

Рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида *P. aeruginosa* O(3a), 3d, 3f

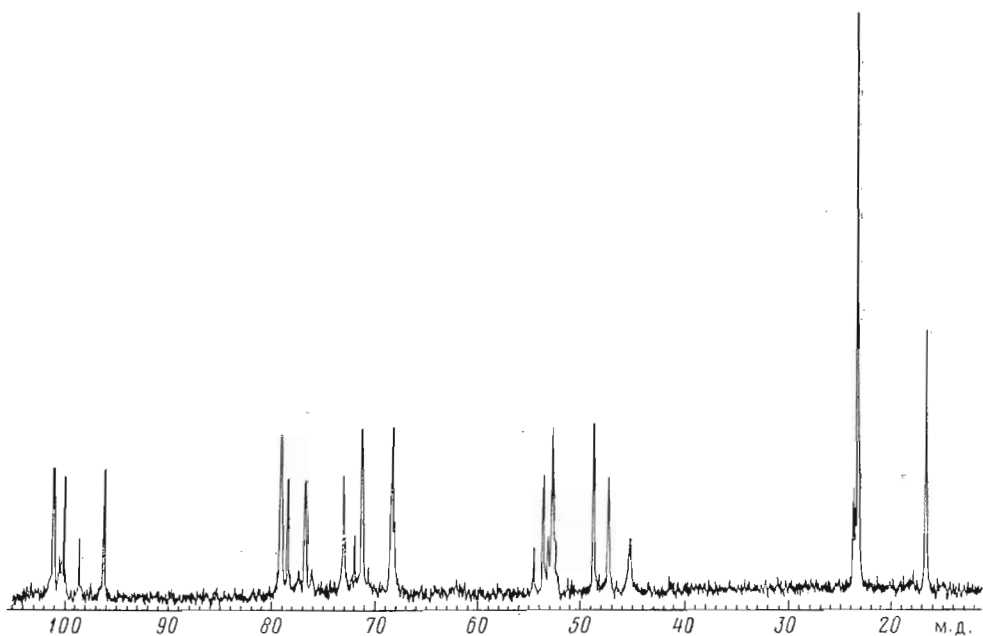


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр обработанного триэтиламинем полисахарида *P. aeruginosa* O(3a), 3d, 3f

пик, что свидетельствовало о его гомогенности по плотности отрицательного заряда.

В ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида (рис. 1) присутствовали сигналы метильной группы 6-дезоксахара при 16,3 м.д., N-ацетильных групп при 22,9–23,0 м.д., O-ацетильной группы при 21,4 м.д., сигналы ацетамидиновых групп (19,7 и 20,8 м.д., CH_3 , 167,4; 168,2 и 170,0 м.д., $\text{N}=\text{C}-\text{N}$), сигналы карбонильных углеродных атомов ацетильных и карбоксильных групп в области 173–177 м.д., группа сигналов аномерных атомов углерода в области 95–100 м.д., атомов углерода, связанных с азотом, при

Химические сдвиги в ¹³C-ЯМР-спектрах (δ, м. д.) *

Соединение	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Звено А						
ПС О(3а), 3d, 3f **	99,7	45,4	49,8	70,8	67,9	
	99,7	50,9	57,4	71,6	78,5	
Обработанный Et ₃ N ПС	100,0	45,1	47,2	72,9	68,3	
О(3а), 3d, 3f **	100,4	52,5	54,4	71,9	77,3	
ПС иммунотипа 7	99,9	45,7	50,0	70,7	68,4	
ПС О3а, 3d [4]	99,8	51,0	57,6	71,4	78,7	
Обработанный Et ₃ N ПС им- мунотипа 7 [6]	100,1	45,2	46,8	72,6	68,9	
Обработанный Et ₃ N ПС	100,7	52,2	54,1	71,7	77,2	
О3а, 3d [4]						
Трисахарид (I)	100,0	45,6	54,7	67,3	69,3	
(II)	99,5	50,7	57,4	67,1	78,4	
Бнозид (III)	99,9	47,2	57,9	65,4	69,4	
(IV)	99,6	50,7	57,5	67,2	79,0	
(V) [4]	99,7	50,6	57,4	67,2	78,5	
Трисахарид (VI)	100,1	45,2	51,5	69,3	69,3	
(VII)	100,9	52,6	54,6	67,3	79,2	
Бнозид (VIII)	100,2	45,1	51,5	69,0	69,0	
(IX)	100,6	52,1	54,6	67,3	78,6	
(X) [4]	100,6	52,4	54,4	66,9	77,6	
Звено В						
ПС О(3а), 3d, 3f **	99,7	52,3	53,2	76,9	77,7	
	99,7	52,3	53,2	76,9	77,7	
Обработанный Et ₃ N	101,0	52,6	53,5	76,7	78,4	
ПС О(3а), 3d, 3f **	100,9	52,4	53,0	76,2	76,7	
ПС иммунотипа 7	101,0	52,5	53,5	77,4	77,9	
ПС О3а, 3d [4]	100,8	52,4	52,8	76,5	77,5	
Обработанный Et ₃ N	100,9	52,7	53,5	76,6	79,2	
ПС иммунотипа 7						
Обработанный Et ₃ N	100,9	52,0	52,8	75,6	76,3	
ПС О3а, 3d [4]						
Трисахарид (I)	100,8	52,4	53,5	77,4	78,4	
(II)	100,9	52,5	53,4	75,8	78,2	
Бнозид (III)	99,6	52,1	54,2	78,0	78,0	
(IV)	100,0	52,2	53,2	76,0	78,1	
(V) [4]	100,6	52,2	53,2	76,1	77,9	
Трисахарид (VI)	100,9	52,7	53,5	76,4	79,2	
(VII)	100,9	52,2	53,2	75,3	76,4	
Бнозид (VIII)	100,3	52,4	53,7	76,7	78,0	
(IX)	100,3	52,0	53,2	75,7	76,5	
(X) [4]	100,8	52,0	53,0	75,7	77,4	
Звено С						
ПС О(3а), 3d, 3f **	95,4	49,0	74,9	72,9	67,5	16,3
	98,2	49,4	74,7	72,9	67,3	16,3
Обработанный Et ₃ N	96,2	48,6	79,0	71,2	68,2	16,4
ПС О(3а), 3d, 3f **	98,5	48,6	79,0	71,1	68,1	16,4
ПС иммунотипа 7	95,5	48,4	79,1	71,2	68,6	16,5
ПС О3а, 3d [4]	98,3	48,7	78,7	70,9	68,2	16,4
Обработанный Et ₃ N	95,7	48,6	79,2	71,2	68,0	16,4
ПС иммунотипа 7						
Обработанный Et ₃ N	98,7	48,4	78,8	71,1	68,1	16,4
ПС О3а, 3d [4]						
Трисахарид (I)α	92,3	49,3	79,0	71,3	67,1	16,7
β	96,0	53,0	81,9	70,7	71,6	16,7
(II)α	92,3	49,3	79,0	71,3	67,1	16,7
β	96,1	53,1	81,9	70,7	71,6	16,7
Бнозид (III)	62,0	52,6	77,0	73,7	66,1	19,4
(IV)	62,1	52,6	77,0	73,7	66,1	19,4
(V) [4]	61,7	52,7	80,8	62,4		
Трисахарид (VI)α	92,3	49,4	79,4	71,3	67,5	16,8
β	96,0	52,7	82,2	70,6	71,7	16,8
(VII)α	92,3	49,4	72,4	71,3	67,5	16,8
β	96,0	52,9	82,2	70,6	71,7	16,8
Бнозид (VIII)	61,9	52,6	77,1	73,6	66,2	19,3
(IX)	62,0	52,6	77,0	73,6	66,2	19,3
(X) [4]	61,7	52,7	80,6	62,6		

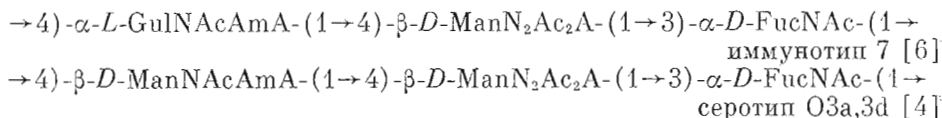
* ПС — полисахарид. Химические сдвиги сигналов (м. д.): CH₃CON 22,9—23,7, CH₃COO 21,1—21,5, CH₃C(=N)N 19,6—20,9, N=C—N 167,0—170,2, CH₂CO и COOH 173—176, CH₂CH₂ 10,9, CH₂CH 45,1.

** В первой строке приведены химические сдвиги для повторяющихся звеньев с α-L-гуло-конфигурацией звена А.

45–58 м.д. и вторичных атомов углерода, связанных с кислородом, в области 67–80 м.д. Интегральные интенсивности большинства сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектре были неэквивалентными по отношению друг к другу, что указывало на отсутствие истинной регулярности в структуре этого полисахарида.

При кислотном гидролизе полисахарида был идентифицирован *D*-фукозамин, в то время как остальные компоненты, являющиеся, по-видимому, производными 2,3-диамино-2,3-дидезоксиуроновых кислот [3], обнаружены не были. Такое поведение этих моносахаридов отмечалось нами ранее при исследовании остальных полисахаридов серогруппы ОЗ [2, 3]; оно является следствием чрезвычайно высокой устойчивости их гликозидных связей к кислотному гидролизу, а также неустойчивости их свободных форм в условиях гидролиза.

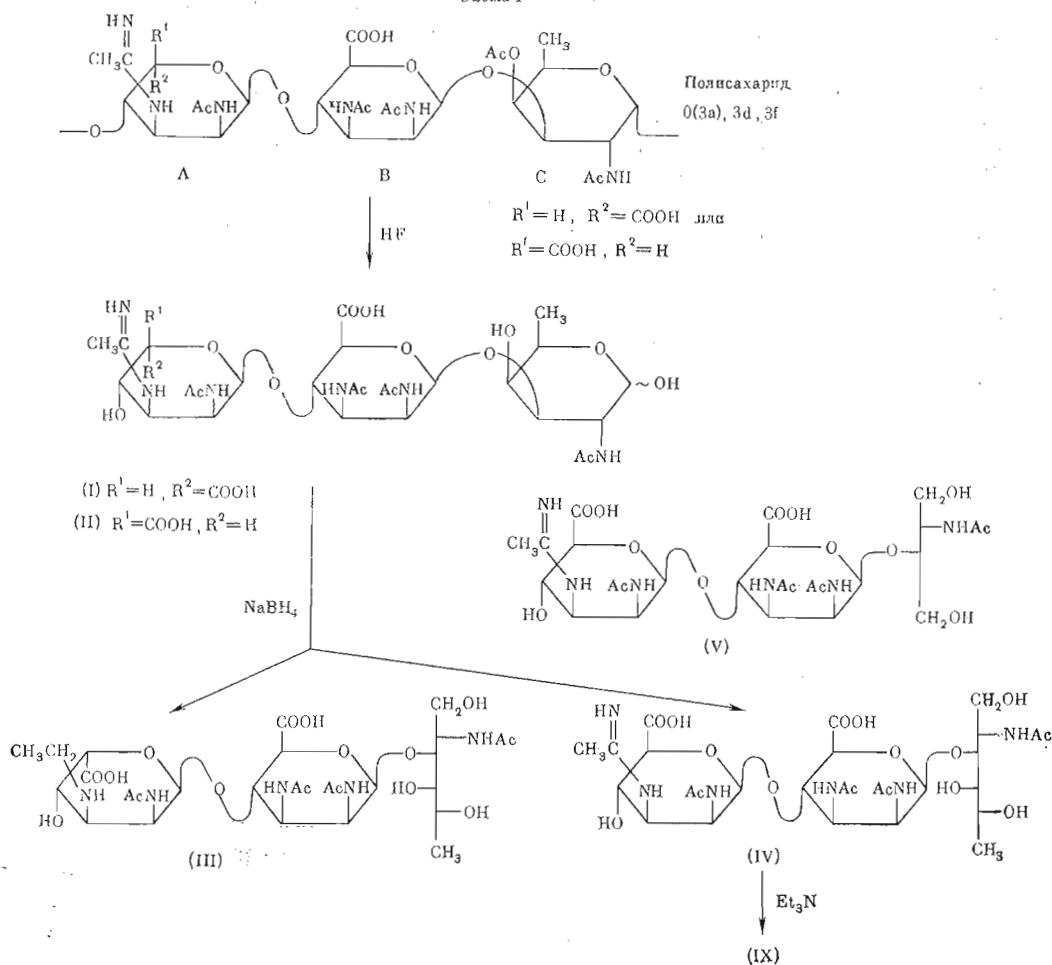
Далее полисахарид был обработан водным триэтиламином с целью превращения ацетамидиновых групп в ацетамидные и удаления *O*-ацетильных групп [8]. В ^{13}C -ЯМР-спектре модифицированного полисахарида (рис. 2) в области сильного поля присутствовали сигналы метильной группы 6-дезоксисахара при 16,4 м.д. и *N*-ацетильных групп при 23,1 м.д., тогда как сигналы *O*-ацетильных и ацетамидиновых групп отсутствовали. В области резонанса углеродных атомов C1–C5 моносахаридов спектр содержал две серии сигналов с соотношением интегральных интенсивностей $\sim 2:1$. Спектр, образованный сигналами преобладающей серии, был очень похож на спектр обработанного триэтиламином полисахарида *P. aeruginosa*, иммунотип 7 [6], а спектр второй серии был практически идентичен спектру обработанного таким же образом полисахарида *P. aeruginosa* ОЗ_а,3д [2, 4] (таблица). Эти два изученных ранее полисахарида [2, 4, 6] однотипно построены из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих *N*-ацетил-*D*-фукозамин, 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси-*D*-маннуроновую кислоту и 3-ацетамидино-2-ацетамидо-2,3-дидезоксиуроноукислоту с *L*-гуло-конфигурацией в полисахаридах иммунотипа 7 и *D*-манно-конфигурацией в полисахаридах серотипа ОЗ_а,3д, и имеют следующие структуры:



Совпадение линий в ^{13}C -ЯМР-спектрах позволяло предполагать, что полисахарид серотипа О(З_а),3д,3f одновременно включает повторяющиеся звенья как полисахарида иммунотипа 7, так и полисахарида серотипа ОЗ_а,3д. Для подтверждения этого предположения как интактный, так и обработанный триэтиламином полисахарид серотипа О(З_а),3д,3f были подвергнуты сольволизу безводным фтористым водородом. Этот метод получения олигосахаридных фрагментов очень удобен в применении к полисахаридам данной группы, так как при сольволизе избирательно расщепляется гликозидная связь *N*-ацетилфукозамина, а гликозидные связи производных диаминоуроновых кислот полностью устойчивы, и в результате образуются трисахариды, представляющие собой химические повторяющиеся звенья этих полисахаридов [2–4, 6]. *N*-Ацетильные и ацетамидиновые группы фтористым водородом не затрагиваются [2–4, 6], тогда как *O*-ацетильные группы в условиях сольволиза полностью удаляются [10].

В результате сольволиза интактного полисахарида серотипа О(З_а),3д,3f образовалась смесь двух олигосахаридов (I) и (II), которые, по данным ^{13}C -ЯМР-спектра, являлись трисахаридами. За исключением *O*-ацетильных групп, они содержали все моносахаридные и неуглеводные компоненты полисахарида (схема 1). Спектры трисахаридов (I) и (II) (таблица) были идентичны спектрам трисахаридов, полученных ранее в качестве единственных продуктов расщепления безводным фтористым водородом полисахарида иммунотипа 7 [6] и серотипа ОЗ_а,3д [2, 4] соответственно.

Схема 1

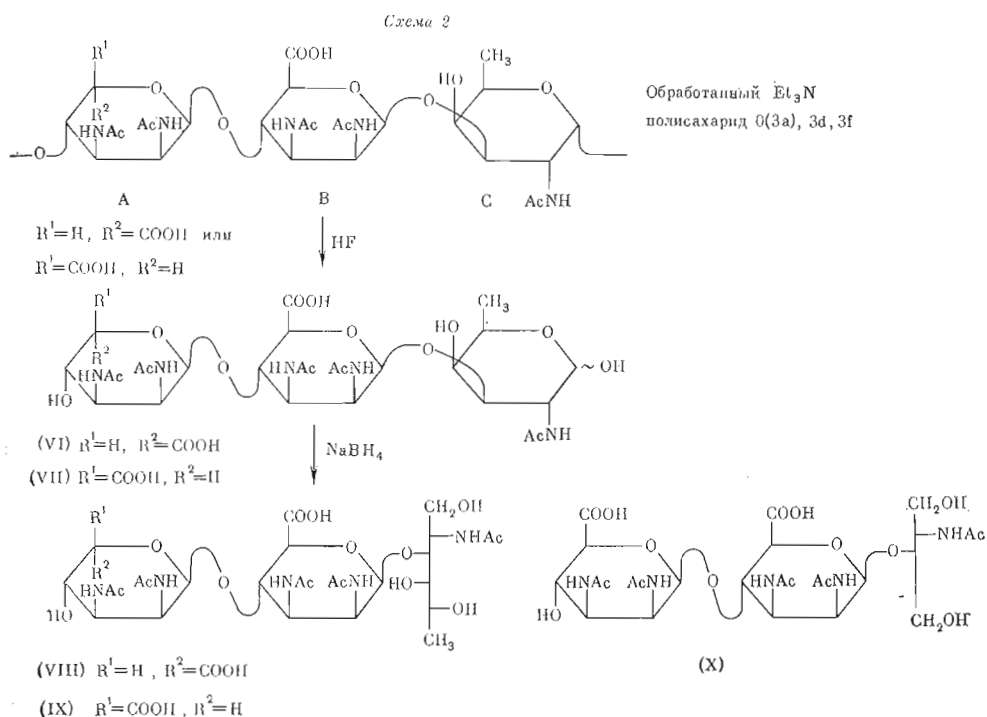


Смесь трисахаридов (I) и (II) была восстановлена боргидридом натрия в воде в смесь биозидов (III) и (IV), в которой основным компонентом был биозид (III). По данным ¹³C-ЯМР-спектра, он был идентичен продукту восстановления трисахарид (I), полученного из полисахарида иммунотипа 7 [6]. Восстановление этого трисахарид не только приводит к превращению находящегося на восстанавливаемом конце (I) остатка N-ацетилфукозамина (δ_c 92,3, C1 α , 96,0, C1 β , 16,7, C6) в остаток N-ацетилфукозаминитола (δ_c 62,0, C1, 19,4, C6), но и сопровождается восстановительным дезаминированием ацетамидиновой группы (δ_c 26,6, CH₃, 168,2, N=C-N), находящейся в положении 3 производного гулурановой кислоты, в этиламиногруппу (δ_c 10,9, CH₃, 45,0, CH₂) [6].

При действии боргидрида натрия на трисахарид (II), в котором ацетамидиновая группа находится в положении 3 производного маннуроновой кислоты, в соответствии со сделанным ранее наблюдением [4] восстановительного дезаминирования не происходит. ¹³C-ЯМР-спектр образовавшегося при этом биозид (IV) в области сигналов производных диаминоуроновых кислот был практически идентичен спектру биозид (V), отличающегося от него только структурой агликона (N-ацетилфукозаминитол в (IV) или N-ацетилтреит в (V)). Биозид (V) был получен ранее при структурном исследовании полисахарида серотипа О3а,3д путем боргидридного восстановления трисахарид (II) с последующим периодатным окислением и повторным боргидридным восстановлением [2]. В области сигналов агликона спектр биозид (IV) был идентичен спектру биозид (III), и, таким образом, этот биозид имеет структуру, приведенную на схеме 1.

Смесь биозидов (III) и (IV) была подвергнута обработке триэтил-амином, в результате которой произошел гидролиз ацетамидиновой группы в биозиде (IV) в ацетамидную группу. Анализ методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии показал, что преобладающим компонентом полученной смеси является неизменившийся биозид (III), выделенный в индивидуальном виде высокоэффективной ионообменной хроматографией на TSK DEAE-3SW. Минорным компонентом этой смеси был биозид (IX), полученный также из продуктов сольволиза фтористым водородом обработанного триэтиламино полисахарида серотипа O(3a),3d,3f (схема 2).

Первичными продуктами этого сольволиза являлись трисахариды (VI) и (VII), действием боргидрида натрия превращенные в биозиды (VIII) и (IX) (схема 2). Трисахарид (VI) и биозид (VIII), по данным ^{13}C -ЯМР-спектров, были идентичны продуктам, полученным ранее аналогичным путем из обработанного триэтиламино полисахарида иммунотипа 7 [6]. Трисахарид (VII) и биозид (IX) не были описаны при структурном анализе полисахарида серотипа O3a,3d, однако их ^{13}C -ЯМР-спектры в области сигналов производных диаминоуроновых кислот совпадали со спектром полученного ранее из полисахарида серотипа O3a,3d биозида (X) [3], а в области сигналов N-ацетилфукозаминина (для (VII)) и N-ацетилфукозаминитола (для (IX)) — со спектрами трисахарид (VI) и биозид (VIII) соответственно. Таким образом, трисахарид (VII) и биозид (IX) имеют структуры, приведенные на схеме 2.



Полученные данные подтверждают, что обработанный триэтиламино полисахарид серотипа O(3a),3d,3f построен из повторяющихся звеньев двух типов, один из которых был идентифицирован ранее у обработанного триэтиламино полисахарида иммунотипа 7 [6], а второй — у аналогично обработанного полисахарида серотипа O3a,3d [2,4]. Соответственно повторяющиеся звенья интактного полисахарида серотипа O(3a),3d,3f отличаются от звеньев двух ранее изученных полисахаридов присутствием O-ацетильных групп. Так как в повторяющихся звеньях всех полисахаридов этой группы имеется только одна негликозилированная гидроксильная группа — в положении 4 N-ацетилфукозаминина, O-ацетильная группа может быть однозначно локализована на этом моносахариде. Смещение сигналов C3, C4 и C5 N-ацетилфукозаминина от 78,7–78,8,

70,9—71,2 и 68,2—68,5 м.д. в спектрах полисахарида иммунотипа 7 и серотипа O3a,3d к 74,7—74,9, 72,9 и 67,3—67,5 м.д. в спектре полисахарида серотипа O(3a),3d,3f (таблица) находятся в соответствии с α - и β -эффектами ацетилирования этого моносахарида по O4 [11]. Изменяет свое положение на 1,1—1,3 м.д. при O-ацетилировании также сигнал C1 присоединенного к N-ацетилфукозамину в положение 3 остатка 2,3-диацетиамидо-2,3-дидезоксиманнуриновой кислоты, тогда как химические сдвиги остальных сигналов в спектрах изменяются незначительно.

¹³C-ЯМР-спектр интактного полисахарида серотипа O(3a),3d,3f кроме двух основных серий сигналов содержал также минорные сигналы, которые не могли быть отнесены ни к одному из двух идентифицированных типов повторяющихся звеньев. Их присутствие может быть объяснено неполнотой O-ацетилирования N-ацетилфукозамина (например, сигнал при 100,8 м.д., принадлежащий C1 2,3-диацетиамидо-2,3-дидезоксиманнуриновой кислоты в не содержащих O-ацетильных групп повторяющихся звеньях) и частичной заменой ацетамидиновой группы в производном L-гулуриновой кислоты на ацетамидную группу (например, сигнал C2 2,3-диацетиамидо-2,3-дидезоксигулуриновой кислоты при 47,2 м.д. и сигнал C1 присоединенного к ней N-ацетилфукозамина при 96,3 м.д.). Судя по интенсивности сигналов в спектре интактного полисахарида, каждый из этих двух дополнительных типов звеньев составляет не более 10% от общего числа повторяющихся звеньев. Кроме того, ¹³C-ЯМР-спектр интактного полисахарида указывал на нерегулярность, связанную с существованием ацетамидинового производного гулуриновой кислоты в двух устойчивых формах (вероятно, E- и Z-изомеры), которым в спектре соответствует по две линии для C3 и C4 этого моносахарида (49,8 и 50,9; 70,8 и 72,2 м.д. соответственно), для C1 присоединенного к нему остатка N-ацетилфукозамина (95,4 и 95,5 м.д.) и для группы N=C—N (168,2 и 170,2 м.д.); соотношение интенсивностей этих линий составляет ~2—3:1 (в таблице приведены данные для доминирующей серии). В обработанном триэтиламиноом полисахариде, в котором отсутствуют как O-ацетильная, так и ацетамидиновая группа, все перечисленные в этом абзаце типы нерегулярности, естественно, не наблюдались.

Таким образом, O-специфический полисахарид серотипа O(3a),3d,3f построен в основном из трисахаридных звеньев двух типов, отличающихся друг от друга только конфигурацией C5 ацетамидинового производного уроновой кислоты. Преобладающие звенья составляют 65—70% от их общего числа и являются O-ацетилированной формой повторяющихся звеньев полисахарида иммунотипа 7 [6], а звенья, находящиеся в меньшинстве, представляют собой O-ацетилированную форму повторяющихся звеньев полисахарида серотипа O3a,3d [2, 4].

Если предположить, что оба типа звеньев присутствуют в составе одной полимерной цепи, то O-специфический полисахарид серотипа O(3a),3d,3f имеет гибридную структуру, причем такой тип замаскированной регулярности впервые обнаружен у полисахаридных цепей бактериальных O-антигенов, которые обычно либо являются строго регулярными полимерами, либо нерегулярность в их структуру вносится нестехиометрическим O-ацетилированием или гликозилированием основной регулярной цепи [12]. Гибридная структура полисахарида O(3a),3d,3f может быть объяснена особенностью его биосинтеза, включающего стадию частичной эпимеризации по C5 ацетамидинового производного β -D-маннуриновой кислоты с образованием соответствующего α -L-гуло-изомера в синтезированном на предыдущих стадиях регулярном полисахариде с β -D-манно-конфигурацией обоих производных уроновых кислот (ср. с биосинтезом альгиновой кислоты [13]). Однако для окончательного решения этих вопросов потребуются получение олигосахаридных фрагментов полисахарида, включающих не менее двух повторяющихся звеньев, и обнаружение соответствующей C5-эпимеразы у *P. aeruginosa* O(3a), 3d,3f.

Экспериментальная часть

¹³C-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в D₂O при 60° С для полисахаридов и при 25° С для олигосахаридов при использовании в качестве внутреннего стандарта метанола (δ_C 50,15). Оптическое вращение определяли на приборе Perkin — Elmer, модель 141, в воде при 20° С. Хроматография на бумаге FN-11 выполнена в системе пиридин — бутанол — уксусная кислота — вода (5:5:1:3) при обнаружении веществ спиртовым раствором лингидрина. Гель-фильтрация проведена на колонке (80×1,5 см) с TSK HW 40 в воде; элюционные кривые построены с использованием дифференциального рефрактометра Кнауер (ФРГ). Высокоэффективная ионообменная хроматография выполнена на колонке (7,5×150 мм) TSK DEAE-3SW (LKB, Швеция), уравновешенной 0,02 М раствором NaH₂PO₄ в воде; элюирование проводилось в линейном градиенте (0–0,5 М) NaCl в том же буфере, скорость элюирования 1 мл/мин, элюционные кривые построены с использованием УФ-детектора Кнауер (ФРГ). Растворы поли- и олигосахаридов лиофилизировали или упаривали в вакууме при 40° С. Выделение липополисахарида по методу [14] и O-специфического полисахарида описано в работе [3].

Гидролиз полисахарида (40 мг) проводили 4 М HCl (5 мл, 100° С, 4 ч), гидролизат упаривали, остаток упаривали многократно с водой, препаративной хроматографией на бумаге выделили хлоргидрат D-фукозамина (3,2 мг), $[\alpha]_D^{+78}$ (с 0,3), ср. [15]: $[\alpha]_D^{+93}$ (вода).

Обработка полисахарида триэтиламином. Раствор полисахарида (100 мг) в 5% водном триэтиламинe (5 мл) нагревали 4 ч при 70° С, упаривали, гель-фильтрацией на TSK HW 40 выделили модифицированный полисахарид (90 мг).

Сольволиз фтористым водородом. Полисахарид O(3a),3d,3f (100 мг) высушивали в вакууме над P₂O₅ (70° С, 3 ч), обрабатывали в герметичном тефлоновом реакторе безводным HF (10 мл, 20° С, 3,5 ч), свежерегенерированным над CoF₃ [16], HF удаляли в вакууме при поглощении твердым NaOH, продукт растворяли в воде, гель-фильтрацией на TSK HW 40 выделили смесь олигосахаридов (I) и (II) (70 мг). Аналогичный сольволиз обработанного триэтиламином полисахарида привел к смеси олигосахаридов (VI) и (VII).

Химическая модификация олигосахаридов. а) Смесь олигосахаридов (I) и (II) (60 мг) восстанавливали избытком боргидрида натрия в воде (20°, 16 ч), подкисляли 2 М HCl, гель-фильтрацией на TSK HW 40 выделили смесь биозидов (III) и (IV) (50 мг). Аналогично из смеси олигосахаридов (VI) и (VII) была получена смесь биозидов (VIII) и (IX).

б) Смесь биозидов (III) и (IV) (30 мг) обрабатывали 5% водным триэтиламином (3 мл, 70° С, 3 ч), упаривали, гель-фильтрацией на TSK HW 40 выделили смесь биозидов (III) и (IX) (20 мг), из которой препаративной высокоэффективной ионообменной хроматографией на TSK DEAE-3SW с последующей деионизацией гель-фильтрацией на TSK HW 40 были выделены биозид (III) (8 мг), элюирующийся при концентрации NaCl 0,16 М, и фракция (4 мг), элюирующаяся при концентрации NaCl 0,27 М и содержащая биозид (IX) с примесью неидентифицированного соединения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Захарова Н. Я., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1936, т. 12, № 11, с. 1530–1539.
2. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 128, № 1, p. 81–90.
3. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1983, v. 134, № 2, p. 289–297.
4. Книрель Ю. А., Парамонов Н. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 7, с. 995–997.
5. Lányi B. Acta microbiol. Acad. scient. hung., 1966/1967, v. 13, p. 295–318.
6. Книрель Ю. А., Парамонов Н. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 7, с. 992–994.
7. Fisher M. W., Devlin H. B., Gnabasiak F. J. J. Bacteriol., 1969, v. 98, № 2, p. 835–836.
8. Книрель Ю. А., Виноградов Е. В., Парамонов Н. А., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 9, с. 1263–1267.
9. Wokatsch R. Zbl. Bakt., I. Abt., Orig., 1964, v. 192, p. 468.
10. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 1, p. 221–227.

