



УДК 547.458.02:543.422.23

СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ  
*ESCHERICHIA COLI* ШТ. 020 *ab*: K84:H34 (145)  
И 020*ac*:K61:H<sup>-</sup> ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ <sup>13</sup>C-ЯМР

Васильев В. Н., Захарова И. Я.

Институт микробиологии и вирусологии Академии наук УССР, Киев

Шашков А. С.

Институт органической химии им. П. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

Изучены спектры <sup>13</sup>C-ЯМР О-специфических полисахаридов *Escherichia coli* 020*ab*:K84:H34(145) и 020*ac*:K61:H<sup>-</sup>. Для полисахарида штамма 145 подтверждена ранее установленная структура химического повторяющегося звена:  $\rightarrow 4\text{-D-Gal } p\alpha 1 \rightarrow \rightarrow 2\text{-D-Rib } f\beta 1 \rightarrow$ . Для полисахарида штамма K61 показано, что наряду с дисахаридными звеньями, идентичными приведенным выше, имеются трисахаридные звенья, содержащие еще один остаток  $\alpha$ -D-галактопиранозы при С3 1,4-связанного остатка дисахаридного звена (разветвление цепи). Соотношение ди- и трисахаридных звеньев в полисахариде штамма K61 найдено равным 2 : 1.

Исследование структуры О-специфических полисахаридов бактерий одного серотипа *Escherichia coli*, как правило, проводится на одном штамме [1–3], хотя серологическая практика показывает существование различных специфических факторов внутри серотипа [4]. Следовательно, для полной характеристики серотипа необходимо изучать структуру О-специфических полисахаридов, имеющих различные факторы.

При серологическом изучении четырех штаммов *E. coli* было показано, что три штамма 020*ab*:K84:H34(145), 020*ab*:K84:H<sup>-</sup> и 020*ab*:17L имели О-факторы *ab*, а штамм 020*ac*:K61:H<sup>-</sup> — О-фактор *ac*. О-Специфические полисахариды, выделенные из указанных штаммов, имели одинаковый моносахаридный состав и содержали рибозу и галактозу [5].

Для дальнейшего изучения О-специфических полисахаридов было взято два штамма: один с фактором *ab* — 020*ab*:K84:H34(145), а другой с фактором *ac* — 020*ac*:K61:H<sup>-</sup>. Далее они будут именоваться *E. coli* 145 и *E. coli* K61 или I и II соответственно.

Структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида *E. coli* 145 установлена как  $\rightarrow 4\text{-D-Gal } p\alpha 1 \rightarrow 2\text{-D-Rib } f\beta 1 \rightarrow$ , а его детерминантная группа оказалась тетрасахаридом  $D\text{-Gal } p\alpha 1 \rightarrow 2\text{-D-Rib } f\beta 1 \rightarrow \rightarrow 4\text{-D-Gal } p\alpha 1 \rightarrow 2\text{-D-Rib } f$  [6].

При изучении О-специфического полисахарида *E. coli* K61 структура цепи полностью доказана не была, но было показано, что детерминантная группа представлена не тетрасахаридом, как у *E. coli* 145, а пентасахаридом, состоящим из двух рибозных и трех галактозных остатков [7].

Для подтверждения ранее найденной структуры полисахарида *E. coli* 145 (I) и установления структуры полисахарида *E. coli* K61 (II) нами были изучены их спектры <sup>13</sup>C-ЯМР.

В спектре полисахарида 1 (рис. 1) видны 11 сигналов примерно равной интегральной интенсивности, отвечающих 11 неэквивалентным атомам углерода повторяющегося звена полимера. Такой спектр может отвечать только регулярному полисахариду с соотношением рибозы и галактозы в повторяющемся звене, близким к 1 : 1. Остальные детали структуры полисахарида вытекают из подробного анализа положения линий в спектре <sup>13</sup>C-ЯМР.

Размеры циклов и конфигурация гликозидных связей остатков полисахарида I. Два сигнала в области аномерных атомов углерода (108,1 и



C5 галактофуранозидного остатка в первом случае [8] или C2, C3, C4 галактофуранозидного и C4 рибопиранозидного остатка — во втором [8, 11]). На самом деле в спектре I в этой области лишь три линии. Теперь, поскольку очевидно, что именно *D*-галактозный остаток является пиранозидным, можно с полной определенностью приписать ему  $\alpha$ -конфигурацию гликозидного центра, так как  $\beta$ -галактопиранозиды дают сигналы C1 в области не выше 103 м. д. Таким образом, из спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида I следует, что остаток *D*-галактозы в этом полисахариде является  $\alpha$ -*D*-пиранозидом, а *D*-рибозы —  $\beta$ -*D*-фуранозидом, что подтверждает данные химического анализа [6].

*Типы замещения в остатках  $\alpha$ -D-галактопиранозидов и  $\beta$ -D-рибофуранозидов в полисахариде I.* Из трех возможных способов замещения в остатках  $\beta$ -*D*-рибофуранозидов в полисахариде I один — по C5 — исключается сразу, так как в спектре I есть характерная линия свободной гидроксиметильной группы  $\beta$ -*D*-рибофуранозидов при 63,8 м. д. [8]. Сигнал со сдвигом 84,3 м. д. характерен для резонанса C4 в незамещенном или 2-О-замещенном  $\beta$ -*D*-рибофуранозиде. Если же остаток рибифуранозидов замещен по C3 или C5, то за счет  $\beta$ -эффекта замещения сигнал C4 смещается в более высокое поле — примерно на 2 м. д. [8]. Учитывая, что в спектрах пиранозидных остатков вообще не бывает сигналов в этой области спектра, следует заключить, что  $\beta$ -*D*-рибофуранозидный остаток в полисахариде I не замещен или замещен по C2. Однако для незамещенного  $\beta$ -*D*-рибофуранозидов сигнал C2 находится в области резонанса 75 м. д. [8]; в спектре I эта область свободна от сигналов. Прекрасное совпадение химических сдвигов C1—C5 в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР  $\beta$ -метил-2-О-изопропил-*D*-рибофуранозидов [8] с пятью из 11 линий в спектре I окончательно подтверждает замещение остатка  $\beta$ -*D*-рибофуранозидов по C1 и C2.

Замещение в остатке  $\alpha$ -*D*-галактопиранозидов в полисахариде I определяется следующим образом. Из шести линий этого остатка (остающихся после исключения из спектра пяти сигналов  $\beta$ -*D*-рибофуранозидного звена) три могут быть отнесены к атомам C1 (98,7 м. д.), C6 (62,5 м. д.) и к углероду, участвующему в образовании межзвеньевой связи (78,3 м. д.). Оставшиеся три сигнала (72,0; 70,7 и 69,5 м. д.) соответствуют по химическим сдвигам C5, C3 и C2 соответственно в незамещенном метил- $\alpha$ -*D*-галактопиранозиде [10]. Замещение по углероду с экваториальным гидроксильным в пиранозах вызывает, как правило, изменение химических сдвигов трех линий спектра:  $\alpha$ -углерода ( $\alpha$ -эффект замещения, сдвиг в слабое поле) и двух соседних ( $\beta$ -эффект замещения, сдвиг в сильное поле) [9]. При замещении по углероду с аксиальным гидроксильным сигнал  $\alpha$ -углерода смещается в слабое поле, а  $\beta$ -углеродов — лишь очень незначительно и тоже в слабое поле [12]. Поэтому неизменность положения трех сигналов  $\alpha$ -*D*-галактопиранозидов в спектре I по сравнению со спектром метил- $\alpha$ -*D*-галактопиранозидов можно объяснить лишь из предположения о замещении этого остатка в полисахариде I по C4.

Поскольку вопрос о последовательности соединения остатков в повторяющемся звене полисахарида I решен автоматически при определении типов замещения в них, установленная ранее [6] структура полимера I может считаться подтвержденной независимым способом — с помощью спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР.

*Структура полисахарида E. coli K61 II.* При определении структуры полисахарида II, как и в случае полисахарида I, будем исходить из того, что мономерный состав повторяющегося звена качественно установлен (*D*-галактоза и *D*-рибоза с преобладанием первой [7]). На рис. 2 приведен спектр полисахарида II. Из сопоставления областей резонанса аномерных атомов углерода в спектрах I и II становится ясным, что в полисахариде II имеются остатки  $\beta$ -*D*-рибофуранозидов и  $\alpha$ -*D*-галактопиранозидов, соединенные таким же образом, как и в полисахариде I. Небольшое расщепление сигналов C1  $\beta$ -*D*-рибофуранозидов (108,1 и 107,75 м. д.) и  $\alpha$ -*D*-галактопиранозидов (98,65 и 98,8 м. д.) можно объяснить дальним влиянием присоединения дополнительного остатка галактозы, собственный сигнал C1 которого виден в спектре II при 100,2 м. д. Интегральная интенсивность этого сиг-

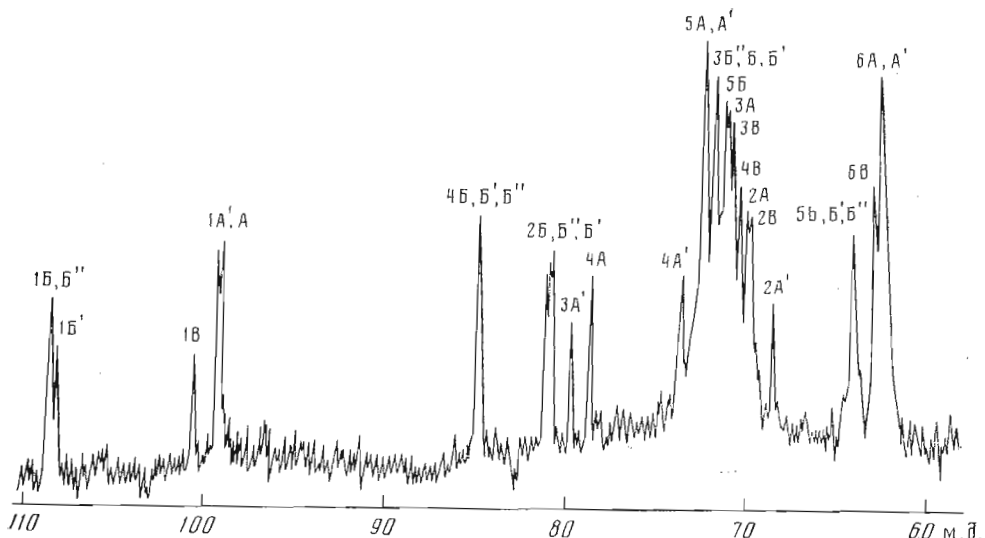


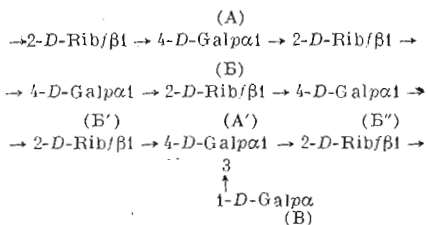
Рис. 2. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида *E. coli* K61

нала составляет примерно половину интенсивности сигналов при 108,4 и 107,75 м. д. (суммарной) или 98,65 и 98,8 м. д. (суммарной). Это означает, что дополнительная галактоза присутствует в полисахариде II не в эквивалентном количестве. Другими словами, в полисахариде II имеются дисахаридные звенья, как в полимере I, и трисахаридные с дополнительной галактозой. Действительно, анализ всего спектра II позволил отыскать и выделить сигналы, совпадающие по химическому сдвигу с 11 сигналами спектра I (таблица). Выделив из спектра II указанные 11 сигналов, мы получаем подспектр участков полисахаридной цепи, содержащих дополнительные остатки галактозы.

**Химические сдвиги спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридов I и II**

Остаток *	Полимер	Химические сдвиги, м. д.					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
A	I	98,7	69,5	70,7	78,3	72,0	62,5
Б	I	108,1	80,7	71,5	84,3	63,8	
А	II	98,65	69,6	70,8	78,25	72,1	62,4
Б	II	108,1	80,75	71,5	84,5	63,9	
А'	II	98,8	68,3	79,35	73,2	72,1	62,4
Б'	II	107,75	80,5	71,5	84,5	63,9	
Б''	II	108,1	80,6	71,6	84,5	63,9	
В	II	100,2	89,5	70,55	70,1	71,0	62,7

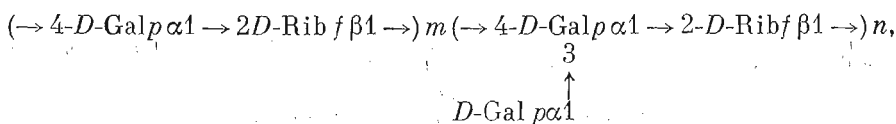
\* Условные обозначения остатков  $\alpha$ -D-галактопиранозы (А, А' и В) и  $\beta$ -D-рибофуранозы (Б, Б' и Б'') в следующих фрагментах цепи полимеров I и II:



Структура трисахаридных звеньев в полимере II. Появление в спектре II сигнала с хим. сдвигом 62,7 м. д. позволяет приписать дополнительному остатку галактозы в трисахаридном звене пиранозный размер цикла, а величина химического сдвига атома C1 этого остатка (100,2 м. д.) свидетельствует об  $\alpha$ -конфигурации его гликозидного центра (см. выше).

Место присоединения дополнительного остатка галактозы определяли исходя из следующих соображений. Этот остаток не может быть присоединен по С3 и С5 рибофуранозида, так как в спектре II имеются сигналы одноатомной интенсивности с хим. сдвигом 71,5 и 63,9 м. д., как в спектре I. По этой же причине исключено замещение по С6  $\alpha$ -галактопиранозидного остатка («полноценный» пик при 62,4 м. д.). Остается лишь возможность замещения по С2 или С3  $\alpha$ -галактопиранозидного остатка другим таким же остатком (разветвление цепи) или внедрения в некоторые участки цепи полисахарида еще одного остатка  $\alpha$ -D-галактопиранозы (удлинение повторяющегося звена). Для определения последовательности соединения остатков в участках цепи, содержащих дополнительную галактозу, ключевыми являются пики при 68,3 и 73,2 м. д. (в спектре полисахарида I эти области резонанса свободны от сигналов). Появление в спектре II высокопольного сигнала при 68,3 м. д. можно объяснить лишь замещением остатка  $\alpha$ -D-галактопиранозы в дисахаридном звене полисахарида I еще одним остатком  $\alpha$ -D-галактопиранозы по С3. Действительно, при таком замещении можно ожидать смещения сигнала С2 замещаемого остатка за счет  $\beta$ -эффекта в высокое поле на величину порядка 1–1,5 м. д. [12] (в дисахаридном звене этот сигнал находится при 69,6 м. д.). Напротив, при замещении по С2 мы должны были бы обнаружить пик С1 замещаемого остатка в поле, более высоком (на те же 1–1,5 м. д.), чем 98,65 м. д. Однако эта область спектра II свободна от сигналов. Далее, замещение по С3 остатка  $\alpha$ -D-галактопиранозы  $\alpha$ -D-сахаром в пиранозной же форме вызвало бы очень большой высокопольный сдвиг соседнего углерода С4 с аксиальным заместителем [13] (4 м. д. и более). Поэтому наиболее естественно объяснить появление в спектре II сигнала с хим. сдвигом 73,2 м. д. тем, что он принадлежит С4 3,4-замещенного остатка  $\alpha$ -D-галактопиранозы (соответствующий сигнал в 4-замещенном остатке  $\alpha$ -D-галактопиранозы находится, как и в спектре I, при 78,25 м. д.). Это предположение означает, что дополнительные остатки галактозы замещают линейную цепь по С3  $\alpha$ -D-галактопиранозидного остатка и являются разветвлениями этой цепи. В спектре II действительно видны все линии незамененного  $\alpha$ -D-галактопиранозидного остатка [10], что подтверждает сделанное предположение (см. таблицу). Присоединение дополнительного остатка  $\alpha$ -D-галактопиранозы, кроме указанных выше значительных изменений химических сдвигов углеродов, лежащих вблизи точки разветвления, вызывает также незначительные изменения положения линий резонанса более удаленных от этой точки углеродов (С1 и С2  $\beta$ -D-рибофуранозидных остатков).

Теперь, когда определена структура ди- и трисахаридных звеньев в II, можно более точно определить их соотношение в полимере, сопоставляя интегральные интенсивности линий в различных областях спектра. Это соотношение оказывается близким к 2 : 1. Таким образом, структура цепи полисахарида *E. coli* K61 II может быть выражена формулой



где  $m : n \approx 2 : 1$ .

### Экспериментальная часть

O-Специфические полисахариды *E. coli* 145 и K61 выделяли из соответствующих O-антигенов по методу Фримэна [5, 7].

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР снимали на приборе «Bruker-WP-60» при частоте 15,08 МГц. Длина импульса 10 мкс ( $90^\circ$ ), время повторения импульсов 1,1 с, масштаб 100 Гц/см, объем памяти 8/4 К. Растворы полимеров приготавливали в  $^2\text{H}_2\text{O}$ ; использовали внутренний стандарт MeOH (50,15 м. д. от Me<sub>4</sub>Si). Спектры снимали при 35° С.

1. Reske K., Jann K. Eur. J. Biochem., 1979, v. 31, № 2, p. 320—328.
2. Springer E. R., Wang E. T., Nichols J. H., Shear J. M. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1966, v. 133, № 2, p. 566—579.
3. Edstrom R. D., Heath E. C. J. Biol. Chem., 1967, v. 242, № 16, p. 3581—3582.
4. Коваленко Е. О., Захарова И. Я. Микробиол. ж., 1972, т. 34, № 4, с. 466—472.
5. Захарова И. Я., Коваленко Е. О. Микробиол. ж., 1972, т. 34, № 3, с. 316—320.
6. Васильев В. Н., Захарова И. Я. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 2, с. 199—206.
7. Васильев В. Н., Захарова И. Я., Коваленко Э. А. Микробиол. ж., 1980, т. 42, № 4, с. 456—461.
8. Gorin P. A. J., Mazurek M. Carbohydr. Res., 1976, v. 48, № 1, p. 171—186.
9. Шашков А. С., Чижов О. С. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437—497.
10. Gorin P. A. J., Mazurek M. Canad. J. Chem., 1975, v. 53, № 8, p. 1212—1223.
11. Perlin A. S., Casu B., Koch H. J. Canad. J. Chem., 1970, v. 48, № 16, p. 2596—2606.
12. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В., Рабовский А. Б. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1489—1494.
13. Шашков А. С., Усов А. И., Кириель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1364—1371.

Поступила в редакцию

14.V.1981

После доработки

22.VI.1981

**STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDES *ESCHERICHIA COLI* STRAIN  
020ab:K84:H34 (145) AND 020ac:K61H<sup>-</sup> ACCORDING TO <sup>13</sup>C NMR DATA**

VASILIEV V. N., ZAKHAROVA I. Ya., SHASHKOV A. S.

*Institute of Microbiology and Virusology, Academy of Sciences  
of the Ukrainian SSR, Kiev; N. D. Zelinsky Institute  
of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

<sup>13</sup>C NMR spectra of O-specific polysaccharides of *Escherichia coli* 020ab:K84:H34 (145) and 020ac:K61:H<sup>-</sup> were studied. For polysaccharides of strain 145, the earlier found structure of repeated link→4-*D*-Gal pα1→2-*D*-Rib fβ1→ was confirmed. Along with disaccharide links identical to above-mentioned ones, trisaccharide links containing one more γ-*D*-galactopyranose residue at C3 of 1,4-linked residue of disaccharide unit (branching of the chain) were found in the polysaccharide of the K61 strain. Proportion of di- and trisaccharide links in polysaccharide of strain K61 was determined as ~2:1.