

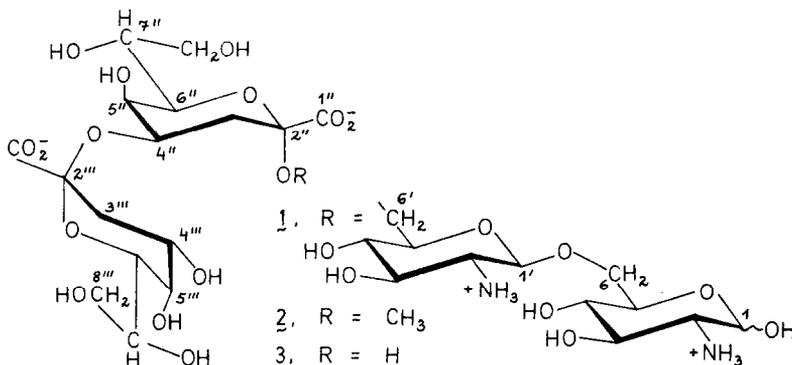
ZUR STRUKTUR DER 3-DESOXYOCTULOSONSÄURE- (KDO-) REGION
 DES LIPOPOLYSACCHARIDS VON Salmonella minnesota Re 595

Rudolf Christian, Gerhard Schulz, Peter Waldstätten und Frank M. Unger*

SANDOZ Forschungsinstitut, A-1235 Wien, Brunnerstraße 59, Österreich

ABSTRACT: Spectroscopic data (^1H - and ^{13}C -N.m.r.) indicate that the tetrasaccharide $\alpha\text{dOclAp}(2\rightarrow4)\alpha\text{dOclAp}(2\rightarrow6)\beta\text{GlcNp}(1\rightarrow6)\text{GlcN}$ is formed upon hydrazinolysis of the lipopolysaccharide from Salmonella minnesota Re 595.

Die hydrazinolytische Abspaltung der Phosphatreste sowie der ester- und amidgebundenen Fettsäuren aus den Lipopolysacchariden (LPS) der "Rauhmutanten" von Enterobacteriaceen liefert zwitterionische Oligosaccharide¹. In unseren Händen hat ein solches Präparat² aus dem LPS von Salmonella minnesota Re 595³ nach chromatographischer Reinigung⁴ (Reversed-phase und Gel-Permeation) $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 37.4^\circ$ (c 0.31, Wasser), und enthält gemäß der Thiobarbitursäure-Reaktion⁵ 2.42 μMol 3-Desoxy-D-manno-2-octulosensäure (KDO)^{6,7} pro mg. Wir berichten hier über ^1H - und ^{13}C -n.m.r.-spektroskopische Modellvergleiche, die wir mit diesem Material angestellt haben und die mit der Struktur 1, $\alpha\text{dOclAp}(2\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{dOclAp}(2\rightarrow6)\text{-}\beta\text{GlcNp}(1\rightarrow6)\text{GlcN}$, im Einklang stehen.

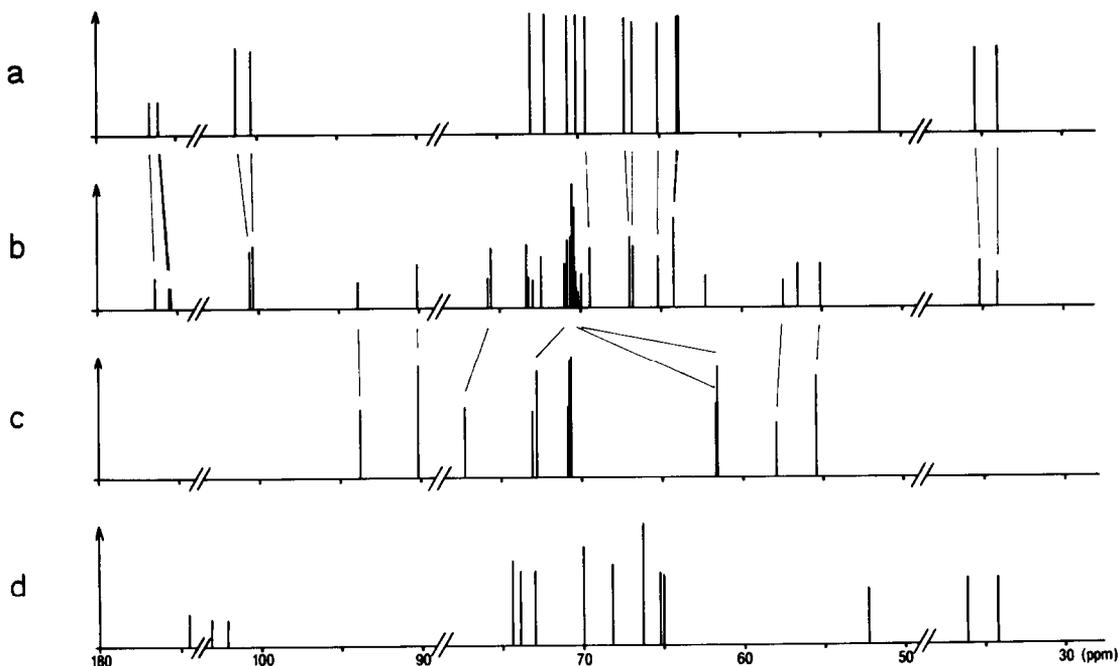


Im ^1H -n.m.r.-Spektrum (250 MHz, Deuteriumoxid) des Oligosaccharids erscheinen zwischen δ 1.7 und 2.2 ppm die für 3-Desoxypyranosonsäuren charakteristischen⁸ Signale der axialen und äquatorialen H-3 der KDO-Einheiten⁹. Aus der Integration folgt, daß im LPS von S. minnesota Re 595 nur zwei¹⁰ statt der erwarteten drei³ KDO-Einheiten zugegen sind. Letztere liegen in der pyranoiden Form vor, und die chemischen Verschiebungen beider äquatorialen H-3 deuten auf die α -Anomerenkonfiguration hin⁸. Dieser Hinweis wird durch die große Ähnlichkeit des Spektrums von 1 mit dem des synthetischen, α,α -verknüpften Modelldisaccharidderivats 2^{11,12} im Bereich δ 1.7-2.2 ppm verstärkt¹³. Im Anomerenbereich finden sich für 1 Signale bei δ 5.44 (J 3.5 Hz) und 4.96 ppm (J 8.8 Hz), die den H-1 des α - bzw.

β -Anomeren einer reduzierenden Glucosamin-Einheit entsprechen. Weiters finden sich Signale bei δ 4.75 (J 8.5 Hz) und 4.76 ppm (J 8.8 Hz), welche wir den H-1' einer β -glycosidisch an reduzierendes α - bzw. β -Glucosamin gebundenen Glucosaminyl-Einheit zuordnen. Schließlich erscheinen im Bereich 3.0-3.3 ppm die den H-2 und H-2' in der Formel 1 entsprechenden Signale⁴.

Das in Abb. 1b als Liniendiagramm dargestellte ¹³C-N.m.r.-Spektrum von 1 ist bereits äußerlich (Abb. 1 und Tabelle 1) als eine Zusammenfügung, entsprechend dem KDO-Disaccharid 2^{11,12} mit zusätzlichen Glucosaminylresten, zu erkennen. Die für die Verknüpfung der KDO-Einheiten untereinander wichtigen Signale liegen im Bereich 63-70 ppm, wo die Glucosamin-Einheiten keine Signale aufweisen. Die Bindung der nichtreduzierenden KDO-Einheit an C-4'' folgt aus der Aufspaltung des C-4'' und C-5'' entsprechenden Signalpaares: Während die Linien für C-4''' und C-5''' eng benachbart bei 67.1 und 66.7 ppm aufscheinen, unterliegt das C-4''-Signal einer Glycosidierungsverschiebung (+ 2.2 auf 69.3) und das C-5''-Signal einer β -Verschiebung (-1.4 auf 65.2 ppm). Eine theoretisch denkbare 5-Substitution wird durch die β -Verschiebung des C-3''-Signals (-1.2 auf 34.1 ppm) und dadurch ausgeschlossen, daß mit Ausnahme des C-2''-Signals (-0.8 auf 100.5 ppm) nur geringfügige Veränderungen gegenüber dem Spektrum von 2 auftreten (Abb. 1 und Tabelle 1). Die (2 \rightarrow 4)-Verknüpfung ist im Einklang mit Befunden früherer Autoren^{15,16} und mit der jüngst¹⁷ zugeordneten Struktur des reduzierenden KDO-Disaccharids 3, welches durch milde Säurehydrolyse aus verschiedenen

Abbildung 1. - Liniendiagramme der ¹³C-N.m.r.-Spektren von a, 2; b, 1; c, Glucosaminhydrochlorid; d, dem synthetischen Modelldisaccharid β DoclAp(2 \rightarrow 4)- β DoclApOMe^{14,4} (62.9 MHz, Bruker WH-250-Gerät).



Re-LPS erhalten wird¹⁸. Die Lage der den Glucosamin-Einheiten zuzuordnenden Signale (Tabelle 1) ist vereinbar mit der in der Literatur¹⁹⁻²¹ postulierten Teilstruktur (KDO) (2→6)βGlcN(1→6)GlcN. Die verhältnismäßig kleine Glycosidierungsverschiebung (+0.9 auf 62.2 ppm) für C-6' ist nicht ungewöhnlich, betragen doch in anderen Modellen die Verschiebungen aufgrund α-ketosidisch verknüpfter KDO ebenfalls nur 1-2 ppm²².

Tabelle 1. ¹³C-N.m.r.-Verschiebungen der Verbindungen 1, 2, Glucosaminhydrochlorid (GlcN . HCl) und Methyl-2-amino-2-desoxy-α- bzw. β-D-glucopyranosid⁴ (αGlcNpOMe . HCl bzw. βGlcNpOMe . HCl) in ppm δ von Tetramethylsilan^{a,b} (vgl. Abb.1).

C-Atom	Verbindung		C-Atom	Verbindung			C-Atom	Verbindung	
	<u>1</u>	<u>2</u>		<u>1</u>	β	α		<u>1</u>	GlcN HCl
C-1'''	176.4	176.7	1'	100.2 ^{c,d}	100.7	97.0	1	90.1	90.1
2'''	100.2 ^c	100.3	2'	56.4	56.6	55.0	2	55.1	55.4
3'''	35.2	35.3	3'	72.4	72.8	70.9	3	70.8	70.7
4'''	66.9	67.1	4'	70.4	70.7	70.4	4	70.8	70.6
5'''	66.7	66.7	5'	75.5	77.0	72.8	5	71.0	72.7
6'''	73.3	73.0	6'	62.2 ^c	61.3	61.3	6	69.8 ^c	61.5
7'''	70.5	70.7					1β	93.8	93.9
8'''	64.2 ^c	63.9					2β	57.4	57.9
1''	175.4+5	176.1					3β	73.1	73.0
2''	100.5 ^c	101.3					4β	72.9	70.8
3''	34.1	34.0					5β	75.6	77.2
4''	69.3	69.6					6β	70.3 ^c	61.6
5''	65.2	65.1							
6''	73.2	72.1							
7''	70.4	70.2							
8''	64.2 ^c	63.8							

- a) Externer Standard Dioxan bei 67.4 ppm.
 b) Die Zuordnungen im Bereich 70-71 ppm sind unsicher.
 c) Zuordnung mit Hilfe eines J-modulierten Spektrums^{4,23}.
 d) Im J-modulierten Spektrum teilweise gelöscht durch negatives C-2''-Signal.

Die Aufspaltung bzw. Verbreiterung der Signale entsprechend C-1''(175.42 und 175.47), C-2'', C-3'' und C-6' ist im Einklang mit der Lage der betreffenden KDO-Einheit näher zum reduzierenden Ende des Tetrasaccharids.

Während der Abfassung der vorliegenden Mitteilung erschien eine Arbeit²⁴, worin der vergleichbaren KDO-Region eines *Escherichia coli*-Re-Mutanten-LPS aufgrund von ¹³C-N.m.r.-Daten die Struktur αdOciAp(2→5)αdOciAp(2→6)βGlcNp.. zugeordnet wird. Während jene Daten teilweise mit unseren übereinstimmen, ist die dort vorgenommene Zuordnung der (2→5)-

Verknüpfung unsicher²⁴. Es bedarf daher zusätzlicher Versuche, um zu zeigen, ob sich die Re-LPS aus Salmonella bzw. E. coli-Stämmen in der Tat bezüglich ihrer KDO-Regionen unterscheiden.

DANKSAGUNG: Unser herzlicher Dank gilt den Herren Prof. E.Th. Rietschel und Dr. H. Brade (beide Forschungsinstitut Borstel, B.R.D.) für großzügige Gaben von Re-595-LPS, Herrn Prof. A. Neszmélyi (Budapest) für zahlreiche anregende Diskussionen auf dem Gebiet der ¹³C-N.m.r.-Spektroskopie, und Prof. O. Lüderitz (Freiburg i. Br.) für sein freundliches Interesse an diesen Arbeiten.

LITERATUR

1. O. Lüderitz, K.-I. Tanamoto, C. Galanos, O. Westphal, U. Zähringer, E.Th. Rietschel, S. Kusumoto und T. Shiba, ACS Symposium Series 231, 3-17 (1983).
2. Die Hydrazinolyse erfolgte nach G. Strecker, A. Pierce-Cretel, B. Fournet, G. Spik und J. Montreuil, Anal. Biochem. 111, 17 (1981).
3. W. Dröge, V. Lehmann, O. Lüderitz und O. Westphal, Eur. J. Biochem., 14, 175 (1970).
4. R. Christian, G. Schulz und F.M. Unger, in Vorbereitung.
5. Y.D. Karkhanis, J.Y. Zeltner, J.J. Jackson und D.J. Carlo, Anal. Biochem. 85, 595 (1978)
6. E.C. Heath und M.A. Ghalambor, Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 340 (1963).
7. F.M. Unger, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 38, 323-388 (1981).
8. J. Haverkamp, J. Dorland, J.F.G. Vliegenthart, J. Montreuil und R. Schauer, Abstr. Int. Symp. Carbohydr. Chem., 9th, D-4 (1978).
9. δ 1.75 (dd, J 12.5; 12.5 Hz, H-3" a), 1.91 (dd, J 13.8; 12.5 Hz, H-3" a), 2.03 (dd, J 13.8; 5 Hz, H-3" e) und 2.15 ppm von internem Tetramethylsilan (dd, J 12.5; 5 Hz, H-3" e); vgl. Zitat 7. und F.M. Unger, D. Stix und G. Schulz, Carbohydr. Res., 80, 191 (1980).
10. S.M. Strain, S.W. Fesik und I.M. Armitage, J. biol. Chem. 258, 2906 (1983).
11. P. Waldstätten, R. Christian, H. Paulsen, G. Schulz und F.M. Unger, in Vorbereitung.
12. H. Paulsen, Y. Hayauchi und F.M. Unger, Carbohydr. Res. 111 (1983) C5-C8.
13. 2: δ 1.78 (J 13; 12.5 Hz, H-3" a), 1.89 (J 12.5; 12.5 Hz, H-3" a), 1.98 (J 12.5; 5 Hz, H-3" e) und 2.14 ppm (J 13; 5 Hz, H-3" e).
14. P. Waldstätten, R. Christian, G. Schulz, F.M. Unger, P. Kosma, C. Kratky und H. Paulsen, ACS Symposium Series 231, 121 (1983).
15. P. Prehm, S. Stirm, B. Jann und K. Jann, Eur. J. Biochem. 56, 41 (1975).
16. R.S. Munson, Jr., N.S. Rasmussen und M.J. Osborn, J. biol. Chem. 253, 1503 (1978).
17. H. Brade, U. Zähringer, E. Th. Rietschel, R. Christian, G. Schulz und F.M. Unger, Carbohydr. Res., im Druck.
18. H. Brade, C. Galanos und O. Lüderitz, Eur. J. Biochem. 131, 201 (1983).
19. E. Th. Rietschel, H.-W. Wollenweber, Z. Sidorczyk, U. Zähringer und O. Lüderitz, ACS Symposium Series 231, 217 (1983).
20. M. Imoto, S. Kusumoto, T. Shiba, H. Naoki, M. Iwashita, E.Th. Rietschel, H.-W. Wollenweber, G. Galanos und O. Lüderitz, Tetrahedron Lett. 24, 4017 (1983).
21. K. Takayama, N. Qureshi und P. Mascagni, J. biol. Chem. 258, 12801 (1983).
22. A. Neszmélyi, P. Kosma, R. Christian, G. Schulz und F.M. Unger, in Vorbereitung.
23. D.W. Brown, T.T. Nakashima und D.L. Rabenstein, J. Magn. Reson. 45, 302 (1981).
24. S.M. Strain, S.W. Fesik und I.M. Armitage, J. biol. Chem. 258, 13466 (1983).

(Received in Germany 6 April 1984)