



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.114.5.088:579.842.17

СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *PROTEUS MIRABILIS* O3, СОДЕРЖАЩЕГО N-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)-D-АЛАНИН

Виноградов Е. В., Каца В., Шапков А. С.,
Петрашик Д.*, Рожальски А.*, Книрель Ю. А.,
Кочетков Н. К.*

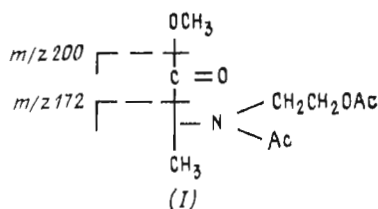
*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР,
Москва;*

** Институт микробиологии Университета Лодзи, ПНР*

В настоящем сообщении описано структурное исследование О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида *Proteus mirabilis* O3, штаммы которого являются самыми распространенными среди штаммов *Proteus* возбудителями инфекционных урологических заболеваний человека [1].

Полисахарид был получен расщеплением выделенного по методу [2] липополисахарида 1% уксусной кислотой при 100°С. По данным ¹³С-ЯМР-спектра (таблица) и кислотного гидролиза, он регулярен и построен из повторяющихся тетрасахаридных звеньев, включающих в себя два остатка галактозы и по одному остатку глюкозы и N-ацетилглюкозамина. Кроме того, в его составе присутствует фосфатная группа (содержание фосфора 2,5%) и нейтральная аминокислота, имеющая время удерживания при анализе с помощью аминокислотного анализатора близкое к серину.

В ¹³С-ЯМР-спектре свободной аминокислоты присутствовали сигналы групп CH₃ (15,9 м. д.), CH₂N (48,3 м. д.), CHN (57,8 м. д.), CH₂O (57,7 м. д.) и COOH (174,6 м. д.). Анализ методом ¹H-ЯМР-спектроскопии показал присутствие групп CH₃CH и CH₂CH₂, отделенных друг от друга двумя или более связями. Эти данные позволили предположить, что исследуемая аминокислота представляет собой N-(2-гидроксиэтил)аланин. Этот вывод был подтвержден образованием при ее ацилировании метилового эфира ди-N,O-ацетильного производного (I)



строение которого было установлено методом ¹H-ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрии (в масс-спектре, в частности, присутствовали пики фрагментов, образующихся при отрыве от молекулярного иона групп CH₃O и CH₃OSO и доказывающих, что это соединение имеет молекулярную массу 231). Аминокислота имела величину оптического вращения $[\alpha]_D^{20} -2^\circ$ (с 0,6, 1 М НСl) и давала отрицательную дихроичную полосу в КД-спектре при 210 нм. Синтетический образец N-(2-гидроксиэтил)-D-

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

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
Звено А (Gal β)							
О-Специфический полисахарид		104,4	71,1	83,4	69,4	76,1	62,3
	(II)	104,4	71,1	83,4	69,4	76,1	62,2
		(104,4	71,0	83,0	69,7	76,3	62,2)
	(IV)	104,7	71,7	73,7	69,9	76,4	62,2
	(V)	104,7	71,7	73,8	69,8	76,5	62,3
	(104,4	71,4	74,1	70,0	76,3	62,2)	
Звено В (GlcNAc β)							
С-Специфический полисахарид		103,6	55,9	83,7	69,8	76,9	61,7
	(II)	103,6	55,9	83,6	69,7	76,8	61,7
		(104,0	55,8	83,8	70,0	77,2	62,1)
	(IV)	103,6	56,0	83,5	69,8	76,5	61,8
	(V)	103,6	56,0	83,5	69,8	76,5	61,8
	(104,0	55,8	83,8	70,0	77,2	62,1)	
Звено С (Gal α)							
О-Специфический полисахарид		99,4	68,5	80,5	69,9	70,6	66,0
	(II)	99,4	68,5	80,6	70,2	71,8	62,2
		(99,1	68,9	79,5	70,3	72,2	62,4)
	(IV)	99,8	68,5	80,5	69,8	70,6	66,0
	(V)	99,8	68,6	80,6	70,3	71,8	62,3
	(68,9	79,5	70,3	72,2	62,4)		
Звено D (Glc β или Gro)							
О-Специфический полисахарид		105,2	74,5	76,3	70,2	75,4	66,5
	(II)	105,1	74,4	76,3	70,2	75,4	66,5
		(104,9	74,4	77,0	70,9	75,4	67,1)
	(IV)	68,9	71,9	63,8			
	(V)	69,9	71,9	63,8			

* Сигналы N-(2-гидроксиэтил)аланина: 15,9—16,2 (CH₃), 47,5—47,7 (CH₂N), 58,2—59,1 (CHN), 62,3—62,4 (CH₂O), 174,7 м. д. (COOH); N-ацетильной группы: 23,5 (CH₃), 176,1—176,2 м. д. (CO). Для полисахарида (II) и олигосахарид (V) в скобках приведены рассчитанные химические сдвиги.

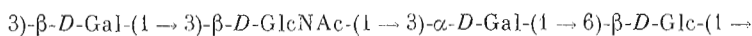
аланина, полученный при взаимодействии *L*-2-бромпропионовой кислоты с этаноламином, практически совпадал с природным по данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров, величине оптического вращения $[\alpha]_D -2,8^\circ$ (с 1, 1 М НСl) и КД-спектру. Следовательно, в состав полисахарида входит N-(2-гидроксиэтил)-*D*-аланин.

Дефосфорилирование полисахарида действием 48% HF (10°С, 48 ч) привело к высвобождению аминокислоты, которая, следовательно, присоединена фосфодиэфирной связью. Это подтверждается смещением за счет эффектов фосфорилирования сигналов групп CH₂N и CH₂O от 48,3 и 57,7 м. д. в ^{13}C -ЯМР-спектре свободной аминокислоты к 47,5 и 62,3 м. д. соответственно в спектре полисахарида и расщеплением этих сигналов вследствие взаимодействия с атомом фосфора фосфатной группы.

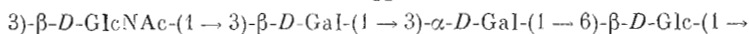
При дефосфорилировании образовался полисахарид, содержащий, по данным ^{13}C -ЯМР-спектра, все моносахаридные компоненты исходного полимера. Анализ методом метилирования [3] показал, что этот полисахарид линейен, все моносахаридные остатки находятся в пиранозной форме, оба остатка галактозы и остаток N-ацетилглюкозамина замещены в положение 3, а остаток глюкозы замещен в положение 6.

Для структурного анализа этого полисахарида был использован метод, основанный на расчете ^{13}C -ЯМР-спектров с помощью ЭВМ, исходя из химических сдвигов свободных моносахаридов и эффектов гликозилирования [4]. При расчете предполагалось, что все компоненты полисахарида

имеют обычные для этих сахаров в составе бактериальных полисахаридов *D*-конфигурации. Расчет выявил шесть структур, удовлетворяющих экспериментальному ^{13}C -ЯМР-спектру полисахарида, из которых только структуры (II) и (III) согласовывались с данными метилирования. Эти структуры, отличающиеся друг от друга только взаимным расположением остатка *N*-ацетилглюкозамина и одного из остатков галактозы, характеризовались и наименьшим среди шести структур отклонением химических сдвигов в расчетном и экспериментальном спектре.

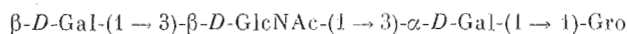


II



III

Выбор между структурами (II) и (III) был сделан путем распада исходного полисахарида по Смитсу с последующим дефосфорилированием образовавшегося олигосахарида (IV). Анализ полученного в результате олигосахарида с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии с использованием расчетного метода однозначно показал, что терминальное положение в нем занимает не остаток *N*-ацетилглюкозамина, а остаток β -галактозы, и, следовательно, этот олигосахарид имеет структуру (V)

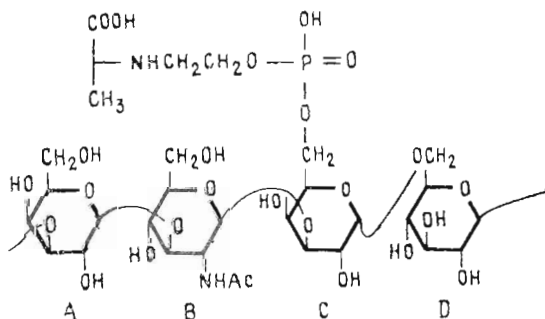


(IV) $\text{R}=\text{PO}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$; (V) $\text{R}=\text{H}$

Из строения олигосахарида (V) следовало, что дефосфорилированный полисахарид имеет структуру (II). Данные ^{13}C -ЯМР-спектров, рассчитанные для соединений (II) и (V), а также отнесение сигналов в их экспериментальных спектрах приведены в таблице. Расчет по правилу Кляйна [5] показал, что величина удельного оптического вращения полисахарида (II) $[\alpha]_D +43^\circ$ (*c* 1,2, вода), согласуется со сделанным предположением о *D*-конфигурации всех моносахаридных компонентов.

Сопоставление ^{13}C -ЯМР-спектров олигосахаридов (IV) и (V), а также исходного полисахарида и полисахарида (II) (таблица) показало, что расщеплению за счет взаимодействия с атомом фосфора фосфатной группы и смещению за счет эффектов фосфорилирования в спектрах фосфорилированных соединений подвергаются сигналы C5 (эффект $-1,2$ м. д.) и C6 (эффект $+3,7$ – $+3,8$ м. д.) одного из моносахаридных остатков. Судя по химическому сдвигу этого сигнала C5 (71,8 м. д.), он принадлежит остатку α -галактозы, и, следовательно, *N*-(2-гидроксиэтил)аланин присоединен фосфодиэфирной связью в положение 6 этого моносахарида.

Из полученных данных следует, что *O*-специфический полисахарид *P. mirabilis* O3 имеет следующую структуру:



Аминокислота, входящая в состав этого полисахарида, встречается в природе чрезвычайно редко. Ранее *N*-(2-гидроксиэтил)аланин с неустойчивой абсолютной конфигурацией был обнаружен в составе фосфолипидов одного из представителей простейших, где он, как и в полисахари-

риде *P. mirabilis*, давал эфир с остатком фосфорной кислоты [6]. В составе природных углеводов эта аминокислота, по нашим данным, найдена впервые.

Авторы благодарят Г. М. Липкина за расчет ^{13}C -ЯМР-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larsson P. // Meth. Microbiol. 1984. V. 14. P. 187–214.
2. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1965. С. 325–332.
3. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lonngren J. // Chem. Communs Univ. Stockholm. 1976. № 8. P. 1–75.
4. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75.
5. Klyne W. // Biochem. J. 1950. V. 46. № 4. P. xli-xlii.
6. Kemp P., Dawson R. M. C. // Biochim. et biophys. acta. 1969. V. 176. № 3. P. 678–679.

Поступила в редакцию
18.IV.1989

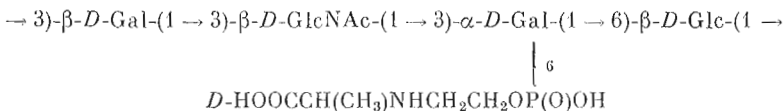
STRUCTURE OF THE *PROTEUS MIRABILIS* 03 O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CONTAINING N-(2-HYDROXYETHYL)-D-ALANINE

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

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

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

O-Specific polysaccharide, obtained by mild acid degradation of the *Proteus mirabilis* 03 lipopolysaccharide, was dephosphorylated with 48% HF to give a linear polysaccharide and an amino acid, N-(2-hydroxyethyl)-D-alanine. The structure of the polysaccharide was determined by methylation, the Smith degradation and computer-assisted analysis of the ^{13}C NMR spectra of original and dephosphorylated polymers and oligomers. The structure of the amino acid was elucidated by using ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and mass spectrometry (applied to the acetylated methyl ester derivative), optical rotation and CD spectrum data and comparison with the synthetic sample. The repeating unit of *P. mirabilis* 03 O-specific polysaccharide is shown to have the following structure:



Технический редактор *Н. Н. Беллева*

Сдано в набор 20.07.89	Подписано к печати 5.09.89	T-13846	Формат бумаги 70×108 $\frac{1}{16}$
Высокая печать	Усл. печ. л. 12,6	Усл. кр.-отт. 11,6 тыс.	Уч.-изд. л. 11,6 Бум. л. 4,5
	Тираж 900 экз.	Зак. 3234	Цена 1 р. 80 к.

Адрес редакции: 117990, ГСП-1, Москва, ул. Вавилова, 31, комн. 335

Телефон: 135-97-27

2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6