



УДК 577.114.5:579.841.14

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

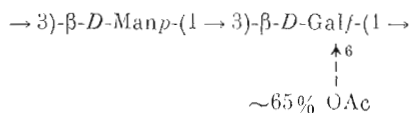
33 *. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS CERACIA*, СЕРОТИП 6

*Книрель Ю. А., Шапков А. С., Солдаткина М. А. *,
Захарова Н. Я. **

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

**Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
Академии наук УССР, Киев*

При мягкой кислотной деградации липополисахарида *Pseudomonas ceracia*, серотип 6, получен О-специфический полисахарид, содержащий *D*-маннозу и *D*-галактозу в соотношении ~1:1, а также О-ацетильные группы. На основании анализа бездеструктивными методами (¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопия, расчет удельного оптического вращения), а также методом метилирования установлено, что полисахарид имеет следующую структуру:



Обсуждаются закономерности в эффектах гликозилирования в ¹³C-ЯМР-спектрах 1,3-связанных дисахаридных фрагментов, содержащих моносахаридные остатки в фуранозной форме.

Настоящая работа продолжает иммунохимическое исследование О-антигенов *Pseudomonas ceracia* [1] и посвящена установлению строения О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида штамма ИМВ 4205 (=СIP 8240), представляющего серотип 6 в схеме серотипирования [2].

Липополисахарид был выделен из бактериальных клеток и освобожден от нуклеиновых кислот по методу [3]. Он обладал специфической активностью в серологических реакциях (титры антител 1:200 000 и 1:256 в реакциях коаггуляционной и пассивной гемагглютинации соответственно) и давал одну полосу преципитации с гомологичной О-аггисывороткой при двойной диффузии в агаре. Полисахарид, полученный при мягком кислотном расщеплении липополисахарида ($[\alpha]_D^{20} -71,7^\circ$ (вода)), по серологической специфичности и активности был аналогичен исходному полимеру.

При кислотном гидролизе полисахарида образовались манноза и галактоза примерно в равном количестве, которые были идентифицированы методом ГЖХ в виде полных ацетатов полиолов.

В ¹³C-ЯМР-спектре полисахарида (рис. 1) присутствовали сигналы двух аномерных атомов углерода при 105,8 и 100,6 м.д. (второй сигнал был расщеплен на две рядом лежащие линии) и группа сигналов в области 62—86 м.д. с различной интегральной интенсивностью, а также сигнал О-ацетильной группы (СН₃ при 21,2 м.д.). Из этих данных следовало, что полисахарид лишен истинной регулярности, наиболее вероятно вследствие присутствия О-ацетильных групп в нестехиометрическом по отношению к моносахаридам количестве. Действительно, в спектре полисахарида, О-деацетилированного действием водного триэтиламина, в области

* Сообщение 32 см. [1].

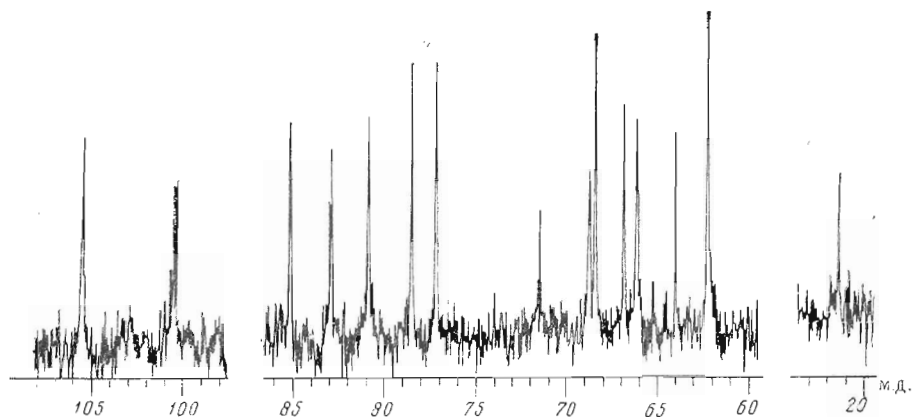


рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. seracia*, серотип 6

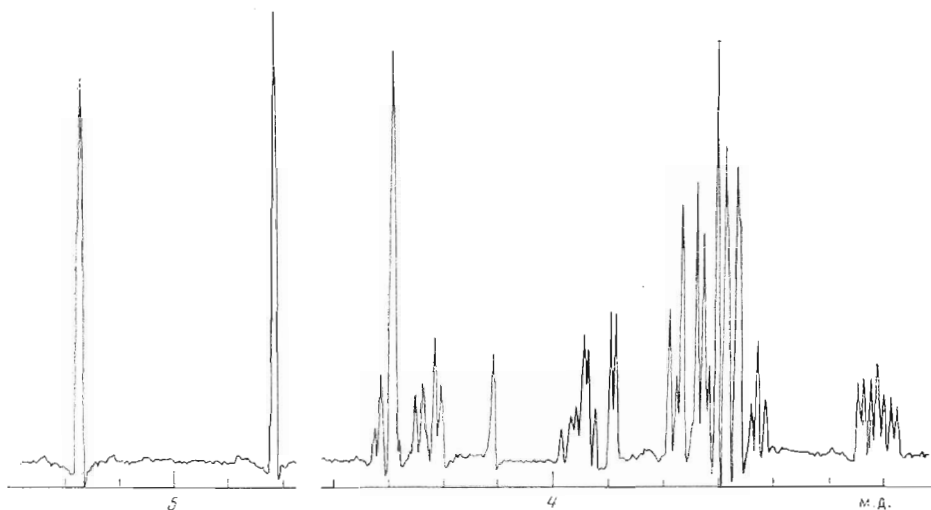


рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр дезацетилированного О-специфического полисахарида *P. seracia*, серотип 6

62–86 м.д. присутствовали 10 сигналов примерно равной интенсивности и 2 сигнала аномерных атомов углерода при 105,5 и 100,7 м.д. Следовательно, О-дезацетилированный полисахарид является регулярным и построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих по одному остатку маннозы и галактозы.

Структурный анализ О-дезацетилированного полисахарида был проведен бездеструктивным путем методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. ^1H -ЯМР-спектр этого полисахарида (рис. 2) был расшифрован с помощью селективного гомоядерного двойного резонанса (табл. 1). На основании химических сдвигов [4] и констант спин-спинового взаимодействия [5, 6] был сделан вывод о том, что остаток маннозы находится в пиранозной форме и имеет β -конфигурацию, а остаток галактозы находится в фуранозной форме и также имеет β -конфигурацию.

При предоблучении протона Н1 остатка β -галактофуранозы при 5,16 м.д. наблюдались ядерные эффекты Оверхаузера на протонах Н2 и Н3 остатка маннопиранозы при 4,21 и 3,75 м.д. соответственно. Так как эффект на Н3 при замещении остатка маннозы в положение 2 невозможен из-за его пространственной удаленности от протона Н1 гликозилирующей моносахарида, из полученного результата следует вывод, что остаток маннозы замещен в положение 3 (эффекты на Н2 и Н3 наблюдаются в аналогичном эксперименте с β 1,3-связанным дисахаридом, построенным из двух остатков маннопиранозы [7]). При предоблучении Н1

Данные ¹H-ЯМР-спектра О-деацетилированного полисахарида

Звено	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Наблюдаемая мультиплетность *	КССВ, Гц
-3Manpβ	H1	4,82	с	$J_{1,2} < 1$
	H2	4,21	д	$J_{2,3} 3,0$
	H3	3,75	дд	$J_{3,4} 9,7$
	H4	3,67	т	$J_{4,5} 9,5$
	H5	3,41	ддд	$J_{5,6} 2,6$
	H6	3,92	дд	$J_{6,6'} 12,5$
-3Galβ	H6'	3,75	дд	$J_{6,6'} 6,0$
	H1	5,16	с	$J_{1,2} < 1$
	H2, H3	4,28-4,33	м	$J_{2,3} \sim 3$
	H4	4,23	дд	$J_{3,4} \sim 7,5$
	H5	3,95	ддд	$J_{4,5} 3,6$
	H6	3,72	дд	$J_{5,6} 5,0$
H6'	3,65	дд	$J_{5,6'} 6,9$ $J_{6,6'} 11,8$	

* д — дублет, т — триплет, м — мультиплет, с — синглет.

Таблица 2

Расчет удельного оптического вращения полисахарида

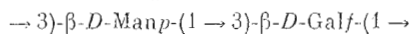
Соединение	$[\alpha]_D$, град	M_r	$[M]_D$, град
Метил-β-D-маннопиранозид [9]	-49	194	-95,1
Метил-β-D-галактофуранозид [10]	-110	194	-213,4
Полисахарид			
рассчитано для			
<i>D</i> -Man, <i>D</i> -Gal	-95,2	324	-308,5
<i>L</i> -Man, <i>L</i> -Gal	+95,2	324	+308,5
<i>L</i> -Man, <i>D</i> -Gal	-36,5	324	-118,3
<i>D</i> -Man, <i>L</i> -Gal	+36,5	324	+118,3
экспериментальная величина	-71,7		

остатка β-маннопиранозы при 4,82 м.д. наблюдался ядерный эффект Оверхаузера на протоне H2 и/или H3 остатка галактозы, резонирующем вблизи 4,3 м.д., однако из-за совпадения сигналов этих протонов сделать выбор между замещением остатка галактозы в положение 2 или 3 было невозможно.

Для решения этого вопроса был проведен анализ методом метилирования, который привел к идентификации 2,4,6-три-О-метилманнозы и 2,5,6-три-О-метилгалактозы. Эти данные показывали, что оба моносахаридных остатка замещены в положение 3 и подтверждали пиранозную форму остатка маннозы и фуранозную форму остатка галактозы.

Абсолютные конфигурации моносахаридов были определены путем расчета удельного оптического вращения полисахарида по правилу Кляйна [8]. Расчет привел к величине, наиболее близкой к экспериментальному значению, в предположении о *D*-конфигурации остатков маннозы и галактозы (табл. 2).

Приведенные данные позволяют определить следующую структуру О-деацетилированного полисахарида:



Эта структура находится в соответствии с результатами расщиповки ¹³C-ЯМР-спектра деацетилированного полисахарида (табл. 3), которая была проведена с использованием селективного гетероядерного двойного резонанса ¹³C{¹H}, а также при сравнении с данными ¹³C-ЯМР-спектра для полисахарида из *Pasteurella haemolytica*, серотип 4, также содержащего остаток β-галактофуранозы, замещенный в положение 3 [11].

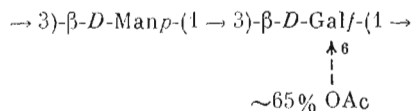
Химические сдвиги в ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида (м. д.)

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Исходный полисахарид *						
-3Man α β	100,8	68,6	78,7	66,3	77,4	62,4
-3Gal β	105,8	81,1	85,4	83,1	68,9	67,0
↑ 6 OAc						
-3Man α β	100,7	68,6	78,7	66,3	77,4	62,4
-3Gal β	105,8	81,1	85,4	83,2	71,7	64,2
O-Деацетилированный полисахарид						
-3Man α β	100,6	68,6	78,7	66,3	77,4	62,4
-3Gal β	105,8	81,0	85,4	83,2	71,6	64,1

* Приведены химические сдвиги для повторяющихся звеньев, содержащих и не содержащих O-ацетильную группу.

Сопоставление ^{13}C -ЯМР-спектров исходного и O-деацетилированного полисахаридов показало, что заметному смещению подвергаются сигналы C5 и C6 остатка галактозы (от 68,9 и 67,0 к 71,6 и 64,1 м.д. соответственно). По направлению и величине эти смещения характерны для β- и α-эффектов ацетилирования по O6 [12], что позволяет локализовать O-ацетильную группу в положении 6 остатка галактозы. Судя по соотношению интенсивностей сигналов, принадлежащих остатку галактозы, несущему и не несущему O-ацетильную группу, ацетилированными являются приблизительно две трети повторяющихся звеньев полисахарида. К такому же выводу приводит сопоставление интенсивностей сигналов O-ацетильной группы (δ 2,13 м.д.) и аномерных протонов (δ 5,19 и 4,83 м.д.) в ^1H -ЯМР-спектре исходного полисахарида.

Таким образом, O-специфический полисахарид *P. seracia*, серотип 6, имеет следующую структуру:



В связи с использованием ^{13}C -ЯМР-спектроскопии для бездеструктивного анализа олиго- и полисахаридов представляет интерес выявление закономерностей в эффектах гликозилирования в дисахаридных фрагментах, содержащих моносахаридные остатки в фуранозной форме, для которых до настоящего времени имелось лишь очень ограниченное количество данных.

Согласно данным работы [13], в 1,3-связанных дисахаридах, построенных из моносахаридных остатков в пиранозной форме, при наличии межзвеньевое пространственное взаимодействие между протоном H1 гликозилирующего моносахарида и экваториальным протоном при одном из β-углеродов гликозилируемого моносахарида (H2 в случае маннозы или H4 в случае галактозы) наблюдаются сильнополюсные смещения сигналов соответствующих углеродных атомов в ^{13}C -ЯМР-спектре. Это приводит к тому, что α-эффект гликозилирования на C1 гликона представляется относительно небольшим (2–5 м.д.), а β-эффект на углеродный атом агликона, несущий экваториальный протон (C2 или C4), — отрицательным и относительно большим по модулю (от –2 до –4,5 м.д.) («аномальные» эффекты гликозилирования). При отсутствии таких протон-протонных взаимодействий α- и β-эффекты гликозилирования составляют 6–8 и от 0 до –2 м.д. соответственно («нормальные» эффекты). Наличие и отсутствие межзвеньевых протон-протонных взаимодействий определяется конформацией вокруг гликозидной связи, которая в свою очередь опреде-

Эффекты гликозирования в 1,3-связанных дисахаридах

Ссылка	Дисахарид	Стереохимические факторы *	Эффекты гликозирования **	
			α-эффект	β-эффект
Дисахариды с «аномальными» эффектами				
3*	$DGalp(\beta 1 \rightarrow 3)DManp$	$\beta, D \rightarrow D, H_{n-1}$	~+3	-3,2
4*	$DGlc p(\beta 1 \rightarrow 3)DManp$	$\beta, D \rightarrow D, H_{n-1}$	+4,6	-3,1
Дисахариды с «нормальными» эффектами				
[11, 14]	$DGalp(\beta 1 \rightarrow 3)DGalp$	$\beta, D \rightarrow D, H_{n+1}$	~+7,5	-0,4
[1]	$DGalp(\beta 1 \rightarrow 3)DFucp$	$\beta, D \rightarrow D, H_{n+1}$	~+8	+0,2
[15]	$DGalp(\beta 1 \rightarrow 3)DGalp$	$\beta, D \rightarrow D, H_{n+1}$	+7,4	-0,2
5*	$DRibf(\beta 1 \rightarrow 3)LRhap$	$\beta, D \rightarrow L, H_{n-1}$	~+7,5	-0,3
[15]	$DGalp(\beta 1 \rightarrow 3)LRhap$	$\beta, D \rightarrow L, H_{n-1}$	+7,8	-0,2

* Факторы до стрелки относятся к гликону, после стрелки — к агликону.

** Приведены α-эффект на C1 гликона и β-эффект на C2 или C4 агликона (в случае *маннози* — галакто-конфигурации соответственно).

3* Данные настоящей работы.

4* Данные будут опубликованы в ближайших номерах журнала «Биоорганическая химия».

5* Данные будут опубликованы в ближайших номерах журнала «J. Biol. Chem.».

ляется стереохимическими особенностями дисахарида (стереохимическими факторами): абсолютной конфигурацией моносахаридных компонентов (D или L), конфигурацией гликозидной связи (α или β) и положением экваториального протона в агликоне (при C2 или C4, обозначим этот фактор H_{n-1} и H_{n+1} соответственно).

Как видно из табл. 4, одни и те же наборы стереохимических факторов определяют «аномальные» и «нормальные» эффекты гликозирования в дисахаридах как с пиранозным, так и фуранозным агликоном. Более того, тот факт, что в дисахаридах с гликозилирующим моносахаридом в фуранозной форме появление «аномальных» эффектов гликозирования также связано с межзвеньевыми протон-протонными взаимодействиями, находит экспериментальное подтверждение на примере полисахарида *P. seracia*, серотип β, исследованного в настоящей работе. Действительно, при предоблучении H1 остатка галактофуранозы в остатке маннопиранозы наряду с ядерным эффектом Оверхаузера на H3 (протоне при Cα) наблюдается сравнимый с ним по величине эффект на H2 (экваториальный протон при Cβ), что указывает на пространственную сближенность этих протонов, вызывающую сильнополянные смещения сигналов соответствующих атомов углерода.

Сделанный вывод позволяет расширить область применения метода определения абсолютной конфигурации моносахаридов в природных углеводах на основе определяемых экспериментально эффектов гликозирования [13], включив в нее дисахариды и дисахаридные фрагменты с фуранозным гликоном. В то же время анализ эффектов гликозирования в дисахаридах с фуранозным агликоном показывает, что они практически не зависят от указанных выше стереохимических факторов, и, следовательно, к таким дисахаридам этот метод определения абсолютных конфигураций неприменим. Полученные новые данные по эффектам гликозирования в фуранозах ([1], [14], настоящая работа) будут использованы также для создания базы данных, которая позволит распространить компьютерный метод анализа ^{13}C -ЯМР-спектров [16] на олиго- и полисахариды, содержащие моносахаридные остатки в фуранозной форме.

Экспериментальная часть

Общие методы, выращивание бактериальной культуры, выделение липополисахарида и полисахарида, гидролиз и анализ методом метилирования см. в сообщении 32 [1].

