



УДК 577.114:5:543.422.23:579.843.1

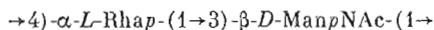
© 1992 г.

Е. Л. Назаренко, В. А. Зубков, Е. П. Иванова,  
Р. П. Горикова

### СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *VIBRIO FLUVIALIS* СЕРОВАРА 3

Тихоокеанский институт биоорганической химии  
ДВО РАН, Владивосток

Выделен и охарактеризован О-специфический полисахарид из липополисахарида *Vibrio fluvialis* серовара 3. На основании данных метилирования,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии и теоретического расчета  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра предложена следующая структура повторяющегося звена полисахарида:

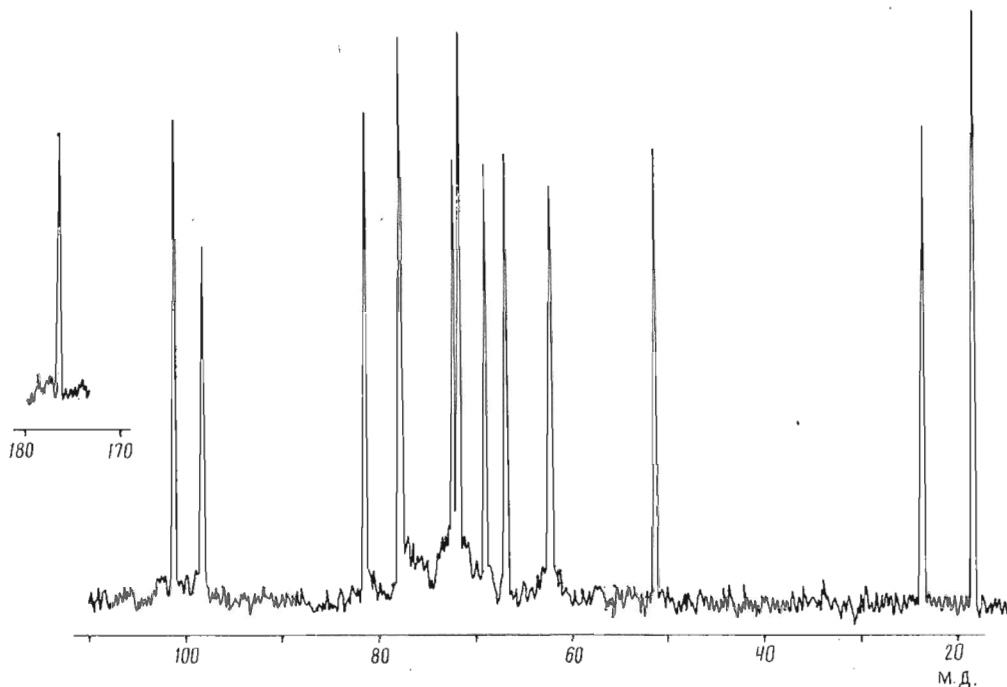


Настоящая работа продолжает структурное исследование О-антигенных полисахаридов *Vibrio fluvialis* [1] и посвящена установлению строения О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида (ЛПС) *V. fluvialis* серовара 3 [2].

ЛПС выделен из бактериальных клеток экстракцией водным фенолом и освобожден от нуклеиновых кислот осаждением трихлоруксусной кислотой. При расщеплении ЛПС разбавленной уксусной кислотой с последующей гель-хроматографией углеводной фракции на сефадексе G-50 получен О-специфический полисахарид ( $[\alpha]_{578}^{20} -47^\circ$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр (рисунок) указывает на регулярный характер полисахарида и дисахаридный размер его повторяющегося звена. В спектре наблюдаются сигналы метильной группы 6-дезоксисахара при 18,0 м.д., одной N-ацетильной группы ( $\text{CH}_3$  — при 23,0 м.д.,  $\text{C}=\text{O}$  — при 175,7 м.д.), двух аномерных атомов углерода при 97,7 и 100,7 м.д., одного углеродного атома, связанного с азотом, при 50,9 м.д., одной первичноспиртовой группы при 61,6 м.д. и семи вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, при 66–81 м.д. Таким образом, можно предположить, что полисахарид построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих 6-дезоксигексозу и гексозу, причем один из моносахаридов является N-ацетилированным гексозамином. Химические сдвиги сигналов аномерных атомов углерода свидетельствуют о том, что оба моносахаридных остатка находятся в пиранозной форме.

В гидролизате полисахарида бумажной и газо-жидкостной хроматографией в сравнении с заведомыми образцами моносахаридов идентифицированы рамноза и маннозамин примерно в одинаковом количестве. Для определения абсолютной конфигурации оба моносахарида были выделены из гидролизата микропрепаративной ВЭЖХ. На основании величины оптического вращения рамнозы и полученного из нее путем мягкого метанолиза метилрамнозида установлено, что этот моносахарид имеет L-конфигурацию. Образец гидрохлорида маннозамина имел близкую к нулю величину оптического вращения; в связи с этим определение его абсолютной конфигурации было затруднено.

Из  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, определены константы спин-спинового взаи-

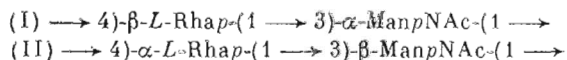


$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида

действия (КССВ)  $^1J_{\text{C,H}}$  для аномерных атомов. Относительно небольшая константа ( $^1J_{\text{C,H}}$  166,4 Гц) для сигнала при 100,7 м.д. указывает на то, что он принадлежит  $\beta$ -связанному моносахариду, а сравнительно большая константа ( $^1J_{\text{C,H}}$  173,9 Гц) для сигнала 97,7 м.д. свидетельствует об  $\alpha$ -конфигурации гликозидной связи [3].

Характер замещения моносахаридных остатков в полисахариде установлен методом метилирования. После гидролиза метилированного по Хакомори [4] полисахарида методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов частично метилированных полиолов были идентифицированы примерно в равном соотношении 2,3-ди-О-метилрамноза и 2-дезоксид-2-(N-метил)ацетиамидо-4,6-ди-О-метилманноза. Таким образом, остаток L-рамнозы в полисахариде замещен в положение 4, N-ацетилманнозамин — в положение 3.

Следовательно, на основании данных метилирования и величин КССВ аномерных атомов углерода можно предположить наличие двух альтернативных структур повторяющегося звена:



Выбор между ними осуществлен на основании анализа области резонанса кольцевых атомов углерода в сильном поле (66–69 м.д.). В этой области могут резонировать С4-атомы  $\alpha$ - и  $\beta$ -связанного остатка N-ацетилманнозамина и С5-атом  $\alpha$ -связанного остатка рамнозы (С5-атом  $\beta$ -рамнозы резонирует в области 73 м.д.) [5]. Выбор сделан в пользу структуры II, поскольку в указанной области наблюдаются два сигнала (С5-атома  $\alpha$ -связанного остатка рамнозы и С4-атома N-ацетилманнозамина [5]), тогда как в случае структуры I независимо от аномерной кон-

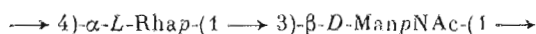
Данные  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра ( $\delta$ , м. д.)

Моносахаридный остаток	Тип данных	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→4- $\alpha$ -L-Rha→	Экспер.	97,7	71,7	71,2	80,8	68,4	18,0
	Теор.	97,7	72,1	71,3	80,8	68,7	18,0
→3- $\beta$ -D-ManNAc	Экспер.	100,7	50,9	77,4	66,3	77,2	62,6
	Теор.	101,4	50,9	77,6	66,2	77,6	61,8

фигурации N-ацетилманнозамина в этой области должен наблюдаться только один сигнал его C4-атома. Таким образом, остатки L-рамнозы и N-ацетилманнозамина имеют соответственно  $\alpha$ - и  $\beta$ -конфигурацию гликозидной связи, что следует также из величин КССВ аномерных атомов углерода.

Из анализа аномерной области  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида однозначно следует, что остаток N-ацетилманнозамина имеет D-конфигурацию, поскольку в случае одинаковой абсолютной конфигурации обоих моносахаридных остатков аномерный атом  $\alpha$ -рамнозы резонировал бы в области 103–104 м.д. [5]. Однако такого сигнала в спектре не наблюдается.

Таким образом, на основании данных метилирования и анализа  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра можно сделать вывод о том, что повторяющееся звено O-специфического полисахарида *V. fluvialis* серовара 3 имеет строение



Полная расшифровка  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида приведена в таблице. Правильность отнесения всех сигналов углеродных атомов подтверждена теоретическим расчетом спектра, исходя из химических сдвигов атомов углерода свободных моносахаридов и средних величин эффектов гликозилирования [5].

Интересно, что подобную структуру имеют O-специфические полисахариды *Pseudomonas aeruginosa* (Мейтерт) [6] и *Pseudomonas ceracia* серогруппы O5 [7].

#### Экспериментальная часть

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры сняты на приборе WM-250 (Bruker) в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $40^\circ\text{C}$  с метанолом (50,15 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Оптическое вращение определяли на приборе Perkin – Elmer 141 в воде при  $20^\circ\text{C}$ . Растворы лиофилизovali или упаривали в вакууме. Нисходящую хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-15 в системе растворителей *n*-бутанол – пиридин – вода, 6 : 4 : 3, при обнаружении веществ щелочным нитратом серебра. Гель-хроматографию осуществляли на колонке (2,5×90 см) с сефадексом G-50 в 0,3% уксусной кислоте. ВЭЖХ проводили на колонке (0,4×25 см) с сорбентом Silasorb SPH  $\text{C}_{18}$  (LC) (7,5 мкм) в воде. Элюиционные кривые строили с помощью дифференциального рефрактометра RIDK 101 (ЧСФР). ГЖХ-анализ выполняли на приборе Pye Unicam 104 на колонке (0,4×150 см) с 3% QF-1 на Gas Chrom Q (100–120 меш) в интервале температур  $175 \rightarrow 225^\circ\text{C}$ , газ-носитель – аргон. ГЖХ-масс-спектрометрию проводили на приборе LKB 9000S на той же колонке.

*Продуцирование микроорганизма V. fluvialis* серовара 3 (штамм 209-73), полученного от д-ра Т. Шимада (Япония), и выделение ЛПС проводили как описано в работе [1].

*Выделение O-специфического полисахарида.* ЛПС (1 г) гидролизovali 3 ч 1% уксусной кислотой ( $100^\circ\text{C}$ ), осадок линияда А удаляли центрифугированием (350 мг), раствор упаривали до небольшого объема,

гель-хроматографией на сефадексе G-50 выделяли полисахарид, выходящий за свободным объемом колонки (выход 20% от веса ЛПС), и олигосахаридную фракцию (выход 32% от веса ЛПС), которая в дальнейшем не исследовалась.

**Полный кислотный гидролиз.** Полисахарид (2 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (0,5 мл, 100°С, 3 ч), гидролизат упаривали и анализировали хроматографией на бумаге и ГЖХ в виде ацетатов полиолов [8]. В препаративном варианте гидролиза использовали 10 мг полисахарида и 2 мл кислоты; препаративной ВЭЖХ выделяли *L*-рамнозу (2 мг),  $[\alpha]_{578}^{20} +6,0^\circ$  (с 0,2, вода), которую метанолизом 1 М хлористым водородом в метаноле (2 мл, 100°С, 2 ч) превращали в метил-*L*-рамнозид,  $[\alpha]_{578}^{20} -65,4^\circ$  (с 0,1, вода) (ср. с данными [9]:  $[\alpha]_{578}^{20} -67,2^\circ$ , вода) и *D*-маннозамин (2,5 мг)  $[\alpha]_{578}^{20} -7,0^\circ$  (с 0,25, вода).

**Метилирование полисахарида** осуществляли по методу [4], избыток иодистого метила удаляли упариванием, метилированный полисахарид выделяли с помощью патрона Sep-Pak C<sub>18</sub> (Waters), подвергали формолизу и гидролизу как описано в работе [10]. Продукты расщепления превращали в ацетаты полиолов и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Назаренко Е. Л., Горшкова Р. П., Оводов Ю. С., Шашков А. С., Книрель Ю. А. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1100–1106.
2. Shimada T., Sakazaki R. // Jap. J. Med. Sci. Biol. 1983. V. 36. № 6. P. 315–323.
3. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
4. Yakomori S. // J. Biochem. 1964. V. 55. № 1. P. 205–208.
5. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59–75.
6. Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Шашков А. С., Варбанец Л. Д., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1268–1273.
7. Cox A. D., Wilkinson S. G. // Carbohydr. Res. 1989. V. 5. № 1. P. 123–129.
8. Sawardeker J. S., Sloneker J. H., Jeanes A. // Anal. Chem. 1965. V. 37. № 12. P. 1602–1604.
9. Fisher E., Bergmann M., Rabe A. // Chem. Ber. 1920. V. 53. № 11. P. 2362–2388.
10. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. // Биоорганич. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1851–1859.

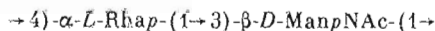
Поступила в редакцию  
11.VI.1991

E. L. NAZARENKO, V. A. ZUBKOV, E. P. IVANOVA, R. P. GORSHKOVA

#### STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE OF *VIBRIO FLUVIALIS* SEROVAR 3

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok*

O-Specific polysaccharide composed of *L*-rhamnose and 2-acetamido-2-deoxy-*D*-mannose was obtained on mild acid degradation of the *V. fluvialis* lipopolysaccharide. On the basis of the <sup>13</sup>C-NMR data and methylation studies, the following structure was suggested for the polysaccharide repeating unit:



This structure was confirmed by calculations using known glycosidation effects on <sup>13</sup>C chemical shifts.