается в изменении положения сигналов C4, C5 и C6 остатка N-ацетилглюкозамина (71,7; 75,5 и 65,6 м.д. в звеньях (V) и 72,1; 76,6 и 62,0 в звеньях (VI) соответственно), что позволяет локализовать остаток фосфоэтанолamina на этом моносахариде (звено C). Структура линейного полисахарида (схема), установленная в результате полной расшифровки его  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра (таблица) и определения констант спин-спинового взаимодействия  $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$  (173, 162 и 159 Гц для сигналов аномерных углеродов при 101,1, 102,6 и 105,0 м.д. соответственно) [5], находится в соответствии со структурами олигосахаридов (I) и (II).

Химические сдвиги в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах \*

Соединение, звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
GlcA (A)						
Полисахарид	105,1	74,3	79,0	75,3	75,4	170,6
(VI)	105,0	74,1	85,0	71,1	76,1	170,7
(V)	105,0	74,0	85,3	71,1	76,1	170,7
(II)	105,0	73,8	75,2	78,2	74,9	?
(I)	105,2	74,1	76,2	72,5	76,2	171,5
GalA (B)						
Полисахарид	101,2	68,2	80,6	70,7	72,4	170,4
(VI)	101,1	68,3	80,4	70,7	72,5	170,5
(V)	101,1	68,3	80,4	70,7	72,5	170,5
(II)	101,5	68,3	80,2	70,6	72,4	?
(I)	101,7	68,3	80,2	70,7	72,5	171,2
GlcNAc (C)						
Полисахарид	101,2	55,2	82,5	71,5	75,4	65,4
(VI)	102,6	55,6	82,6	72,1	76,7	62,0
(V)	102,6	55,6	82,2	71,7	75,5	65,6
(II)	61,9	55,1	78,9	71,5	71,8	64,1
(I)	61,9	54,8	78,7	71,4	71,7	64,1
GlcNAc (D)						
Полисахарид	98,7	56,8	74,7	71,1	77,2	61,9
(II)	100,8	56,7	74,5	71,0	77,2	61,8
Lys						
Полисахарид	178,9	55,5	31,9	23,2	27,4	40,6
(VI), (V)	177,3	54,5	31,8	23,1	27,4	40,7
(II)	?	54,5	32,0	23,1	28,9	40,2
(I)	177,9	53,9	31,4	23,1	28,9	40,3

\* Спектры сняты в  $\text{D}_2\text{O}$ , внутренний стандарт — ацетон ( $\delta_{\text{C}}$  31,45 м.д.). Отнесение сигналов, разница между химическими сдвигами которых менее 0,5 м.д., может быть обратным. Сигналы аланина: 177—177,5 (C1), 49,6—51 (C2), 17,7—18,7 м.д. (C3); этаноламина: 41,4—41,6 ( $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ), 63,1—63,2 м.д. ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); N-ацетильных групп: 23,3—23,9 ( $\text{CH}_3$ ), 175,1—175,7 м.д. (CO).



Полученные данные позволяют установить полную структуру О-специфического полисахарида *P. mirabilis* O27. Фосфоэтаноламин присутствует в полисахариде в нестехиометрическом количестве (степень фосфорилирования может быть оценена в ~80%), что следует из анализа полученной расходом по Смигу основной цепи (см. выше) и подтверждается данными  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра исходного полисахарида (в нем, в частности, присутствуют минорные сигналы при 76,4 и 71,9 м.д., которые могут быть отнесены к атомам С5 и С4 находящегося в основной цепи нефосфорилированного остатка N-ацетилглюкозамина С).

Серологическая активность исследованного полисахарида значительно снижается при удалении терминального остатка N-ацетилглюкозамина (D) или при N-ацетилировании свободных аминогрупп лизина и фосфоэтанолamina [3]. Таким образом, эти компоненты являются иммунодоминантными. Полученные данные позволяют также обосновать отсутствие серологического родства между О-антигенами *P. mirabilis* O27 и S1959, которые содержат сходные компоненты (глюкуроновую и галактуриновую кислоты и лизин): иммунодоминантным компонентом последнего полисахарида является остаток галактуриновой кислоты, амидированный лизином, который отсутствует в первом полисахариде.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов Е. В., Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К., Холодкова Е. В., Станиславский Е. С. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 660-669.
2. Vinogradov E. V., Kaca W., Knirel Y. A., Kotelko K. // Arch. Immunol. Ther. Exp. 1987. V. 35. P. 431-437.
3. Gromska W., Krajewska D. // Arch. Immunol. Ther. Exp. 1981. V. 29. P. 595-600.
4. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59-75.
5. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293-297.

Поступило в редакцию  
12.IV.1988

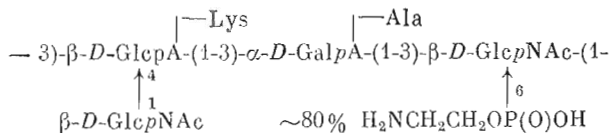
STRUCTURE OF THE *Proteus mirabilis* O27 O-SPECIFIC  
POLYSACCHARIDE, CONTAINING AMINO ACIDS  
AND PHOSPHOETHANOLAMINE

VINOGRADOV E. V., PIETRASIK D. \*, SHASHKOV A. S., KNIREL Y. A.,  
KOCHETKOV N. K.

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

*\* Institute of Microbiology, Lodz University, Poland*

The following structure of the repeating unit of the *Proteus mirabilis* O27 O-specific polysaccharide was established:



where  $\text{Glc}pA \begin{array}{l} | \\ \text{---Lys} \end{array}$  is N-gluco-pyranuronoyl-L-lysine,  $\text{Gal}pA \begin{array}{l} | \\ \text{---Ala} \end{array}$  is N-galactopyranuronoyl-L-alanine. The polysaccharide was partially solvolysed with anhydrous HF and the resulting dephosphorylated tri- and tetrasaccharide with N-acetylglucosamine at the reducing end were studied by means of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and (for methylated derivative of trisaccharide) mass-spectrometry. Smith degradation of the polysaccharide afforded linear polymer, and its structure was investigated by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. The position of the ethanolamine phosphate group was determined by means of the analysis of the phosphorylation effects in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the linear and branched polysaccharides.