

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н. Д. ЗЕЛИНСКОГО  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Науменко Олеся Игоревна

**УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕННЫХ  
КЛАСТЕРОВ БИОСИНТЕЗА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ  
ПОЛИСАХАРИДОВ НОВОГО ВИДА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ  
*ESCHERICHIA ALBERTII*, БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ *ESCHERICHIA  
COLI***

1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.х.н. Перепелов А.В.



Москва 2023

## Оглавление

|  |    |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....  | 4  |
| 1. ВВЕДЕНИЕ .....  | 7  |
| 2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....  | 13 |
| 2.1. Специфические методы избирательного расщепления.....  | 16 |
| 2.1.1. Дезаминирование гексозаминов .....  | 16 |
| 2.1.2. Щелочное $\beta$ -элиминирование .....  | 21 |
| 2.1.3. Перегруппировка Гофмана-Веермана.....   | 25 |
| 2.1.4. Распад по Смитсу.....   | 26 |
| 2.1.5. Расщепление фосфат-содержащих полисахаридов .....   | 31 |
| 2.1.5.1. Дефосфорилирование фтористоводородной кислотой .....  | 31 |
| 2.1.5.2. Гидролитическое расщепление гликозилфосфатов.....   | 33 |
| 2.2. Неспецифические методы избирательного расщепления.....  | 35 |
| 2.2.1. Частичный кислотный гидролиз .....  | 36 |
| 2.2.2. Ацетолиз .....  | 43 |
| 2.2.3. Сольволиз безводными кислотами.....   | 44 |
| 2.2.3.1. Сольволиз фтористоводородной кислотой.....  | 45 |
| 2.2.3.2. Сольволиз трифторметансульфоновой кислотой .....  | 48 |
| 2.2.3.3. Сольволиз трифторуксусной кислотой.....   | 52 |
| 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....   | 60 |
| 3.1. Установление строения О-полисахаридов <i>Escherichia albertii</i> .....                           | 60 |
| 3.1.1. О-полисахарид <i>E. albertii</i> O1.....  | 60 |
| 3.1.2. О-полисахарид <i>E. albertii</i> O2.....  | 64 |
| 3.1.3. О-полисахарид <i>E. albertii</i> O3, близкородственный О-полисахариду <i>E. coli</i> O181 ..... | 68 |
| 3.1.5. О-полисахарид <i>E. albertii</i> O5.....  | 74 |
| 3.1.6. О-полисахарид <i>E. albertii</i> O6, идентичный О-полисахариду <i>E. coli</i> O3 .....          | 81 |
| 3.1.7. О-полисахарид <i>E. albertii</i> O7.....  | 81 |
| 3.1.8. О-полисахарид <i>E. albertii</i> O8.....  | 82 |
| 3.1.9. О-полисахарид <i>E. albertii</i> O9.....  | 85 |
| 3.2. Характеристика генных кластеров О-антигенов <i>Escherichia albertii</i> .....                     | 89 |
| 3.2.1. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O1 .....   | 89 |
| 3.2.2. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O2 .....   | 91 |
| 3.2.3. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O3 .....   | 92 |
| 3.2.4. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O4 .....   | 94 |
| 3.2.5. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O5 .....   | 94 |
| 3.2.6. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O6.....  | 95 |
| 3.2.7. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O7.....  | 96 |
| 3.2.8. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O8.....  | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.2.9. Генный кластер О-антигена <i>E. albertii</i> O9 .....   | 98  |
| 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....  | 100 |
| 4.1. Бактериальные штаммы и выращивание .....  | 100 |
| 4.2. Выделение и деградация липополисахаридов; получение и О-дезацетилирование<br>О-полисахаридов..... | 100 |
| 4.3. О-Деацетилирование .....  | 101 |
| 4.4. Определение состава полисахаридов.....  | 101 |
| 4.5. Избирательное расщепление.....  | 102 |
| 4.5.1. Сольволиз трифторуксусной кислотой.....   | 102 |
| 4.5.2. Сольволиз трифторметансульфоновой кислотой .....  | 103 |
| 4.5.3. Кислотный гидролиз.....   | 103 |
| 4.5.4. Распад по Смиту.....  | 104 |
| 4.6. Масс-спектрометрия .....  | 104 |
| 4.7. Спектроскопия ЯМР .....   | 105 |
| 4.8. Биоинформатический анализ .....   | 106 |
| 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 106 |
| ВЫВОДЫ.....  | 110 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....  | 111 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ.....  | 118 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГЖХ – газо-жидкостная хроматография
- ГКО – генный кластер О-антигена
- ГПХ – гель-проникающая хроматография
- ДПС – О-дезацетилованный полисахарид
- ЛПС – липополисахарид
- м.д. – миллионная доля (химический сдвиг в ЯМР-спектроскопии)
- МС ВР ИЭР – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением
- МПС – модифицированный полисахарид
- ОПС – О-специфический полисахарид, О-полисахарид
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- COSY – корреляционная спектроскопия (COrrelation SpectroscopY)
- CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H – трифторметансульфокислота)
- CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H – трифторуксусная кислота
- dTDP – дезокситимидиндифосфат
- GDP – гуанозиндифосфат
- HMBC – гетероядерная мультисвязевая корреляция (Heteronuclear Multi-Bond Correlation)
- HSQC – гетероядерная одноквантовая когеренция (Heteronuclear Single-Quantum Coherence)
- NaBH<sub>4</sub> – борогидрид натрия
- orf – открытая рамка считывания (open reading frame, последовательность нуклеотидов в составе ДНК, потенциально способная кодировать белок)
- P – фосфатная группа
- ROESY – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)
- TOCSY – полная корреляционная спектроскопия (TOtal Correlation SpectroscopY)
- UDP – уридиндифосфат
- UndPP – ундекапренилдифосфат

## Сокращения моносахаридов и неуглеводных компонентов

### *Гексозы и их производные*

Gal – галактоза

Glc – глюкоза

Man – манноза

2,5anhMan – 2,5-ангидроманноза

2,5anhGal – 2,5-ангидроталога

Fuc – фукоза (6-дезоксигалактоза)

Qui – хиновога (6-дезоксиглюкоза)

Rha – рамнога (6-дезоксиманнога)

6dGal – 6-дезоксигалактога

### *Аминосахара*

GalN – галактозамин (2-амино-2-дезоксигалактога)

GlcN – глюкозамин (2-амино-2-дезоксиглюкога)

ManN – маннозамин (2-амино-2-дезоксиманнога)

FucN – фукозамин (2-амино-2-дезоксифукога)

QuiN – хиновозамин (2-амино-2-дезоксихиновога = 2-амино-2,6-дидезоксиглюкога)

RhaN – рамнозамин (2-амино-2-дезоксирамнога)

Qui4N – 4-амино-4-дезоксихиновога

QuiN4N – 2,4-диамино-2,4-дидезоксихиновога

### *Гексуроновые кислоты*

GalA – галактуроногая кислота

GlcA – глюкоуроногая кислота

GalNA – 2-амино-2-дезоксигалактуроногая кислота

GlcNA – 2-амино-2-дезоксиглюкуроногая кислота

GlcN3NA – 2,3-диамино-2,3-дидезоксиглюкуроногая кислота

ManN3NA – 2,3-диамино-2,3-дидезоксиманнуроногая кислота

### *Нонулозоноые кислоты*

Neu – нейраминогая (5-амино-3,5-дидезокси-D-глицеро-D-галакто-нон-2-улозоногая) кислота

Pse – псевдаминогая (5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксиглицеро-L-манно-нон-2-улозоногая) кислота

*Аминокислоты и полиолы*

Ala – аланин

Gro – глицерин

Thr-ol – треитол

1dEry-ol – 1-дезоксиритритрол

Fuc-ol – фуцитол

Rha-ol – рамнитол

GlcNAc-ol – 2-ацетамидо-2-дезоксиглюцит

*N-Ацильные группы*

Ac – ацетил

Am – ацетимидоил

Fo – формил

3Hb – 3-гидроксибутаноил

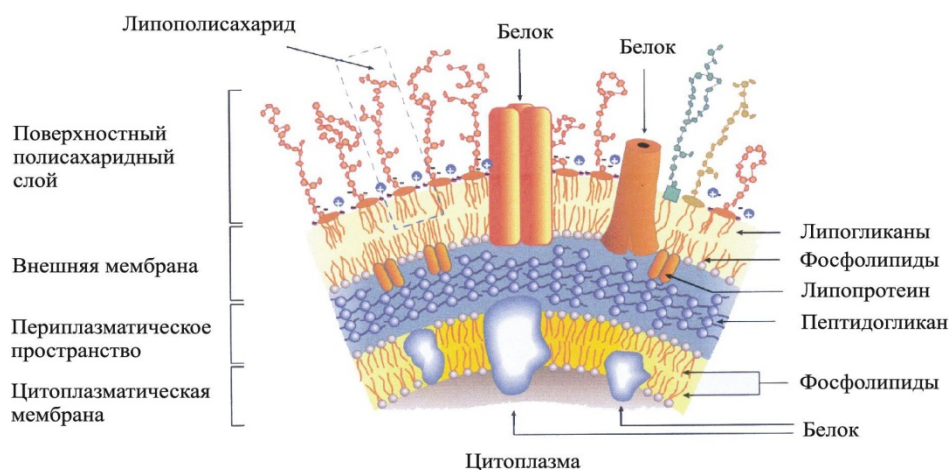
*O-Алкильная группа*

Lac – 1-карбоксиэтил (остаток молочной кислоты)

Фуранозная форма сахаров обозначена буквой *f* (например, Gal*f*); пиранозная форма, соответственно буквой *p* (Gal*p*).

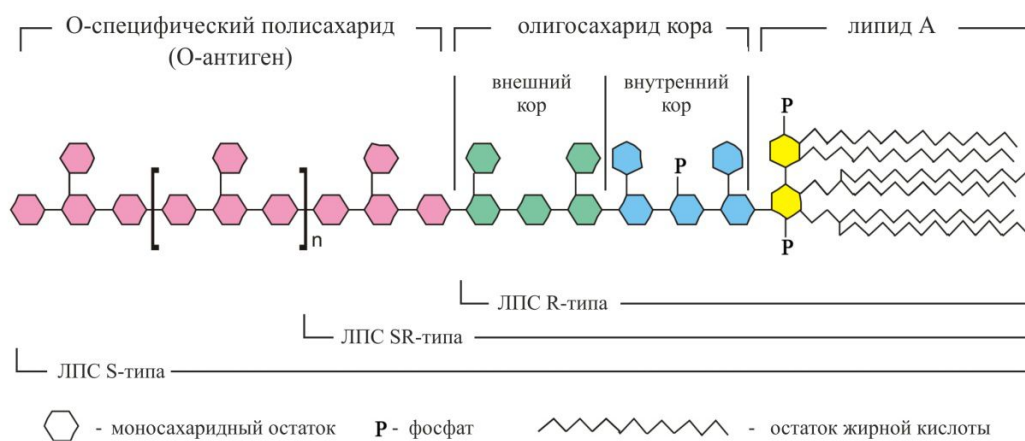
## 1. ВВЕДЕНИЕ

Липополисахарид (ЛПС) является одним из основных компонентов бислойной внешней мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий, образуя ее наружный слой и обеспечивая ее целостность (рис. 1.1). Он играет важную роль в жизни этих микроорганизмов, во многом определяя их взаимодействие с окружающей средой и другими биологическими объектами системами. ЛПС стабилизирует мембрану, придает бактериям устойчивость к антибиотикам, комплементу, антимикробным анионным пептидам и другим защитным системам животных и человека и, таким образом, является одним из факторов патогенности грамотрицательных бактерий.



**Рис. 1.1.** Строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

ЛПС включает в себя три различные по составу и функциональному назначению области: О-специфический полисахарид (ОПС, О-антиген), на который и направлен иммунный ответ макроорганизма, олигосахарид кора (от англ. core – сердцевина) – олигосахарид, расположенный между ОПС и липидом А. Липид А, как гидрофильный компонент, служит для закоривания ЛПС в бислойной клеточной мембране (рис. 1.2).



**Рис. 1.2.** Схематическое представление структуры ЛПС грамотрицательных бактерий.

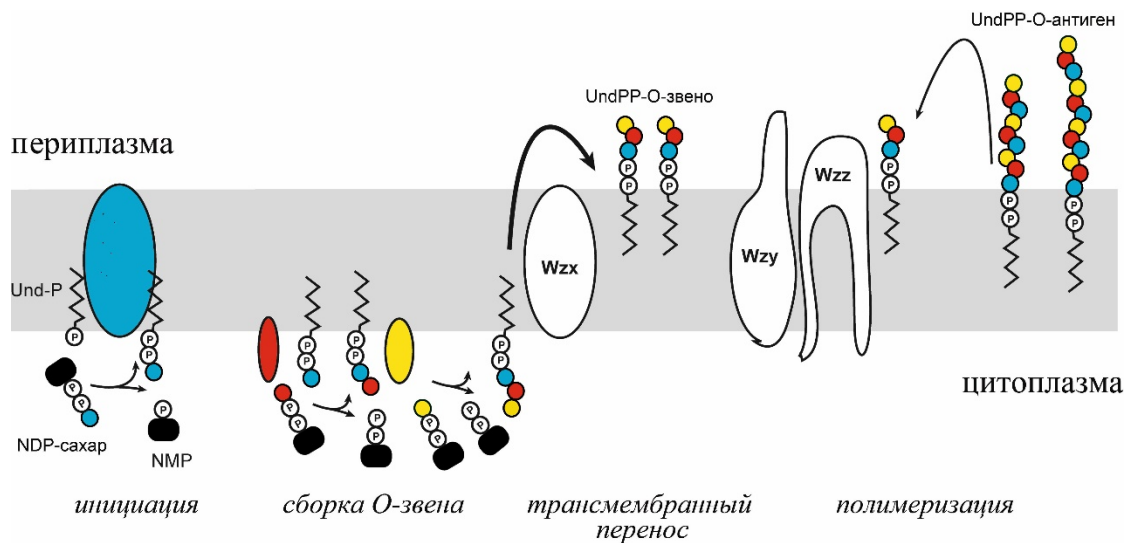
В биологическом (иммунологическом) контексте ОПС часто называют О-антигеном, так как он определяет иммуноспецифичность бактерий. Это означает, что каждый серологически отличимый штамм бактерий (О-серотип) продуцирует ОПС со своей уникальной химической структурой и, как результат, вызывает строго специфичный иммунный ответ. На основе О-антигенов разработаны серологические классификации многих важных в медицинском отношении бактерий, и серотипирование традиционно является золотым стандартом идентификации штаммов.

В состав ОПС могут входить как распространенные в природе моносахариды (глюкоза, галактоза, манноза, N-ацетилгексозамины, гексуроновые кислоты и другие), так и уникальные сахара, не найденные в каких-либо других природных источниках, например, производные 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинулозоновых кислот с различной конфигурацией. Часто встречаются также неуглеводные замесители, присоединенные к моносахаридам по гидроксильным группам, к аминогруппам аminosахаров или карбоксильным группам гексуроновых кислот [1].

Структурное разнообразие ОПС обусловлено в основном полиморфизмом генного кластера О-антигена (ГКО), расположенного в хромосоме. У большинства бактерий, включая объекты настоящего исследования *Escherichia albertii*, биосинтез ОПС осуществляется по О-антиген-полимераза-зависимому пути, называемому также Wzx/Wzy-зависимым путем (рис. 1.3) [2, 3]. По этому пути мономер ОПС – О-звено собирается на липидном носителе (ундекапренил-дифосфате, UndPP) на



цитоплазматической стороне внутренней мембраны путем переноса гликозилтрансферазами моносахаридных компонентов О-звена из соответствующих нуклеотидных предшественников на растущую олигосахаридную цепь. После переноса через мембрану с помощью флиппазы Wzx О-звено полимеризуется на периплазматической стороне внутренней мембраны при участии О-антиген-полимеразы Wzy и регулятора длины цепи О-антигена Wzz.



**Рис. 1.3.** Схематическое представление биосинтеза О-антигена по Wzx/Wzy-зависимому пути.

У эшерихий и ряда других энтеробактерий, синтезирующих О-антиген по Wzx/Wzy-зависимому пути, ГКО фланкируется консервативными генами *galF* и *gnd*. Он включает гены для синтеза специфических компонентов ОПС, гены гликозилтрансфераз и гены процессинга: флиппазы *wzx* и О-антиген-полимеразы *wzy*. Ген регулятора *wzz* располагается вне ГКО рядом с геном *gnd*. Энтеробактерии, у которых первым моносахаридом О-звена является D-GalNAc (например, *E. albertii* O5 и O7), имеют 4-эпимеразу *Gnu*, превращающую UndPP-D-GlcNAc в UndPP-D-GalNAc [4]. Кодированный ее ген *gnu* находится вне ГКО рядом с геном *galF*.

Дополнительные гены, расположенные за пределами ГКО, обеспечивают постполимеризационные модификации ОПС: гликозилирование, О-метилование, О-ацетилование, фосфорилирование. Также вне ГКО находится ген *wesA*, отвечающий за присоединение к липидному носителю UndP фосфата первого

моносахарида О-звена (чаще всего им является D-GlcNAc), и гены, необходимые для синтеза нуклеотидных предшественников так называемых общих моносахаридов (D-Glc, D-Gal, D-GlcNAc), используемых бактериями для синтеза других углеводов, но часто входящих также в ОПС.

*Escherichia albertii* – недавно идентифицированный вид энтеробактерий, близкородственных кишечной палочке (*Escherichia coli*). Он является возбудителем спорадических и эпидемических кишечных инфекций у людей и птиц [5-9]. Впервые клинический изолят *E. albertii* был выделен от ребенка с диареей в Бангладеш и ошибочно идентифицирован как *Hafnia alvei*, но в 2003 году эта ошибка была исправлена [6]. Однако и после этого штаммы *E. albertii* часто продолжали и продолжают ошибочно идентифицировать как *E. coli*, *H. alvei* и другие бактерии в связи с отсутствием описания их конкретных биохимических характеристик. Вследствие этого распространенность штаммов *E. albertii* может быть недооценена из-за отсутствия эффективных методов дискриминации этих бактерий от других членов семейства Enterobacteriaceae.

До последнего времени О-антигены *E. albertii* оставались неизученными, и классификация этих бактерий на их основе не была разработана. В 2017 г. геномы 52 штаммов *E. albertii*, выделенных из пищевых источников, были секвенированы и на основании различий в ГКО разделены на семь молекулярных типов (EA1-EA7), потенциально отвечающих семи серотипам (O1-O7) [5]. Позднее были добавлены еще два молекулярных типа и соответственно два серотипа O8 и O9.

Целью данной работы было определение строения ОПС всех девяти типов *E. albertii*. Большинство из этих ОПС имели уникальные структуры, впервые установленные в настоящей работе. С использованием полученных данных о строении ОПС методами биоинформатики проведен функциональный анализ генов биосинтеза О-антигенов изученных бактерий.

Результаты настоящего исследования имеют практическое значение. Установленные структуры ОПС являются химической основой для классификации штаммов *E. albertii* по О-антигенам, необходимой для серодиагностики, эпидемиологического мониторинга, выявления источников инфекции и патогенных клеточных

линий. Генетические данные могут быть использованы в области геномики при изучении эволюционной диверсификации штаммов, для разработки эффективных методов молекулярного типирования природных и клинических изолятов этих бактерий, а также создания новых вакцин для терапии вызываемых инфекционных заболеваний.

Представленная диссертационная работа состоит из следующих разделов: Введение, Литературный обзор, Результаты, Экспериментальная часть и Выводы, а также включает Список сокращений, Список литературы и Приложение (табулированные данные спектров ЯМР и масс-спектров). Литературный обзор посвящен рассмотрению методов избирательного расщепления гликозидных связей, используемых в структурных исследованиях полисахаридов. В главе Результаты приведены данные по установлению строения ОПС бактерий *E. albertii* и характеристики генов их биосинтеза с учетом установленных структур. В Экспериментальной части описаны методики выделения полисахаридов, их химического анализа, проведения ЯМР-спектроскопических и масс-спектрометрических экспериментов.

Работа является частью проводимого в лаборатории химии углеводов ИОХ РАН систематического исследования строения и биосинтеза бактериальных полисахаридов. Она выполнена в сотрудничестве с микробиологами из Китайского центра контроля и предотвращения болезней (Пекин, КНР). Работа была поддержана грантом РФФИ № 14-14-01042. Результаты работы опубликованы в 11 статьях в рецензируемых журналах [10-20], включая два обзора [19, 20], и были представлены автором в виде устных и стендовых докладов на пяти российских и международных научных конференциях [21-25].

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю к.х.н. А.В. Перепелову и к.х.н. С.Н. Сенченковой за обучение химическим методам анализа углеводов и помощь при интерпретации результатов и научному консультанту д.х.н. профессору Ю.А. Книрелю за определение общего направления исследования и помощь при подготовке статей для печати. Автор искренне признателен д.х.н. профессору А.С. Шашкову за съемку и помощь в интерпретации спектров ЯМР, А.О.

Чижову за съемку масс-спектров и коллективу лаборатории химии углеводов ИОХ  
РАН за ценные советы и товарищескую поддержку.

## 2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### Химические методы избирательного расщепления гликозидных связей в структурном анализе бактериальных полисахаридов

Поверхностные полисахариды присутствуют практически у всех бактерий. Это О-полисахариды (ОПС) грамотрицательных бактерий, представляющие собой полисахаридные цепи липополисахаридов, полисахариды клеточной стенки грамположительных бактерий (такие как тейхоевые и тейхулозоновые кислоты) и капсульные полисахариды (КПС) бактерий обеих групп. Они несут специфические функции, связанные с взаимодействием с другими биологическими системами, такими как иммунная система организма-хозяина и бактериофаги. Так, они являются антигенами, тонкое химическое строение которых определяет серологическую специфичность бактериальных штаммов и лежит в основе их классификации, необходимой для диагностики инфекционных заболеваний и эпидемиологического мониторинга. На основе специфических полисахаридов создаются вакцины и диагностические препараты.

Поверхностные полисахариды являются одним из наиболее структурно вариабельных классов химических соединений бактериальной клетки. Они состоят из разнообразных моносахаридов, соединенных друг с другом в различной последовательности  $\alpha$ - или  $\beta$ -гликозидными связями и замещенных в различные положения. Чаще всего моносахаридные компоненты находятся в пиранозной форме, но некоторые из них иногда (например, галактоза) или всегда (рибоза) присутствуют в виде фуранозидов. Многие полисахариды включают также неуглеводные компоненты (спирты, аминокислоты, кето-, гидроксид- и фосфатные или сульфатные группы).

Большинство полисахаридов представляют собой регулярные гетерополимеры, построенные из повторяющихся линейных или разветвленных олигосахаридов, включающих от двух до восьми моносахаридных остатков. Это является следствием особенности их биосинтеза, протекающего путем сборки и последующей

полимеризации олигосахаридного звена [2, 3, 26, 27]. Постполимеризационные модификации, такие как глюкозилирование, О-ацетилирование, О-метилирование, фосфорилирование, часто бывают нестехиометрическими и вносят в полисахариды так называемую «скрытую нерегулярность». Реже встречаются гомополимеры, состоящие из моносахаридов одного типа. Их биосинтез осуществляется путем последовательного переноса одного моносахарида за другим на растущую полисахаридную цепь [28]. Распределение длин цепей ОПС в каждом штамме является модальным (то есть неслучайным, генетически детерминированным) и специфично для данного штамма.

Изучение строения полисахаридов бактерий, механизмов их биосинтеза и специфических физико-химических и иммунохимических свойств способствует более глубокому пониманию механизмов патогенеза инфекционных заболеваний, вызывая постоянный интерес исследователей – химиков, биохимиков, биофизиков, генетиков, иммунологов и вакцинологов. Знание структуры полисахаридов необходимо для выявления иммунодетерминантных участков антигенов, характеристики специфических антител, разработки новых вакцин и средств диагностики бактериальных инфекций.

В связи с этим большое значение имеет наличие в арсенале исследователя набора адекватных методов структурного анализа полисахаридов. Из современных подходов, используемых с этой целью, наиболее эффективным является одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР [29]. Она позволяет бездеструктивным путем идентифицировать моносахаридные компоненты, определять конфигурации гликозидных связей, положения замещения и последовательность моносахаридных остатков в повторяющемся звене, а также идентифицировать и устанавливать места присоединения неуглеводных заместителей. В то же время этот метод имеет ограничение, связанное с недостаточной разрешенностью спектров ЯМР, чаще всего из-за уширения сигналов вследствие высокой вязкости растворов полисахаридов. Трудности могут возникать также из-за совпадения сигналов, что особенно чувствительно при анализе нерегулярных полимеров, дающих в спектрах ЯМР сигналы различной интенсивности. В связи с этим, а часто также для независимого

подтверждения структуры продолжают использоваться спектрах ЯМР сигналы различной интенсивности. В связи с этим, а часто также для независимого подтверждения структуры продолжают использоваться химические методы анализа, такие как полный кислотный гидролиз для установления состава полисахарида, метилирование для определения положений замещения моносахаридов и избирательное расщепление для получения олигосахаридных фрагментов, построению которых может быть реконструирована точная химическая структура исходного полисахарида.

Преимуществом олигосахаридов является возможность их выделения и очистки с помощью хроматографических методов. Это особенно важно при исследовании нерегулярных полисахаридов с различными олигосахаридными звеньями, так как данный подход позволяет разделять и идентифицировать олигосахариды, полученные из структурно различающихся звеньев. Кроме того, как правило, олигосахариды дают более разрешенные спектры ЯМР, чем исходный полимер, и, кроме того, могут быть исследованы с помощью масс-спектрометрии. Олигосахаридные фрагменты бактериальных полисахаридов полезны при иммунохимических исследованиях и используются как компоненты диагностических средств и экспериментальных вакцин. Избирательное расщепление часто используется также для модификации полисахаридов, обычно с целью превращения нерегулярных полимеров в регулярные.

Химические методы селективного расщепления гетерополисахаридов можно разделить на специфические и неспецифические. Возможность применения первых обусловлена наличием в полисахариде одного или нескольких моносахаридов определенной природы, например, гексозамина для дезаминирования, гексуроновой кислоты для  $\beta$ -элиминирования или моносахарида со свободной вицинальной диольной группировкой для периодатного окисления. При расщеплении рвутся гликозидные связи только этих моносахаридов, тогда как другие связи остаются незатронутыми. К специфическим можно отнести также методы расщепления фосфат-содержащих полисахаридов по фосфатной группе.

Неспецифические методы – это частичный гидролиз разбавленными кислотами, ацетолиз и сольволиз действием безводных органических или неорганических

кислот. Они основаны на различиях в скорости расщепления (то есть в устойчивости) гликозидных связей различных моносахаридных компонентов полисахаридов.

При применении специфических методов происходит деструкция моносахарида, по которому происходит расщепление, тогда как неспецифические методы не вызывают разрушения сахаров, а варьирование условий реакции позволяет получать в зависимости от задачи большие или меньшие олигосахаридные фрагменты. В настоящем обзоре рассмотрены различные химические методы избирательного расщепления обоих типов.

В 1970-1980-х был опубликован ряд общих обзоров, посвященных химическим методам избирательного расщепления гликозидных связей (например, [30, 31]), а позднее также обзоры по применению отдельных методов – сольволиза безводными фтористоводородной и триформетансульфоновой кислотами [32, 33].

В представленный обзор для полноты изложения включен ряд наиболее характерных примеров, приведенных в ранее опубликованных обзорах, и добавлены новые данные, появившиеся в последние годы, такие как, например, использование трифторуксусной кислоты как нового сольволитического реагента. Ферментативные методы избирательного расщепления полисахаридов, которые также неоднократно освещались в литературе (например, [34, 35]), в настоящем обзоре не рассматриваются.

## **2.1. Специфические методы избирательного расщепления**

### **2.1.1. Дезаминирование гексозаминов**

Гексозамины являются широко распространенными компонентами бактериальных полисахаридов; из них наиболее часто встречаются 2-амино-2-дезоксигексопиранозы (гексозамины) с *глюко-* и *галакто-*конфигурацией (глюкозамин и галактозамин). Один из методов избирательного расщепления таких полисахаридов основан на дезаминировании гексозаминов действием  $\text{HNO}_2$ , которое сопровождается стереоспецифической катионной перегруппировкой типа Демьянова с сужением пиранозного цикла, обращением конфигурации при С-2 и образованием 2,5-ангидроманнозы (из GlcN, как показано на рис. 2.1) или 2,5-ангидроталозы (из



GalN). Аналогично ведут себя 6-дезоксипроизводные глюкозамина и галактозамина (хиновозамин и фукозамин), также являющиеся компонентами многих бактериальных полисахаридов.

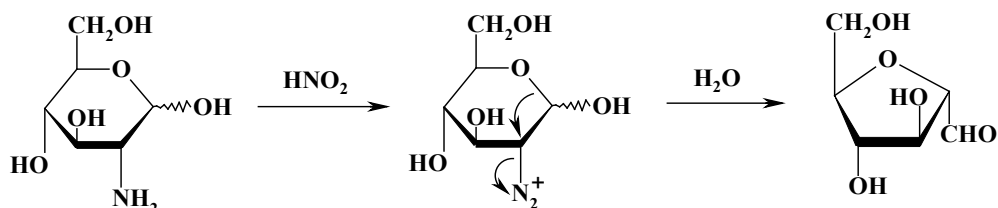


Рис. 2.1. Дезаминирование глюкозамина азотистой кислотой.

При дезаминировании гликозидов глюкозамина и галактозамина образуются полуацетали соответствующих 2,5-ангидрогексозидов, которые в условиях дезаминирования легко превращаются в свободные сахара с разрывом гликозидной связи (рис. 2.2). Другим продуктом этой реакции являются 2-С-формилпентофуранозиды, образующиеся в результате сужения пиранозного цикла по альтернативному пути. Эта реакция протекает без расщепления гликозидной связи, но сопровождается элиминированием заместителя при С-3, если таковой имеется [36].

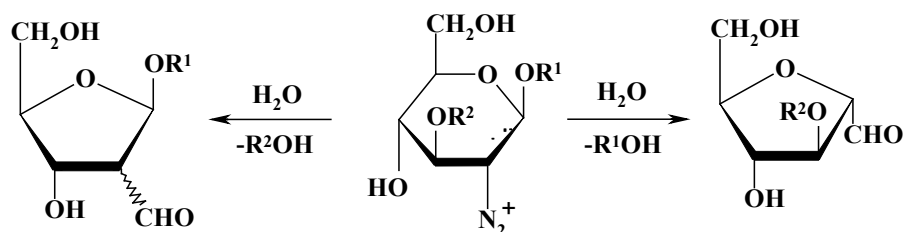


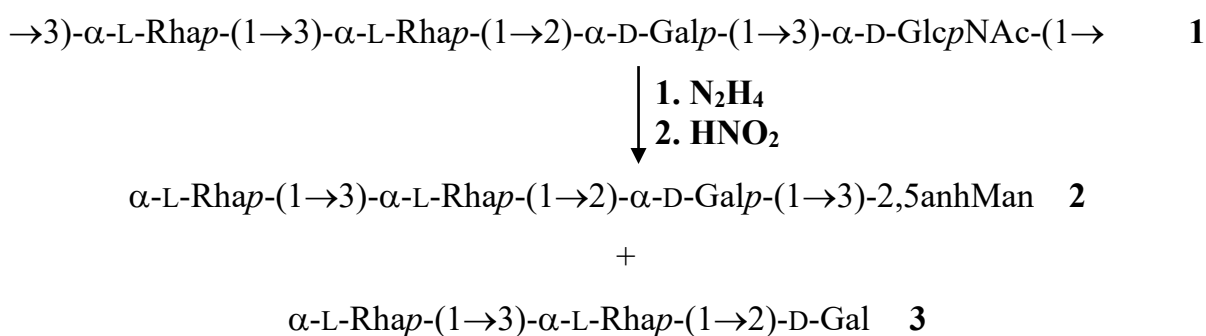
Рис. 2.2. Дезаминирование гликозида глюкозамина.

Дезаминирование маннозамина, у которого аминогруппа находится в аксиальном положении, протекает более сложно, его направление зависит от условий реакции [36], и для избирательного расщепления гликозидных связей оно не используется.

В подавляющем большинстве бактериальных полисахаридов остатки гексозаминов находятся в N-ацилированной (обычно N-ацетиловой) форме, и

получение полисахаридов со свободными аминогруппами является самостоятельной проблемой. Кислотный гидролиз для этой цели неприменим, так как N-дезацелирование требует достаточно жестких условий, в которых протекает одновременное расщепление гликозидных связей. Методами, пригодными для этой цели, являются гидразинолиз и щелочной гидролиз.

Было предложено проводить N-дезацелирование безводным гидразином в присутствии сульфата гидразина при 105 °C в течении 10 часов [37]. В этих условиях N-дезацелирование как модельных гликозидов, так и бактериальных полисахаридов проходило практически количественно и не сопровождалось заметной деструкцией сахаров. Например, ОПС *Shigella dysenteriae* типа 1 (**1**) был успешно N-дезацелирован этим методом, и после последующего дезаминирования был получен в качестве основного продукта тетрасахарид (**2**) с 2,5-ангидроманнозой (2,5anhMan) на восстанавливающем конце, являющийся модифицированным тетрасахаридным повторяющимся звеном полисахарида [37]. Одновременно с ним образовалось ~20% трисахарида (**3**), являющегося продуктом дезаминирования по альтернативному пути через образование 2-C-формилпентозы. Разделение и структурное исследование этих продуктов проводилось после боргидридного восстановления в соответствующие олигозилполиолы, необходимость которого вызвана лабильностью 2,5-ангидроманнозы.

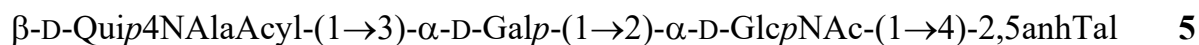
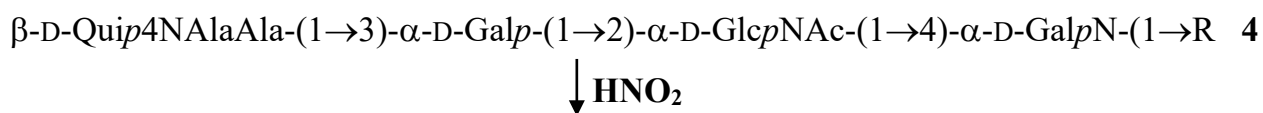


Однако последующие исследования показали, что этот метод не является универсальным. Так, при гидразинолизе КПС бактерии *Haemophilus influenzae* (100 °C, 8 часов) N-ацетильные группы удалялись только с остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилманнозаминуровой кислоты, замещенных в

положение 4, тогда как остатки этих же моносахаридов, замещенные в положение 3, N-деацетилированию практически не поддавались [38]. Это показывает, что положение замещения является одним из факторов, оказывающих влияние на этот процесс.

Другой предложенный метод N-деацетилирования состоит в обработке полисахаридов NaOH в водном диметилсульфоксиде в присутствии восстановителя – тиофенолята натрия, необходимого для предотвращения окисления кислородом воздуха (80-125 °С, 2-15 часов) [39]. Этим способом удалось количественно N-деацетилировать остатки N-ацетилгексозаминов в полисахаридах бактерий *E. coli* и *Shigella flexneri*, N-ацильные группы которых лишь частично удалялись при гидразинолизе. При этом отмечалась неодинаковая устойчивость ацетамидных связей в различных полисахаридах, что заставляло подбирать условия реакции в каждом конкретном случае.

Следует отметить, что метод дезаминирования широко использовался для избирательного расщепления гексозаминогликанов в 1970-е–начале 1980-х годов. Впоследствии он практически не применялся к полисахаридам из-за трудности достичь полного N-деацетилирования в достаточно мягких условиях, позволяющих избежать неспецифической деструкции полимера. В то же время дезаминирование сохраняет свое значение для установления строения углеводов, содержащих остатки гексозаминов со свободной аминогруппой. В частности, такая особенность характерна для ЛПС бактерий рода *Proteus* со сложной олигосахаридной цепью (кором), имеющей вариабельную внешнюю область, которая заканчивается остатком GlcN или GalN [40]. Эта область была отщеплена от консервативной по структуре внутренней области ЛПС *Proteus mirabilis* Об (4), присоединенной к липидной части ЛПС (липиду А), с образованием тетрасахарида (5) с остатком 2,5-ангидроталозы (из GalN) на восстанавливаемом конце [41]. При этом дезаминирование терминального остатка аланина в дипептидном заместителе при аминогруппе 4-амино-4-дезоксихиновозы (Qui4N) привело к превращению аланина в О-нитрозомолочную кислоту (AsuI) вместо ожидаемой молочной кислоты.



R – внутренняя область кора, присоединенная к липиду A; Acyl = CH<sub>3</sub>CH(ONO)C(O)

Присутствие в коре ЛПС остатка 2-аминосахара со свободной аминогруппой использовалось также как мягкий способ расщепления ЛПС для получения интактной полисахаридной части. Например, дезаминирование ЛПС *P. mirabilis* O48, в кор которого входит остаток GalN, позволило выделить свободный от липида ОПС, присоединенный к модифицированной внешней области кора [42].

Уникальную возможность избирательного расщепления предоставляет присутствие в ряде бактериальных полисахаридов остатка 2,4-диамино-2,4-дидезоксифукозы (FucN4N) в 2-N-ацетилированной форме со свободной аминогруппой в положении 4. Так, дезаминирование ОПС *Fusobacterium nucleatum* ATCC 23726 (6) привело к превращению FucNAc4N в 2-ацетамидо-2,4,6-тридезоксигекс-5-улозу с разрывом гликозидной связи и образованию в качестве основного продукта реакции трисахарида 7, который при восстановлении NaBD<sub>4</sub> превращался в олигосахарид 8 (рис. 2.3) [43].

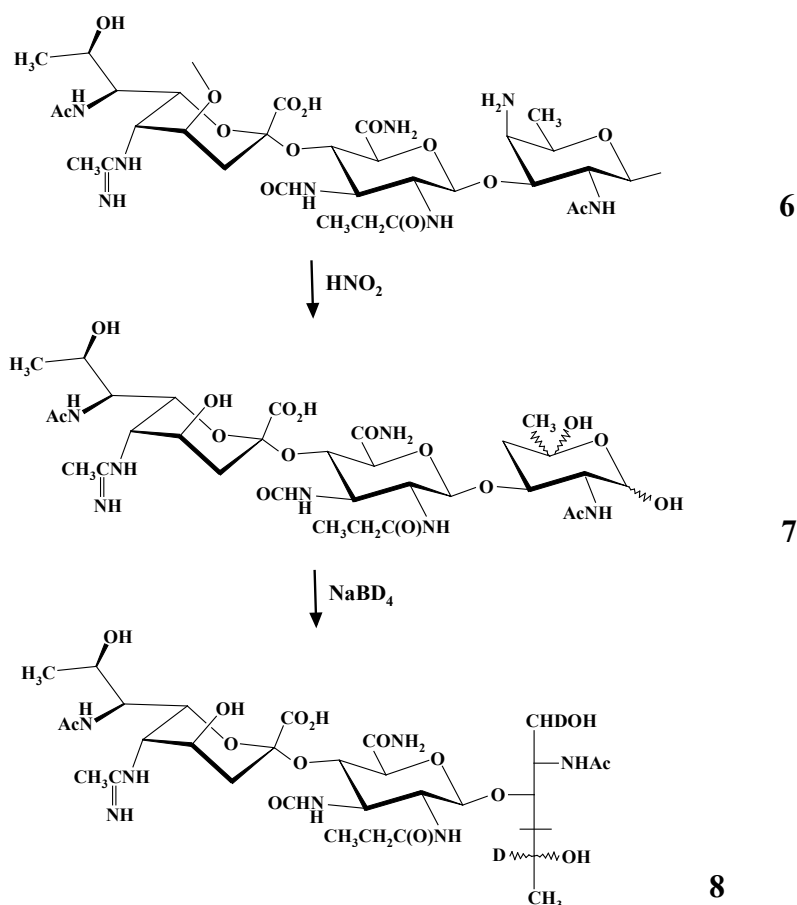
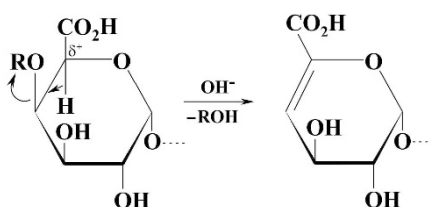


Рис. 2.3. Расщепление дезаминированием ОПС *Fusobacterium nucleatum* ATCC 23726.

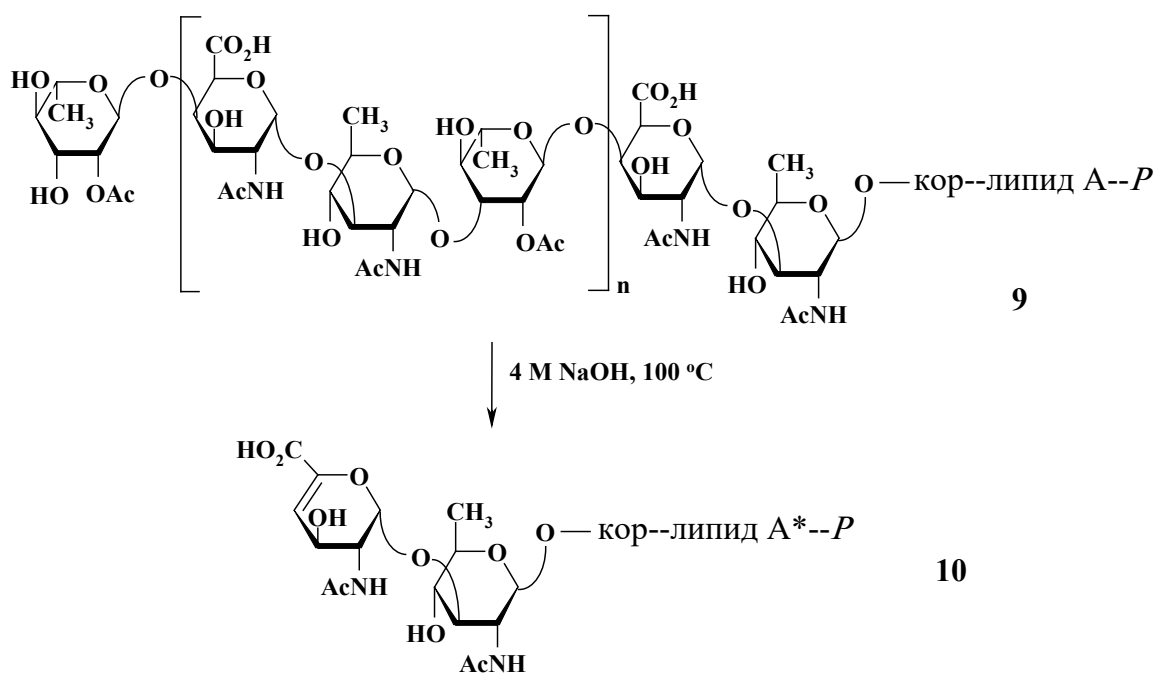
### 2.1.2. Щелочное $\beta$ -элиминирование

$\beta$ -Элиминирование в щелочных условиях является характерной реакцией гексуриновых кислот и может быть использовано для избирательного расщепления полисахаридов. Необходимым условием для расщепления по этому механизму является присутствие заместителя (обычно гликозильной группы) в положении 4. Этой реакции, протекающей по механизму бимолекулярного  $\beta$ -элиминирования E2, способствует отрицательный индуктивный эффект карбоксильной группы, создающий частичный положительный заряд при C-5 и тем самым увеличивающий подвижность протона H-5. Продуктом реакции является ненасыщенная гексуриновая кислота с двойной связью в положении 4 (рис. 2.4).



**Рис. 2.4.** Реакция  $\beta$ -элиминирования в остатке галактурановой кислоты.

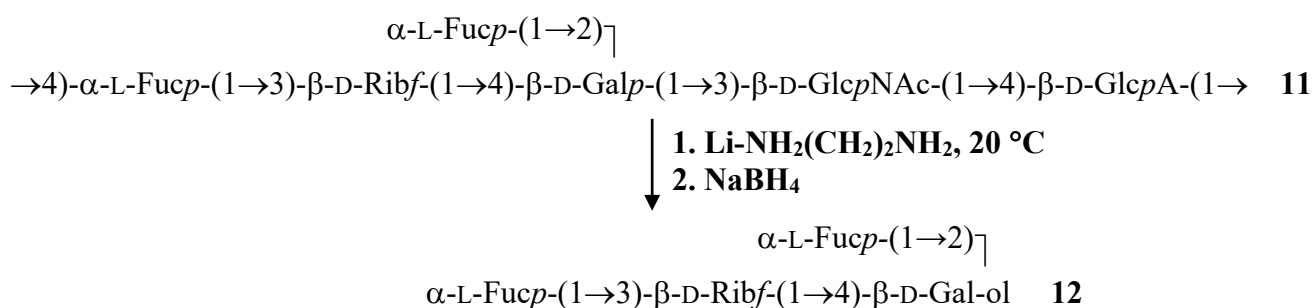
В жестких условиях, необходимых для  $\beta$ -элиминирования в гексуроновой кислоте со свободной карбоксильной группой, в водной среде (4 М NaOH или KOH, 100-120 °C) наблюдается деструкция образующегося олигосахарида со свободным восстанавливающим концом. Однако  $\beta$ -элиминирование может быть применено при установлении строения ЛПС, восстанавливающий конец которого защищен устойчивой в щелочных условиях гликозилфосфатной группой. Так, действие 4 М NaOH при 100 °C на ЛПС *P. aeruginosa* O10a,10b (**9**) за 16 часов привело к олигосахариду **10** (рис. 2.5) [44], исследование которого позволило установить структуру кора и углеводной основы липида А, а также место присоединения ОПС к кору.



*P* – фосфатная группа, липид А\* – дезацелированный липид А

**Рис. 2.5.** Расщепление ЛПС *P. aeruginosa* O10a,10b  $\beta$ -элиминированием

Олигосахаридные фрагменты могут быть получены при действии на полисахариды, содержащие гексуроновые кислоты, безводных оснований. Так, из ОПС бактерии *Salmonella arizonae* O45 (**11**) действием лития в безводном этилендиамина (20 °С, 1 ч) с последующим боргидридным восстановлением был получен разветвленный тетрасахарид (**12**) [45]. Он являлся результатом двух последовательных реакций β-элиминирования – сначала заместителя в положении 4 остатка GlcA и затем заместителя в положении 3 остатка GlcNAc на восстанавливаемом конце образовавшегося олигосахарида. Остаток ненасыщенной глюкуроновой кислоты в условиях реакции разрушался и удалялся при обработке реакционной смеси.



Отсутствие отрицательного заряда на карбоксильной группе гексуроновой кислоты существенно облегчает атаку нуклеофила на центр СН-5, и поэтому амиды и эфиры гексуроновых кислот намного легче подвергаются β-элиминированию, чем свободные кислоты. Эта реакция с одновременным боргидридным восстановлением олигосахаридных продуктов (0,1 М NaOH, 0,5 М NaBH<sub>4</sub>, 37 °С, 24 часа) применялась при установлении строения ОПС бактерии *P. aeruginosa* IID 1008 (**13**), содержащего амид *N*-ацетилгалактозаминуроновой кислоты (GalNAcA) и примерно одинаковое количество свободной *N*-формилгалактозаминуроновой кислоты (GalNFoA) и ее амида (рис. 2.6) [46]. В этих условиях β-элиминированию подвергались только амиды гексуроновых кислот и, как следствие нестехиометрического амидирования GalNFoA, образовались тетрасахарид **14** и трисахарид **15** (одновременно происходило щелочное *N*-деформилирование GalNFoA). В результате была выяснена последовательность различных *N*-ацильных производных гексозаминуроновых кислот в ОПС.

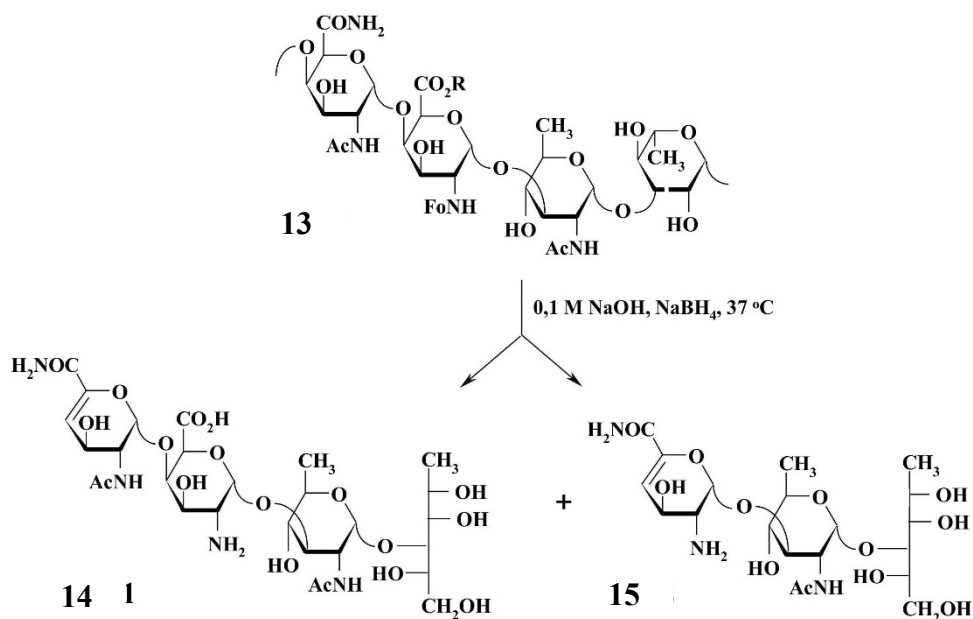


Рис. 2.6. Избирательное расщепление ОПС *P. aeruginosa* IID 1008 β-элиминированием.

Аналогично расщепляются полимеры, включающие амиды гексуроновых кислот с аминокислотами, также встречающиеся в бактериальных полисахаридах. Например, КПС *Acinetobacter baumannii* G7 (16), содержащий амид GalNAcA с D-аланином, деполимеризовался в щелочных условиях по механизму β-элиминирования, давая трисахарид 17, соответствующий повторяющемуся звену КПС (рис. 2.7) [47]:

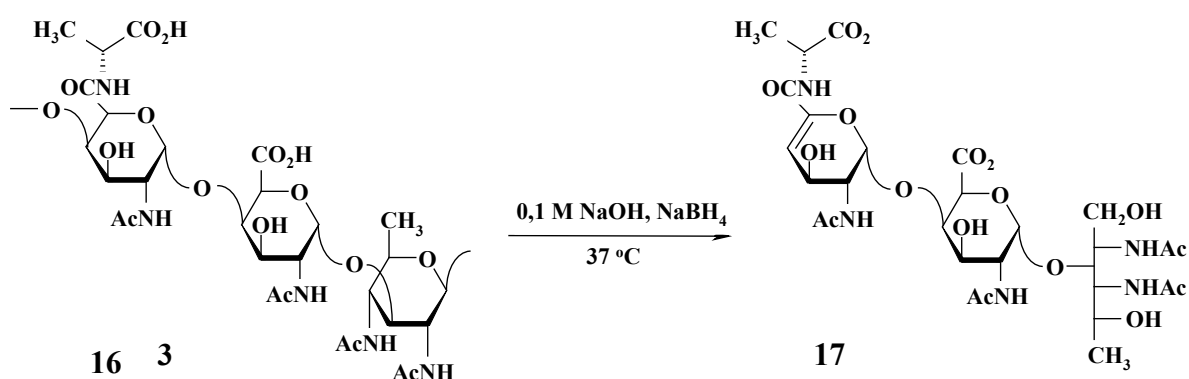


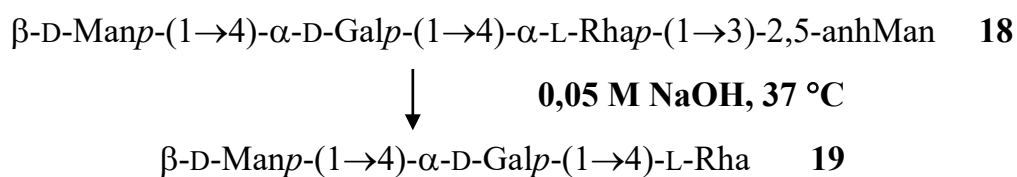
Рис. 2.7. Избирательное расщепление КПС *A. baumannii* G7 β-элиминированием.

Расщепление сполна метилированного КПС бактерии *Klebsiella* типа 81 по остаткам метилового эфира глюкуроновой кислоты под действием диметилсульфинил-



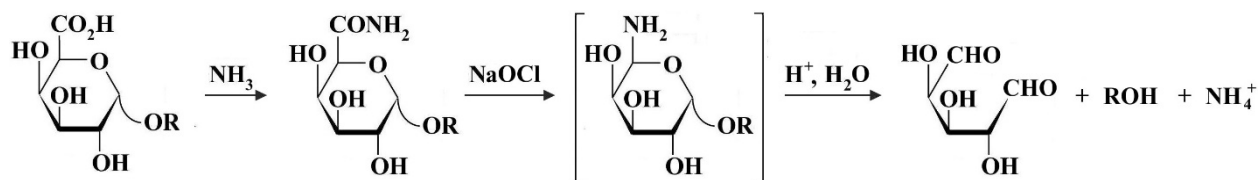
аниона с последующим боргидридным восстановлением, кислотным гидролизом и анализом частично метилированных моносахаридов с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии позволило получить существенную информацию о структуре полимера [48]. Однако установление строения производных олигосахаридов, образующихся при расщеплении метилированных полисахаридов, является более сложной задачей по сравнению со свободными олигосахаридами, и в структурном анализе этот подход практически не используется.

$\beta$ -Элиминирование в щелочных условиях легко протекает и в 3-амещенных 2,5-ангидрогексозах, что также используется в структурных исследованиях. Так, мягкая щелочная обработка основного продукта дезаминирования полисахарида *E. coli* O75 (**18**) привела с высоким выходом к олигосахариду (**19**) [49], который идентичен побочному продукту дезаминирования через образование 2-С-формилпентозы (см. секцию 2.1.1).

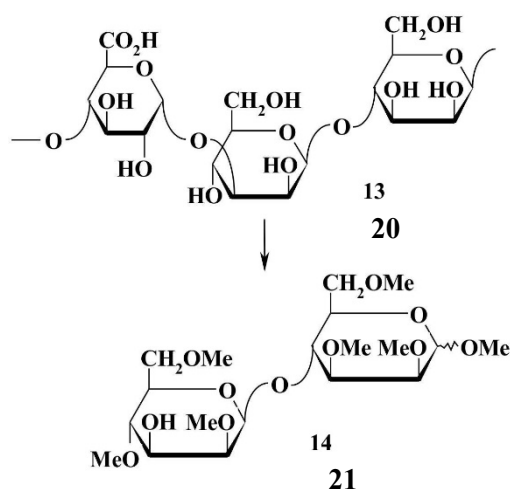


### 2.1.3. Перегруппировка Гофмана-Веермана

Этот метод избирательного расщепления гликуронозидных связей основан на превращении амидов гексурановых кислот действием гипохлорита натрия по реакции Гофмана (0.5 М NaOCl, рН 13.5, 0 °С) в 5-аминопентопиранозы, которые расщепляются в мягких кислотных условиях (рН 5) с высвобождением агликона [50]. Реакция протекает с высоким выходом и не сопровождается побочными процессами, она не зависит от присутствия или отсутствия и положения заместителя в гексурановой кислоте. Конфигурации при С-2, С-3 и С-4 гексурановых кислот при расщеплении сохраняются и могут быть установлены путем анализа продуктов реакции, например, методом ГЖХ-масс-спектрометрии после боргидридного восстановления.



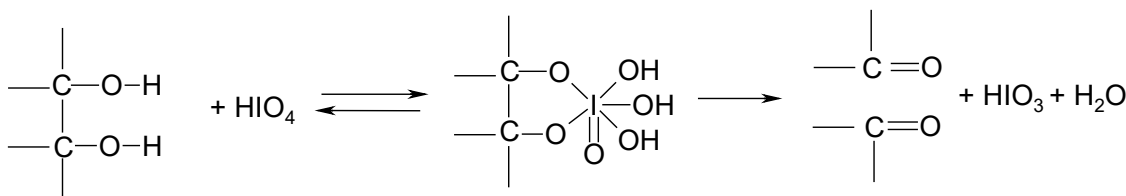
Вариантом этого метода является расщепление перметилованных полисахаридов после превращения метиловых эфиров гексуриновых кислот в амиды. Он был продемонстрирован на внеклеточном полисахариде дрожжей *Lipomyces lipofer* st. 133 (**20**), который при расщеплении по этому способу дал частично метилированный дисахарид **21** (рис. 2.8) [51].



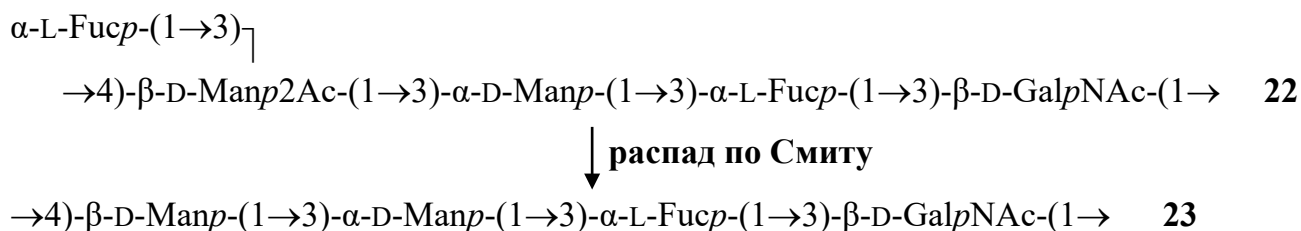
**Рис. 2.8.** Расщепление внеклеточного полисахарида *Lipomyces lipofer* st. 133 по реакции Гофмана-Веермана.

#### 2.1.4. Распад по Смитту

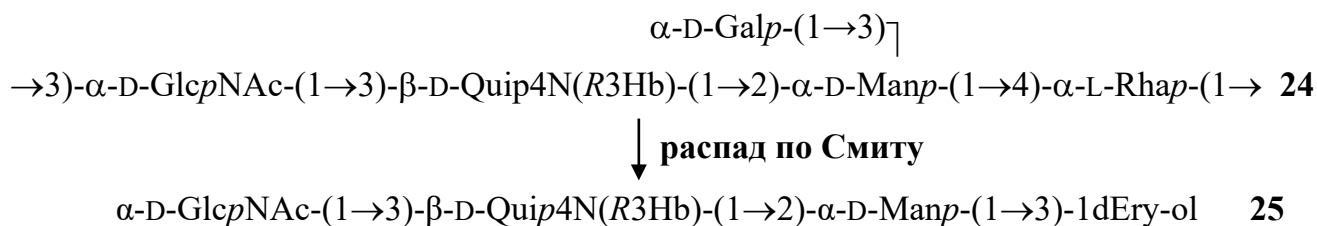
Возможность применения распада по Смитту определяется наличием в полисахариде хотя бы одного моносахарида со свободной вицинальной диольной группировкой. Этот метод включает исчерпывающее периодатное окисление полисахарида с разрывом углерод-углеродной связи, боргидридное восстановление образующегося полиальдегида в соответствующее полигидроксильное производное и избирательный мягкий кислотный гидролиз по ацетальной связи окисленного моносахаридов [52]. Окисление проходит количественно через обратимое образование промежуточного соединения с пятичленным йодсодержащим циклом, как показано ниже.



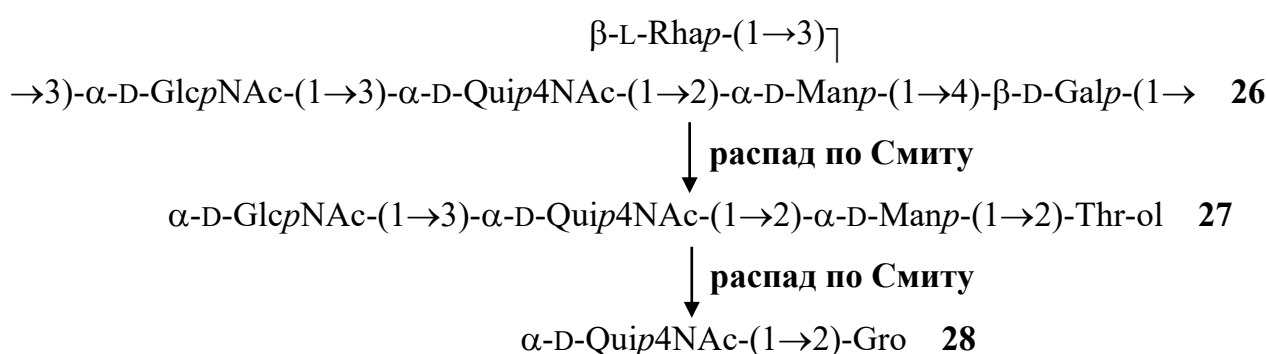
При этом если окисляются только моносахариды боковых цепей, продуктом распада является модифицированный полисахарид. Примером такого рода является распад по Смитсу ОПС *E. coli* O43 с разветвленным пентасахаридным повторяющимся звеном (22), который привел к окислению и последующему отщеплению остатка фукозы боковой цепи с образованием линейного полисахарида с тетрасахаридным повторяющимся звеном (23) [53].



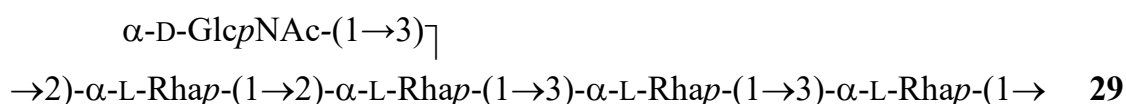
Если  $\alpha$ -гликольная группировка присутствует в моносахаридном цикле одного из остатков основной цепи полисахарида, то продуктом распада по Смитсу является олигосахарид. Он содержит на восстанавливающем конце остаток глицерина (из 6-замещенных альдоз), глицеральдегида (из 2-замещенных альдоз), эритрита или треита (из 4-замещенных гексопираноз, а также из 5- и 6-замещенных гексофураноз). Например, в ОПС *E. coli* O39 (24) наряду с остатком галактозы в боковой цепи деградации подвергся 4-замещенный остаток рамнозы в основной цепи, в результате чего образовался олигосахарид с 1-дезоксиритритом (1dEry-ol) в качестве агликона (25) [54].



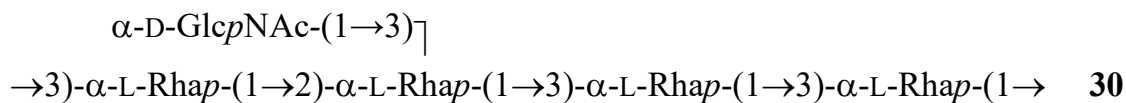
Продукты деградации по Смитсу могут содержать новую  $\alpha$ -гликольную группировку, которая отсутствовала в исходном полисахариде, и они могут быть подвергнуты повторному распаду по Смитсу. Так, разветвленный ОПС *E. coli* O7 (**26**) при распаде по Смитсу окислялся по остаткам галактозы в основной цепи и остаткам рамнозы в боковой цепи, давая линейный трисахарид (**27**) с треитом (Thr-ol) на восстанавливающем конце [55]. При втором распаде по Смитсу окислялись терминальный остаток GlcNAc и потерявший один из заместителей остаток маннозы, что привело к гликозиду 4-ацетида-4,6-дидезоксиглюкозы (Qui4NAc) с глицерином (Gro) в качестве агликона (**28**).



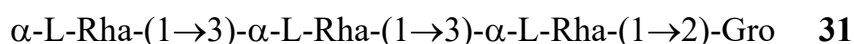
Распад по Смитсу является удобным инструментом для анализа структурно гетерогенных полисахаридов, которые построены из различных повторяющихся звеньев, ведущих себя неодинаково в условиях периодатного окисления. Примером такого рода является ОПС бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *ribicola* [56], состоящий из двух типов пентасахаридных повторяющихся звеньев – основного (**29**) и минорного (**30**). При распаде по Смитсу с последующим боргидридным восстановлением звенья **29** расщеплялись, давая олигосахарид (**31**), а звенья **30** подвергались модификации, образуя линейную структуру (**32**).



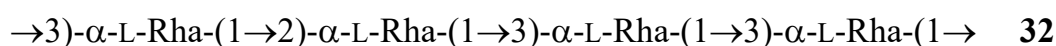
и



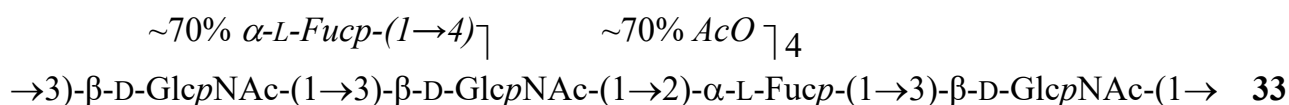
↓ **1. Распад по Смитту**  
↓ **2. NaBH<sub>4</sub>**



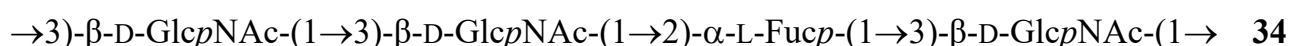
+



С помощью распада по Смитту может быть устранена нерегулярность полисахарида, а сравнение исходного и полученного модифицированного полисахаридов позволяет выявить ее причину. Так, применение этого подхода к нерегулярному ОПС *E. albertii* O2 (33), включающему фукозилированные разветвленные пентасахаридные повторяющиеся звенья и нефукозилированные линейные тетрасахаридные повторяющиеся звенья, привело к отщеплению бокового моносахаридного остатка фукозы и после O-деацетилирования образованию модифицированного регулярного линейного полисахарида с тетрасахаридным повторяющимся звеном (34) [12].



↓ **1. Распад по Смитту**  
↓ **2. O-деацетилирование**



Хотя в большинстве случаев распад по Смитту протекает гладко, при его использовании следует учитывать возможность образования побочных продуктов, таких как циклические ацетали, состоящие из фрагментов окисленных моносахаридов. Например, из восстановленного по карбоксильным группам КПС

бактерии *Serratia marcescens* K23 (**35**) были получены два олигосахарида (**36** и **37**) (рис. 2.9) [57]. При этом олигосахарид **36** имел ожидаемый агликон – глицериновый альдегид, образовавшийся из 2-замещенного остатка глюкуроновой кислоты, а в олигосахариде **37** агликоном являлся продукт внутримолекулярного переацеталирования в этом расщепившемся остатке.

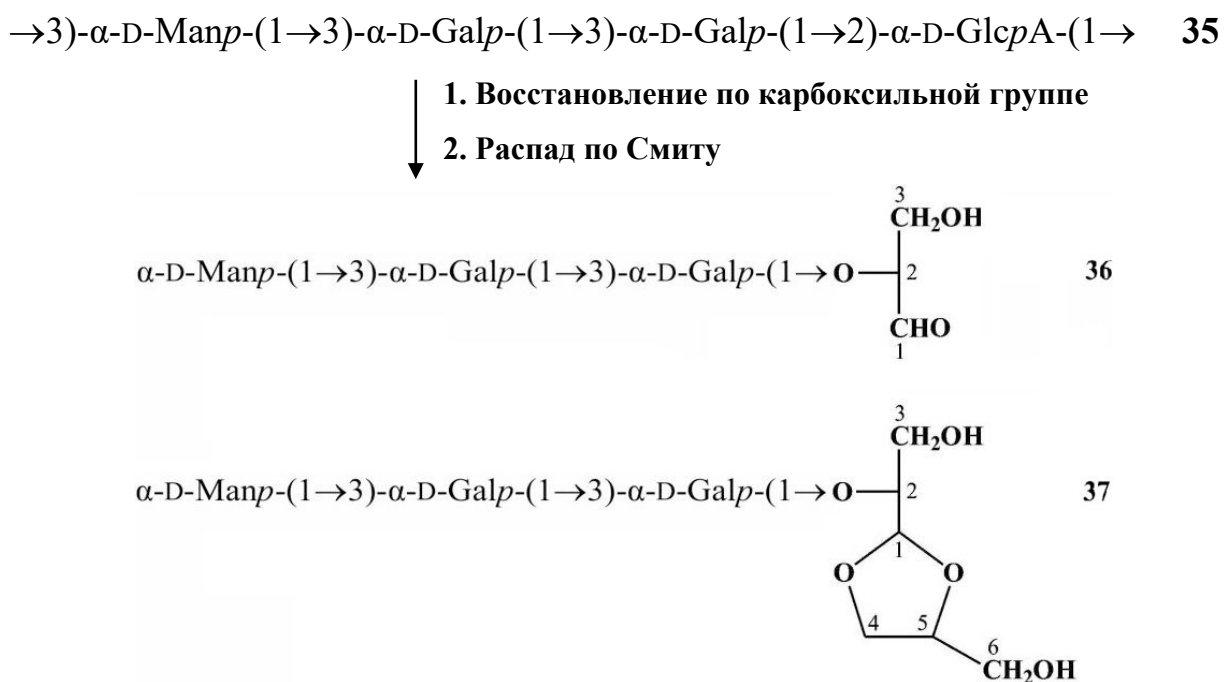


Рис. 2.9. Распад по Смитцу КПС *S. marcescens* K23.

Аналогичный побочный продукт образовался при распаде по Смитцу исследованного в настоящей работе ОПС *Escherichia albertii* O9, содержащего 2-замещенный остаток маннозы (см. раздел 3.1.9).

Одна из возможностей преодолеть эту трудность заключается в защите метилированием свободных гидроксильных групп перед мягким кислотным гидролизом окисленного и восстановленного полисахарида, что исключает возможность внутримолекулярного переацеталирования [58].

Другое возможное осложнение – затрудненность гидролиза гликозидной связи окисленного моносахаридного остатка, который не удастся отщепить без разрыва гликозидных связей неокисленных моносахаридов. Так, при распаде по Смитцу ОПС бактерии *Citrobacter* sp. O32 (**38**) был выделен олигосахарид (**39**) с треитом (Thr-ol) на

конце, в боковой цепи которого находился остаток деградированного терминального остатка GlcNAc, не отщепившийся при мягком кислотном гидролизе (рис. 2.10) [59].

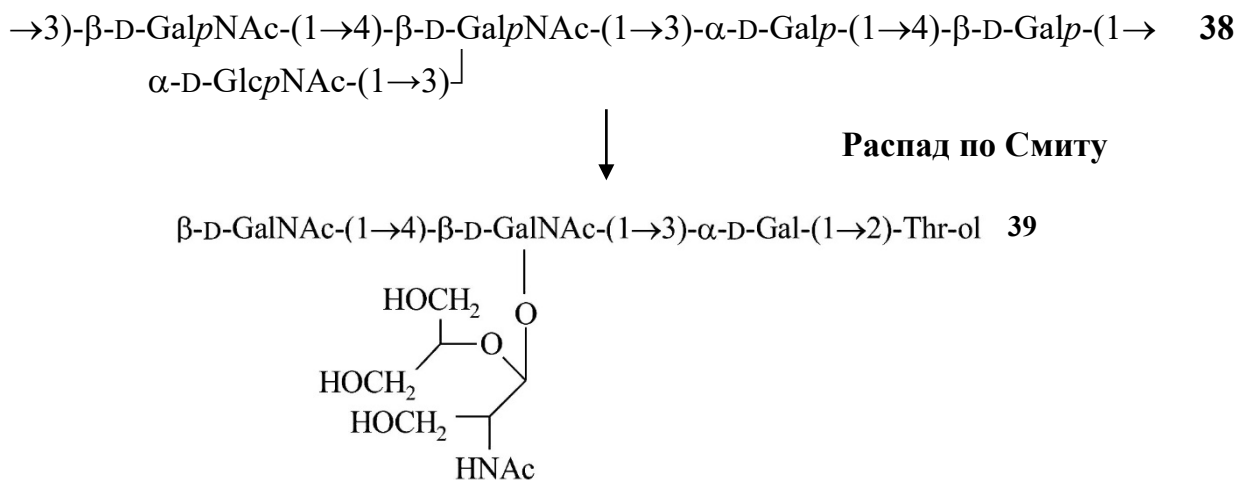


Рис. 2.10. Распад по Смитту ОПС *Citrobacter* sp. O32.

### 2.1.5. Расщепление фосфат-содержащих полисахаридов

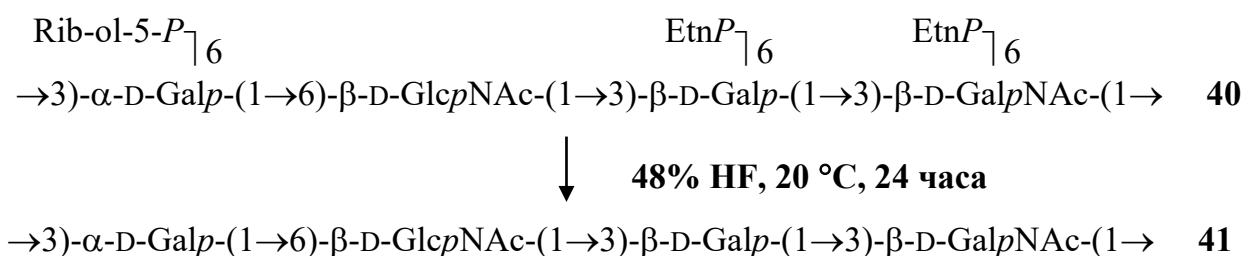
Фосфат-содержащими полисахаридами являются тейхоевые кислоты грамположительных бактерий, но биополимеры, построенные по тому же типу, встречаются также у грамотрицательных бактерий (ОПС и КПС) и других организмов. Известно два типа фосфат-содержащих полисахаридов. Фосфатная группа может присоединять 2-аминоэтанол (EtN) или полиол как боковой заместитель полисахарида или соединять гликозилированный полиол с моносахаридом в основной цепи. В качестве полиола чаще всего выступает глицерин (Gro) или рибит (Rib-ol), но были найдены также эритрит и арабинит (см. Bacterial Carbohydrate Structure Database в сети Интернет по адресу <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>). В полисахаридах другого типа фосфатная группа соединяет два моносахарида, один из которых образует гликозилфосфатную связь.

#### 2.1.5.1. Дефосфорилирование фтористоводородной кислотой

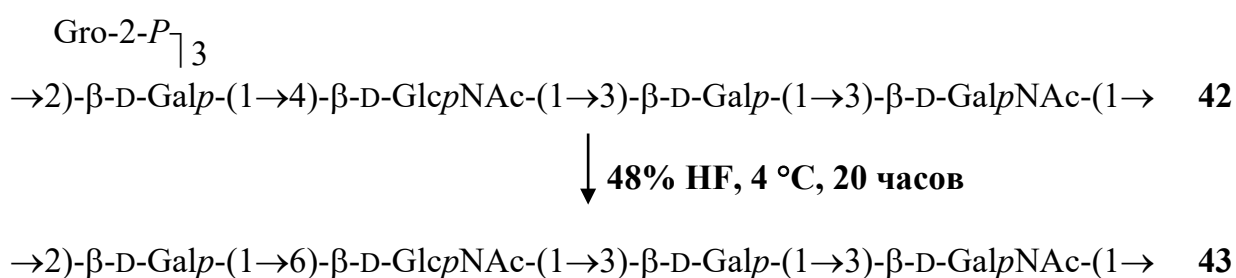
Этот подход, основанный на расщеплении фосфатов действием фтористоводородной кислоты, применяется при исследовании фосфат-содержащих полисахаридов первого типа. Для расщепления обычно используют коммерческую

48% фтористоводородную кислоту при комнатной температуре или при охлаждении до 4 °С, но может применяться и более концентрированный раствор, а также безводная кислота. Гликозидные связи этим реагентом, как правило, не затрагиваются.

Если присутствует фосфоэтаноламин (EtnP) или полиол (например, рибит Rib-ol) присоединяется через фосфатную группу как боковой заместитель, продуктом реакции является модифицированный дефосфорилированный полисахарид. Так, при действии 48% HF на ОПС *Proteus mirabilis* O41 (**40**) отщепились все три заместителя, присоединенные через фосфатные группы, и образовался дефосфорилированный полисахарид (**41**) [60]:

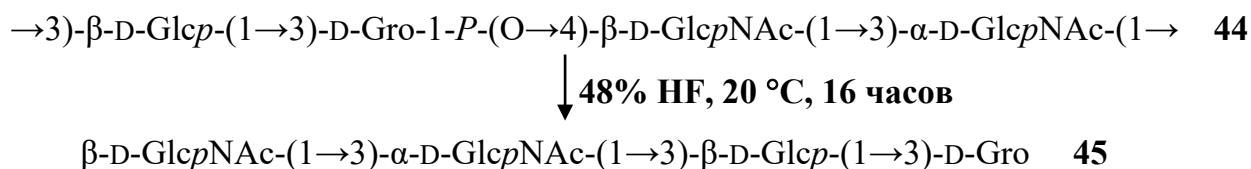


Другой пример – элиминирование 2-фосфоглицерина при действии 48% HF на ОПС *E. coli* O33 (**42**), приводящее к дефосфорилированному полисахариду **43** [18].



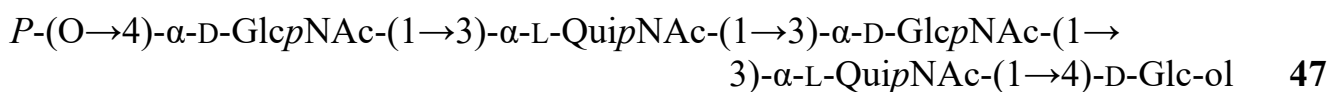
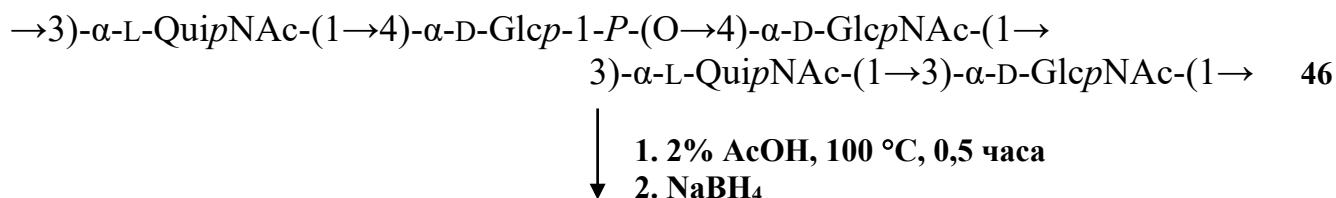
Если фосфат полиола находится в основной цепи, действие 48% HF приводит к деполимеризации полисахарида с образованием олигозилполиола. Примером такого рода может служить расщепление ОПС *E. coli* O28ab (**44**) с образованием присоединенного к глицерину трисахарида **45**, соответствующего дефосфорилированному повторяющемуся звену полисахарида [61].





### 2.1.5.2. Гидролитическое расщепление гликозилфосфатов

Гликозилфосфатная связь отличается высокой кислотоллабильностью и легко расщепляется в мягких кислотных условиях, в которых гликозидные связи других моносахаридов сохраняются (исключение могут составить связи кетосахаров и  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связи N-ацетилгексозаминов). Фосфатная группа при этом сохраняется в составе образующегося олигосахарида на моносахаридном компоненте, к которому она присоединена эфирной связью. Например, ОПС *Shigella boydii* типа 13 (46) деполимеризовался в результате расщепления гликозилфосфатной связи уже в условиях, которые используются для отщепления углеводной части ЛПС от олигосахарида кора. Полученный олигосахарид подвергали боргидричному восстановлению в соответствующий олигозилполиол (47) с превращением находящегося на восстанавливаемом конце остатка глюкозы в глюцит (Glc-ol) [62]. Такая модификация делает продукт более удобным для исследования методами спектроскопии ЯМР по сравнению с исходным восстанавливающим олигосахаридом, дающим в спектрах ЯМР две серии сигналов в соответствии с присутствием остатка глюкозы в форме  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров.



Для расщепления фосфодиэфирных связей, приводящего к монофосфатам, может быть использован также гидролиз в щелочных условиях [31]. Недостатком этого метода является миграция фосфатной группы в условиях реакции через образование циклического фосфата, что не позволяет надежно определить положение фосфатной группы в исходном полисахариде. Вследствие этого метод не имеет преимуществ перед дефосфорилированием действием фтористоводородной кислоты, которое протекает более гладко и в более мягких условиях.

\* \* \*

Таким образом, в настоящее время из специфических методов избирательного расщепления полисахаридов в полной мере сохраняет свое значение распад по Смитту, основанный на деструкции моносахаридов с вицинальными диольными группировками, а для фосфат-содержащих полисахаридов – расщепление фтористоводородной кислотой (обычно 48% HF) и гидролитическое расщепление в мягких кислотных условиях. При этом если деструкции подвергаются только боковые заместители, присоединенные гликозидной связью или через фосфатную группу, продуктом распада является модифицированный полисахарид, а если затрагиваются компоненты основной цепи полисахарида, то происходит деполимеризация и образуется олигосахарид (или олигосахариды). Гидролитическое расщепление полисахаридов с гликозилфосфатными связями в основной цепи приводит к монофосфатам олигосахаридов. Распад по Смитту является удобным инструментом для анализа структурно гетерогенных полисахаридов, построенных из различных повторяющихся звеньев, которые ведут себя неодинаково по отношению к периодатному окислению. С его помощью может быть устранена нерегулярность разветвленного полисахарида, связанная с нестехиометрическим содержанием бокового моносахарида.

Другие специфические методы расщепления, такие как дезаминирование гексозаминов со свободными аминогруппами действием  $\text{HNO}_2$  и щелочное  $\beta$ -элиминирование в гексуроновых кислотах, имеющих заместитель в положении 4, применяются значительно реже, очевидно вследствие трудности проведения

необходимых предшествующих модификаций – N-деацетилирования в первом случае и превращения свободных кислот в амиды во втором случае. В то же время дезаминирование сохраняет свое значение для расщепления углеводов, изначально содержащих остаток аминасахара со свободной аминогруппой, а β-элиминирование – для полисахаридов, включающих амиды гексуроновых кислот. В качестве альтернативного реагента для проведения β-элиминирования в гексуроновых кислотах со свободной карбоксильной группой могут рассматриваться безводные основания, такие как, например, литий в этилендиаминае.

## 2.2. Неспецифические методы избирательного расщепления

К неспецифическим методам расщепления полисахаридов с целью получения как олигосахаридных фрагментов, так и сложных моносахаридов относятся частичный кислотный гидролиз и сольволиз протонными кислотами. Основой их применения для получения олигосахаридов является различие в скорости расщепления (что соответствует различной устойчивости) гликозидных связей моносахаридных компонентов полисахаридов (гексоз, β-дезоксигексоз, гексозаминов, гексуроновых и 3-дезоксигальдулозоновых кислот и других), что дает возможность полного или преобладающего расщепления одной или нескольких связей в полисахариде без существенного расщепления других связей.

Сольволитическое (в частном случае гидролитическое) расщепление гликозидной связи протекает по пути протонирования аномерного атома кислорода с последующим разрывом связи между этим атомом и C-1 с высвобождением агликона в виде спирта и образованием гликозил-катиона. Последний реагирует с сольволитическим агентом, давая свободный моносахарид в случае гидролиза, гликозилфторид или сложные эфиры в случае сольволиза фтористоводородной кислотой или органическими кислотами, соответственно (рис. 2.11).

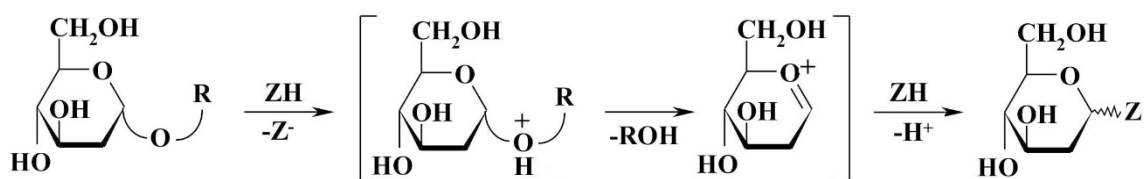


Рис. 2.11. Расщепление гликозидной связи сольволитическими протонными реагентами.

Хотя в большинстве случаев неспецифические методы расщепления демонстрируют меньшую избирательность по сравнению со специфическими методами, они не предъявляют определенных требований к составу и строению полисахарида, благодаря чему находят широкое применение в структурном анализе.

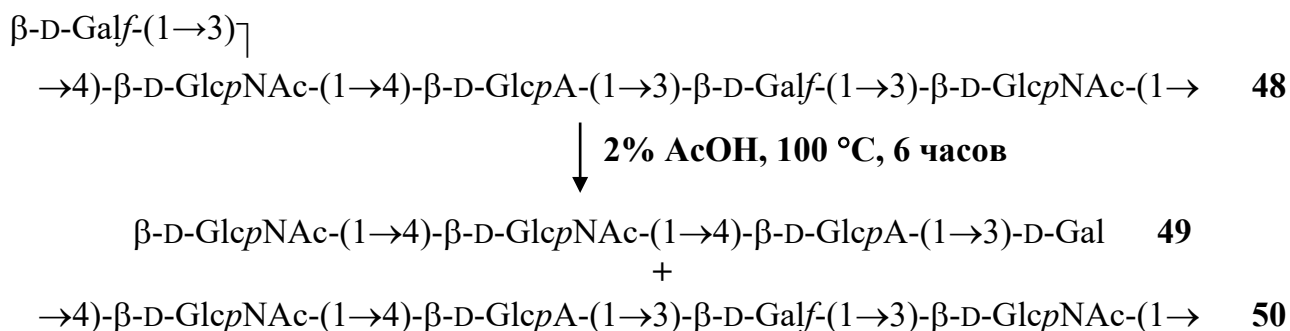
Для некоторых реагентов неспецифического действия описаны только единичные случаи их применения. Например, метанолиз и меркаптолиз были использованы для получения с высоким выходом дисахаридных фрагментов агарозы и  $\kappa$ -каррагинана путем их избирательного расщепления по гликозидным связям 3,6-ангидро-L-галактозы и 3,6-ангидро-D-галактозы, соответственно, при сохранении связи соседней галактозы [31]. Напротив, такие методы, как частичный кислотный гидролиз, ацетолиз и сольволиз фтористоводородной и сульфоновыми кислотами, нашли применения для широкого круга полисахаридов. Полученные при этом экспериментальные данные позволили выявить ряд закономерностей расщепления гликозидных связей при действии этих реагентов, сформулированных в настоящем обзоре в ходе последующего изложения.

### **2.2.1. Частичный кислотный гидролиз**

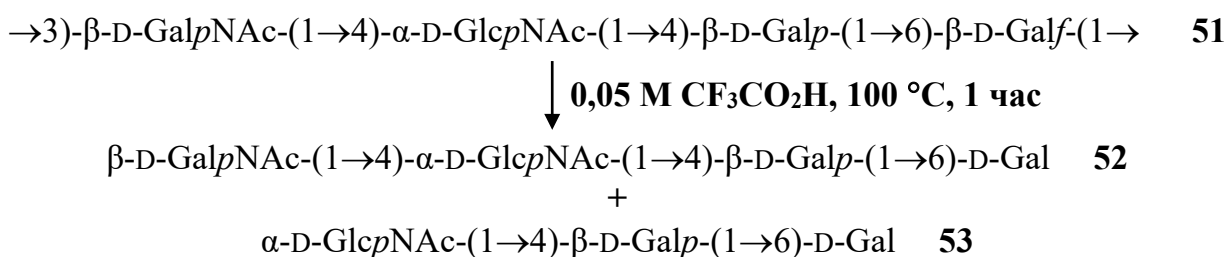
Частичный кислотный гидролиз до последнего времени являлся наиболее распространенным методом избирательного расщепления углеводов [31]. С этой целью используются водные растворы различных органических и неорганических кислот, таких как разбавленные  $\text{AcOH}$ ,  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ , 48%  $\text{HF}$  и другие. К недостаткам метода относятся низкая избирательность при отсутствии в полисахариде моносахаридов с ярко выраженной кислотолабильной или кислотоустойчивой гликозидной связью и возможность нежелательного расщепления амидных связей в N-ацилированных аminosахарах и амидах гексуроновых кислот при использовании недостаточно мягких условий гидролиза.

Наиболее кислотолабильными являются гликозидные связи гексофураноз, 3,6-дидезоксигексопираноз, 3-дезоксиальдулозоновых кислот и, неожиданно,  $\beta 1 \rightarrow 6$ -связи (но не  $\alpha 1 \rightarrow 6$ -связи) N-ацетилгексозаминов. Присутствие этих компонентов в

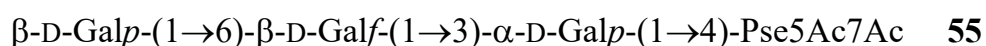
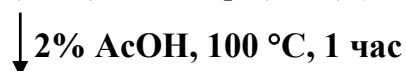
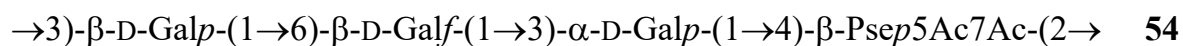
гетерополисахаридах позволяет получать олигосахаридные фрагменты с достаточно высокими выходами. Так, деполимерзация разветвленного ОПС *E. coli* O170 (48) действием разбавленной уксусной кислоты протекала строго избирательно по гликозидным связям большинства присутствующих остатков β-D-галактофуранозы (β-D-Galf) с образованием тетрасахарида (49) и модифицированного линейного полисахарида (50) [63].



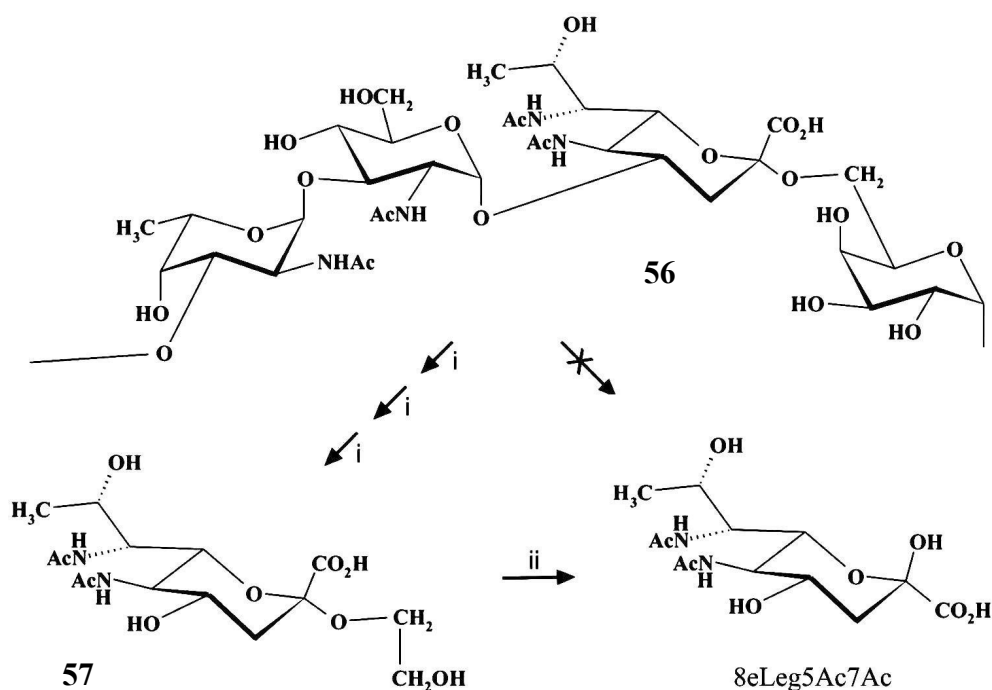
Другим примером является расщепление 0,05 М трифторуксусной кислотой О-дезацетилированного ОПС *E. albertii* O5 (51) с тетрасахаридным повторяющимся звеном, которое привело к разрыву всех галактофуранозидных связей и части связей β-D-GalpNAc с образованием олигосахаридов 52 и 53 [11].



Легко расщепляются кислотолабильные кетозидные связи производных 3-дезоксинулозоновых кислот (нейраминовой, псевдаминовой, легионаминовой и других). Например, ОПС *Enterobacter cloacae* C5529 (54) при действии разбавленной уксусной кислоты при 100 °С деполимеризовался по связи ди-N-ацетилпсевдаминовой кислоты (Pse5Ac7Ac), давая тетрасахарид (55), соответствующий повторяющемуся звену ОПС [64]. В таких мягких условиях другая кислотолабильная связь в ОПС – галактофуранозидная – практически не затрагивалась.



В ряде случаев расщепление олигосахаридов позволяет выделить для последующей идентификации сложные моносахариды или их производные, которые не удастся получить непосредственно из исходных полимеров. Так, комбинация трех последовательных распадов по Смитту ОПС *E. coli* O108 (**56**) и мягкого кислотного гидролиза полученного гликозида (**57**) позволила выделить и затем идентифицировать ди-*N*-ацетил-8-эпилегионаминовую кислоту (8eLeg5Ac7Ac), являющуюся одним из компонентов полисахарида (рис. 2.12) [65]. Прямому получению этой 3-дезоксинонулозоновой кислоты путем частичного кислотного гидролиза ОПС препятствовало ее разрушение в условиях, необходимых для расщепления гликозидной связи моносахарида, присоединенного к 8eLeg5Ac7Ac.

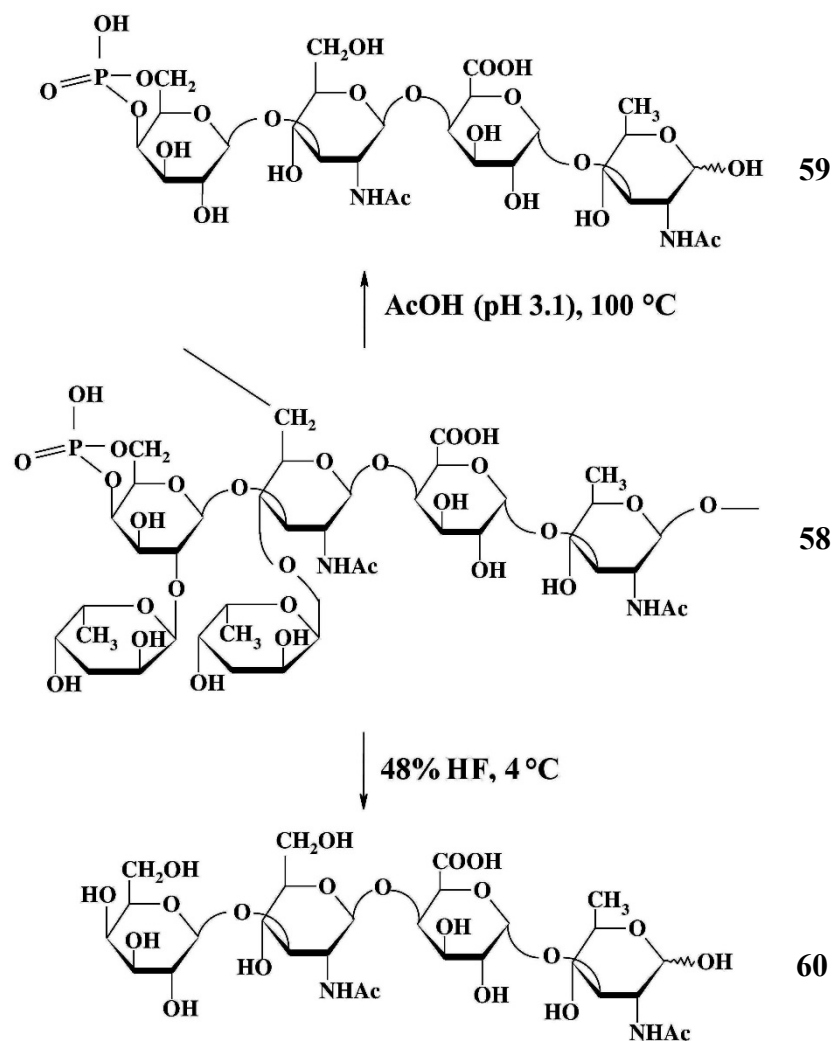


**Рис. 2.12.** Выделение ди-*N*-ацетил-8-эпилегионаминовой кислоты из ОПС *E. coli* O108 (**56**).

i) Распад по Смитту; ii) 2% AcOH, 100 °C, 2 часа.

Действие разбавленной уксусной кислоты (рН 3.1) при 100 °С на КПС бактерии *Vibrio cholerae* O139 (**58**) привело не только к ожидаемому отщеплению находящихся в боковых цепях остатков 3,6-дидезокси-L-ксило-гексозы (колитозы), но и к деполимеризации КПС с образованием тетрасахарида (**59**) в результате расщепления  $\beta 1 \rightarrow 6$ -связи остатка  $\beta$ -D-QuipNAc, находящегося в основной цепи полисахарида (рис. 2.13) [66]. Такое расщепление не является случайным, и известны также другие примеры кислотолабильности  $\beta 1 \rightarrow 6$ -связи N-ацетилгексозаминов.

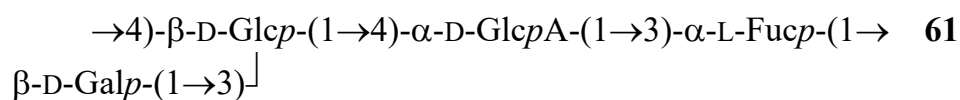
Расщепление кислотолабильных гликозидных связей может происходить при действии 48% фтористоводородной кислоты при 0–4 °С, обычно применяемой для дефосфорилирования углеводов. Так, обработка этим реагентом того же КПС *V. cholerae* O139 (**58**) не ограничивалась удалением фосфатных групп, но отщепляла также остатки 3,6-дидезоксигексозы (колитозы), приводя к тетрасахариду **60** – дефосфорилированному аналогу тетрасахарида **59** (рис. 2.13) [66].



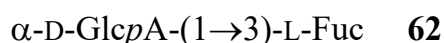
**Рис. 2.13.** Частичный кислотный гидролиз КПС *V. cholerae* O139.

С другой стороны, эффективное избирательное расщепление достигается и в случае присутствия в полисахариде моносахаридов, гликозидные связи которых обладают повышенной кислотоустойчивостью, таких как гексуроновые кислоты. Например, при частичном кислотном гидролизе КПС *E. coli* K27 (**61**) образовался дисахарид (**62**) с остатком GlcA на невосстанавливающем конце наряду с меньшим количеством трисахарида (**63**) [67].





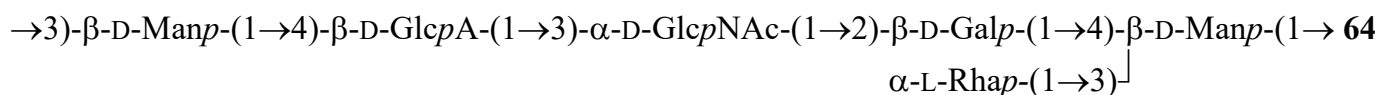
$\downarrow$  0,1 M CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, 100 °C, 30 минут



+



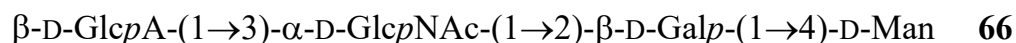
Стабилизация гексуроновыми кислотами также соседних гликозидных связей было продемонстрировано мягким кислотным гидролизом ОПС *Shigella boydii* типа 5 (64), содержащего один остаток GlcA в гексасахаридном повторяющемся звене [68]. Он привел к трисахариду (65) и двум взаимодополняющим друг друга тетрасахаридам (66) и (67).



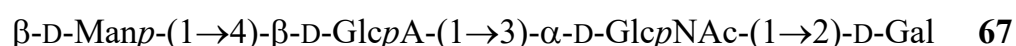
$\downarrow$  0,25 M HCl, 100 °C, 1 час



+

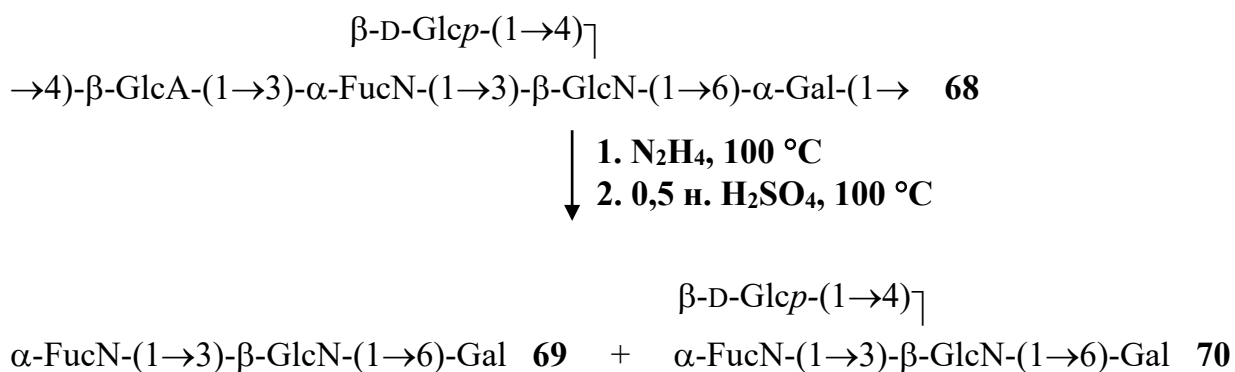


+



Высокой устойчивостью к кислотному гидролизу отличаются гликозиды гексозаминов со свободной аминогруппой в положении 2. Она объясняется протонированием этой аминогруппы, которое за счет электростатического отталкивания препятствует протонированию гликозидного атома кислорода, являющемуся начальной стадией гидролитического расщепления гликозидной связи. Однако в бактериальных полисахаридах аминогруппы гексозаминов, как правило, N-ацетилированы, и их высвобождение является необходимой, но непростой задачей (проблемы N-деацетилирования аминсахаров обсуждались в секции 2.1.1 настоящего обзора, посвященной дезаминированию гексозаминов).

Таким образом, при кислотном гидролизе полисахарида, содержащего гексозамин со свободной аминогруппой, расщепляются все гликозидные связи за исключением связи гексозамина и образуется дисахарид с этим аминсахаром на невозстанавливаемом конце. При последовательном расположении нескольких аминсахаров образуются соответственно более крупные олигосахариды, как например, трисахарид (69), выделенный при кислотном гидролизе N-деацетилированного КПС *E. coli* K87 (68) [69]. Наряду с ним образовался тетрасахарид (70), по-видимому, за счет стабилизации гликозидной связи бокового остатка глюкопиранозы двумя расположенными в пространственной близости протонированными аминогруппами GlcN и FucN.



Поведение полисахаридов по отношению к гидролитическому расщеплению может определяться самыми тонкими структурными особенностями. Так например, ОПС *Proteus penneri* 19 (71) в условиях мягкой кислотной деградации ЛПС (1% AcOH, 100 °C, 4 часа) избирательно расщеплялся по гликозидной связи остатка β-D-GlcpNAc, давая трисахарид 72, соответствующий повторяющемуся звену ОПС, и его олигомер-гомологи (рис. 2.14) [70]. В то же время ОПС *P. penneri* 62 (73), отличающийся только местом присоединения остатка β-D-GlcpNAc к остатку N-ацетилизомурамовой кислоты (в положение 6, а не в положение 4, как в ОПС *P. penneri* 19), в этих условиях устойчив [70]. Такое различие может быть объяснено соучастием в гидролизе гликозидной связи остатка молочной кислоты, находящегося в положении 3 остатка N-ацетилизомурамовой кислоты вблизи расположенного в положении 4 остатка β-D-GlcpNAc в ОПС *P. penneri* 19.

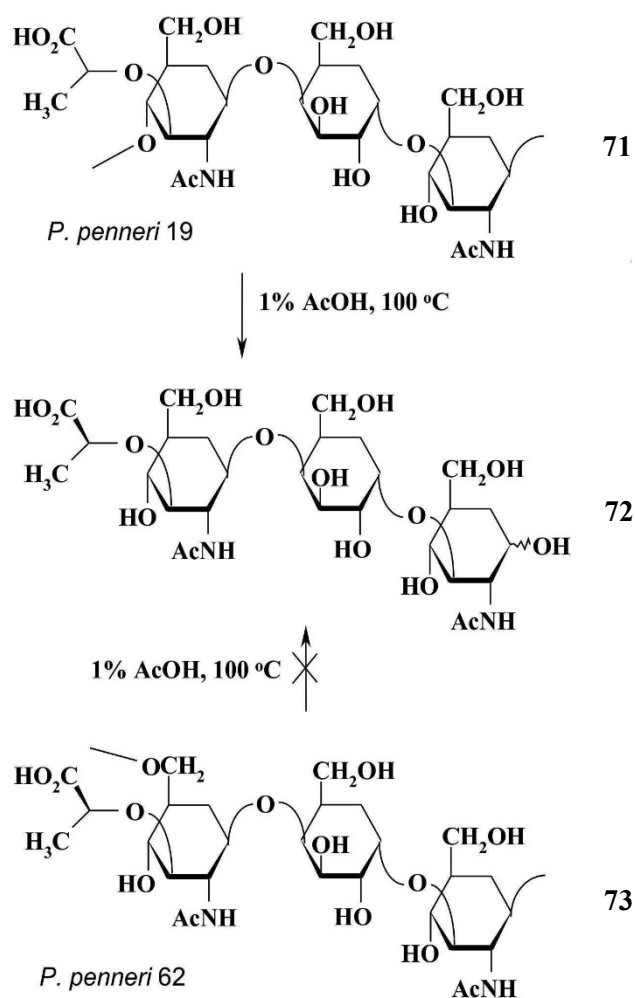


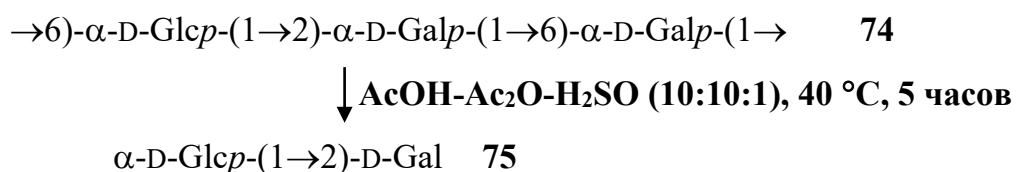
Рис. 2.14. Частичный кислотный гидролиз ОПС *P. penneri* 19.

### 2.2.2. Ацетолиз

Ацетолиз заключается в обработке углеводов смесью уксусного ангидрида серной кислоты, иногда в присутствии уксусной кислоты. При этом образуются О-ацетилированные сахара, которые легко могут быть превращены омылением MeONa в смесь свободных моносахаридов и олигосахаридов. Избирательность расщепления наблюдается для различных типов гликозидных связей, в том числе образованных одинаковыми или сходными по природе моносахаридами. Так, при ацетолизе легче других расщепляются 1→6-связи независимо от их конфигурации.

В структурном анализе полисахаридов ацетолиз применяется редко, но иногда он позволяет получить фрагменты, недоступные другими способами. Например, ацетолиз ОПС бактерии *Acetobacter methanolicus* MB 58 (74) привел к дисахариду

(75) в результате селективного расщепления 1→6-связей двух остатков галактозы при сохранении 1→2-связи остатка глюкозы [71].



Предпочтительное направление частичного ацетолиза может быть обратным направлению частичного гидролиза. Так, при мягком кислотном гидролизе трагакантовой кислоты – кислого полисахарда камеди *Astragalus* sp. – в первую очередь отщеплялись терминальные остатки  $\alpha$ -фукопиранозы с образованием дефукозилированного полимера, тогда как ацетолиз позволил выделить дисахарид  $\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 2)\text{-D-Xyl}$  с остатком фукозы на невозстанавливаемом конце за счет преимущественного расщепления менее устойчивой в этих условиях гликозидной связи остатка  $\beta$ -ксилопиранозы [72].

Была продемонстрирована определенная избирательность расщепления гликозидных связей при трифторацетолизе гексозаминогликанов. При этом наблюдались также побочные реакции, такие как трансамидирование и элиминирование в остатках N-ацетилгексозаминов, находящихся на восстанавливаемом конце образующихся олигосахаридов [31].

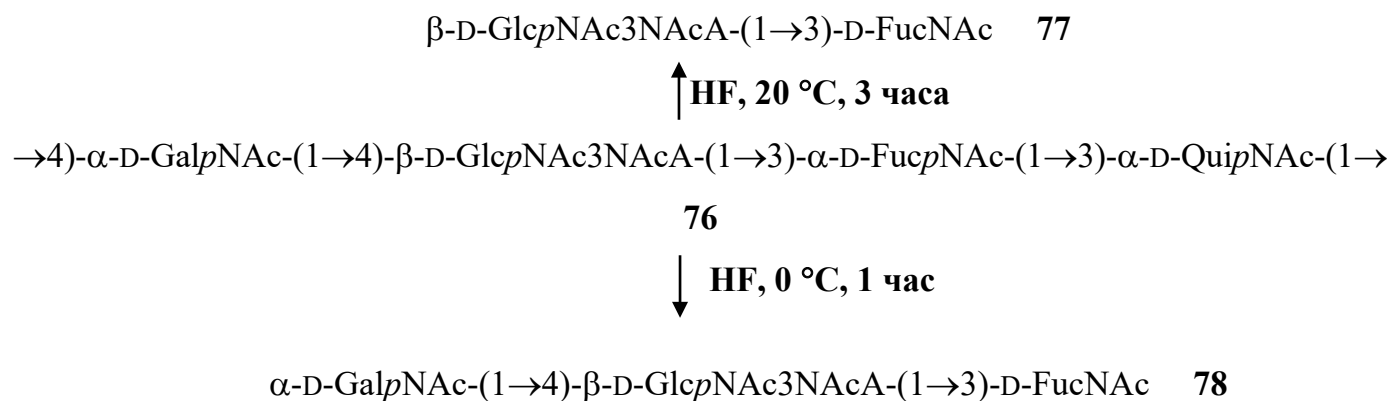
### 2.2.3. Сольволиз безводными кислотами

В последние десятилетия для избирательного расщепления полисахаридов широко используется сольволиз безводными кислотами, который в значительной степени потеснил частичный кислотный гидролиз. Первым по времени сольволитическим реагентом, примененным для избирательного расщепления полисахаридов в 1980-х годах, была безводная фтористоводородная кислота. Однако высокая токсичность и трудность работы с HF, имеющей низкую температуру кипения (19 °C) и требующей специального оборудования, заставили искать другие, более безопасные и более удобные сольволитические реагенты. В качестве таких

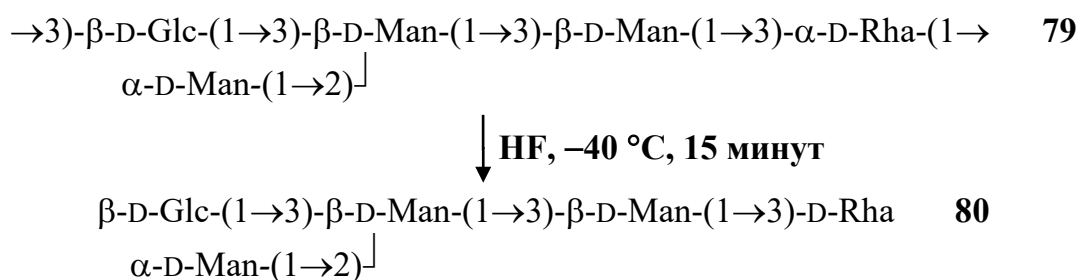
реагентов в начале 2000-х годов были протестированы и внедрены в практику трифторметансульфоновая кислота (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H) и в середине 2010-х годов – трифторуксусная кислота (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, ТФУ).

### 2.2.3.1. Сольволиз фтористоводородной кислотой

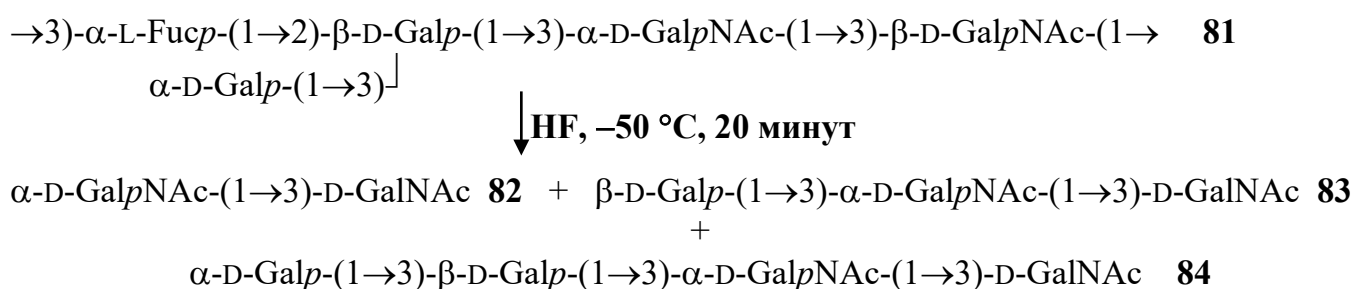
Расщепление гликозидных связей безводной фтористоводородной кислотой происходит через образование гликозилфторидов, которые легко гидролизуются при обработке реакционной смеси водой. Исключение составляют 2-замещенные гликозилфториды, которые более устойчивы и благодаря этому могут быть выделены и проанализированы в свободном виде [32]. Полисахариды расщепляются этим реагентом по гликозидным связям пентоз, гексоз, 6-дезоксигексоз и N-ацелированных 6-дезоксигексозаминов, тогда как связи N-ацелированных диаминогексоз, гексуриновых и 3-деоксиальдулозоновых кислот сохраняются [32]. Гликозидные связи N-ацилгексозаминов обладают промежуточной устойчивостью к HF, что позволяет проводить сольволиз направленно, варьируя условия реакции. Например, при сольволизе ОПС *P. aeruginosa* Об (76) при 20 °С в течение 3 часов расщеплялись все гликозидные связи за исключением связи 2,3-диацетамидо-2,3-дидезоксиглюкуроновой кислоты (GlcNAc3NAcA), давая дисахарид 77 с этим моносахаридом на невосстанавливаемом конце. В более мягких условиях (0 °С, 1 час) расщеплялись только гликозидные связи 6-дезоксигексозаминов (QuiNAc и FucNAc) при сохранении более устойчивой связи GalNAc, что привело к трисахариду 78 [73].



При снижении температуры сольволиза может быть достигнуто избирательное расщепление гликозидных связей 6-дезоксигексоз в присутствии гексоз. Так, при действии HF при -40 °C внеклеточный полисахарид *P. aeruginosa* (79) расщеплялся по гликозидной связи остатков рамнозы, давая в качестве единственного продукта пентасахарид (80) [74].



Примером использования неодинаковой устойчивости гликозидных связей различных аномеров является сольволиз ОПС *E. coli* O86 (81). Из связей двух остатков GalNAc в основной цепи этого полисахарида при действии HF при -50 °C расщеплялась только  $\beta$ -гликозидная связь, давая набор олигосахаридов от трисахарида до пентасахарида (82-84) [75].



В присутствии низших спиртов могут быть получены гликозиды олигосахаридов или сложных моносахаридов, которые более удобны для последующего ЯМР-спектроскопического анализа по сравнению со свободными олигосахаридами. Например, при сольволизе ОПС *Pseudomonas aeruginosa* O13 (85) действием фтористоводородной кислоты в метаноле расщеплялись гликозидные связи одного или обоих производных 6-дезоксамносахаров (D-QuiN и L-FucN), тогда как связи ди-N-ацетилпсевдаминовой кислоты были устойчивы (рис. 2.15) [76].

В результате в качестве продуктов этой реакции образовались метилгликозиды дисахарида (**86**) и трисахарида (**87**).

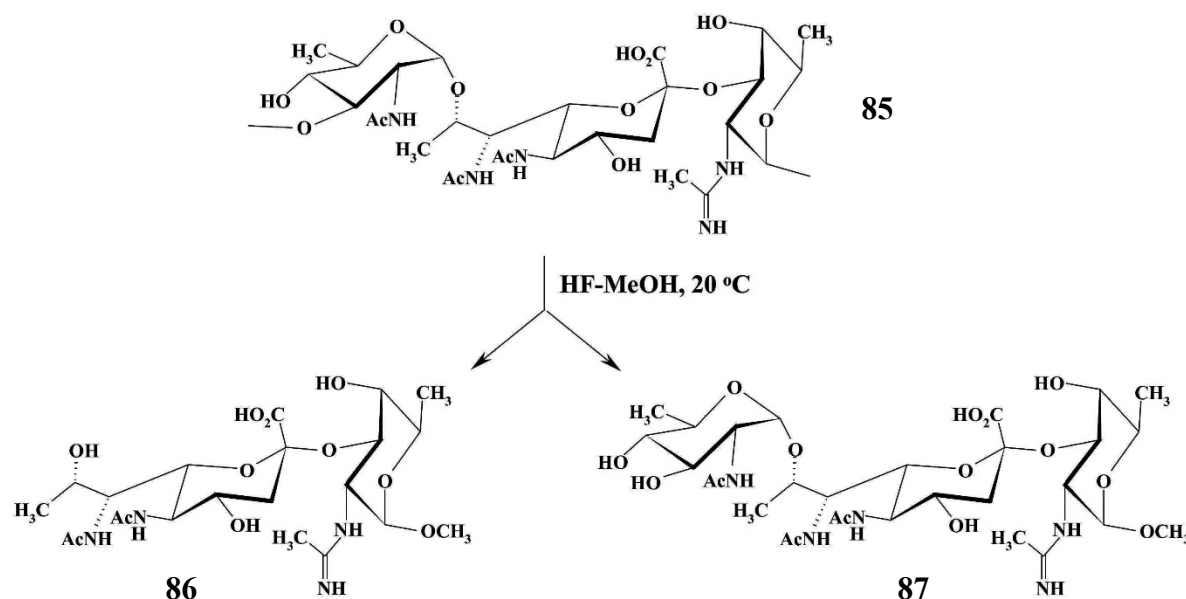
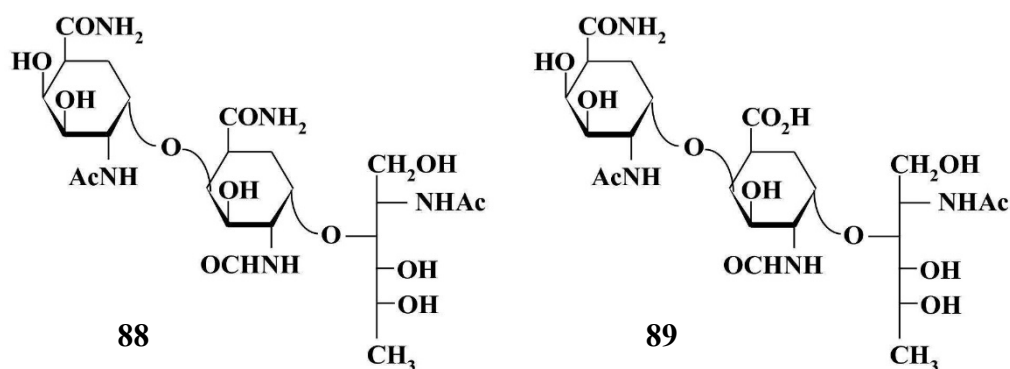


Рис. 2.15. Сольволитическое расщепление ОПС *P. aeruginosa* O13.

Сольволиз HF использовался для анализа амидированных производных D-галактозаминуруновой кислоты в группе из пяти структурно родственных ОПС *P. aeruginosa* Об (кроме степени амидирования, различие между ними заключается в положении замещения остатка Rha<sub>p</sub>, конфигурации гликозидной связи остатка Qui<sub>p</sub>NAc и положении O-ацетильной группы) (таблица 1) [77]. Полученные продукты восстанавливали NaBH<sub>4</sub>, разделяли анионообменной хроматографией и по соотношению нейтрального (**88**) и кислого (**89**) трисахаридов определяли степень амидирования остатков N-ацилированных производных галактозаминуруновой кислоты. Было найдено, что, в то время как остаток GalNAcA присутствует в форме амида во всех повторяющихся звеньях всех ОПС, степень амидирования остатка GalNFoA варьируется в широких пределах (таблица 1).



**Таблица 1.**

| Серотип      | Структуры O-полисахаридов  |                        |
|--------------|--|------------------------|
| Оба,b        | NH <sub>2</sub> 6  | ~10% NH <sub>2</sub> 6 |
|              | $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNFoA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-QuipNAc-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-AcO}$ |                        |
| Оба,c        | NH <sub>2</sub> 6  |                        |
|              | $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNFoA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-QuipNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-AcO}$ |                        |
| Оба,d        | NH <sub>2</sub> 6  | ~20% NH <sub>2</sub> 6 |
|              | $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNFoA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-QuipNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-AcO}$  |                        |
| Оба          | NH <sub>2</sub> 6  |                        |
|              | $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNFoA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-QuipNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-AcO}$ |                        |
| Иммуно-тип 1 | NH <sub>2</sub> 6  | NH <sub>2</sub> 6      |
|              | $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNFoA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-QuipNAc-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-AcO}$ |                        |

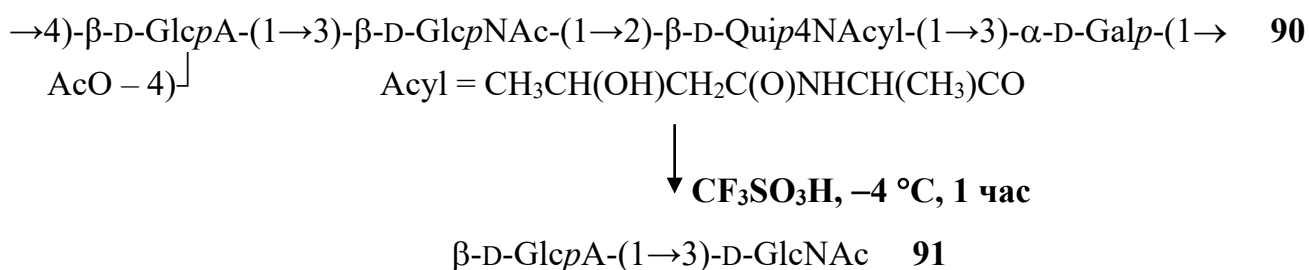
### 2.2.3.2. Сольволиз трифторметансульфоновой кислоты

Сольволиз трифторметансульфоновой кислотой протекает высокоселективно и практически без значительного разрушения моносахаридов [33]. Устойчивость гликозидных связей различных сахаров к CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H уменьшается в том же порядке, что и к безводной HF: 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинулозоновые кислоты > 2,3-диамино-2,3-дидезоксиуроновые кислоты ≈ 2,4-диамино-2,4,6-тридезоксигексозы > гексуриновые кислоты ≈ 2-амино-2-дезоксигексозы > 2-амино-2,6-

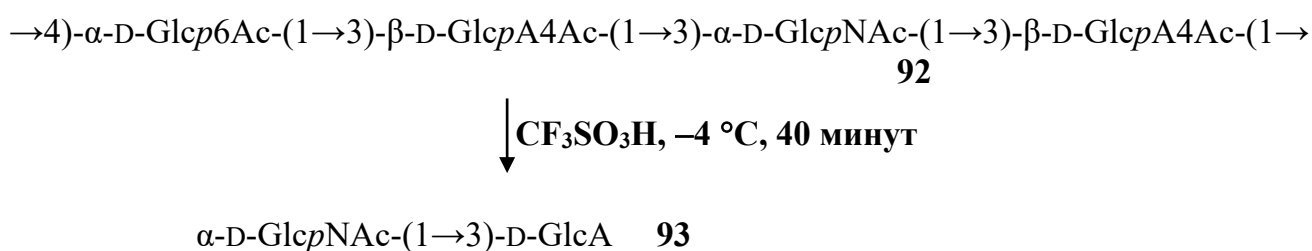


дидезоксигексозы  $\approx$  гексозы  $>$  6-дезоксигексозы (все перечисленные аминсахара находятся в N-ацилированной форме) [33].

Как и при сольволизе HF, избирательность расщепления  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  может определяться конфигурацией аномерного центра. Например, гликозидная связь  $\beta$ -GlcA более устойчива по сравнению со связью  $\beta$ -GlcNAc, но менее устойчива, чем связь  $\alpha$ -GlcNAc, как это было продемонстрировано на примере ОПС двух штаммов *Proteus vulgaris*. Сольволиз трифторметансульфоновой кислотой ОПС *P. vulgaris* O4 (90) расщеплял все гликозидные связи за исключением связи  $\beta$ -GlcA и привел с выходом 20% к дисахариду (91) с остатком этого моносахарида на невосстанавливаемом конце [78].



Напротив, при сольволизе ОПС *P. vulgaris* O46 (92) расщеплялась гликозидная связь  $\beta$ -GlcA и в результате с высоким выходом (38%) был получен дисахарид (93), на невосстанавливаемом конце которого находился остаток  $\alpha$ -GlcNAc [79]. O-Ацетильные группы, присутствующие в ОПС, при этом полностью удалялись.



Трифторметансульфоновая кислота обладает высокой сольволитической активностью и расщепляет многие гликозидные связи, устойчивые к действию других реагентов (HF,  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ). Например, полисахарид морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 634 (94) устойчив к действию безводной фтористоводородной кислоты, но при сольволизе  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  при  $20^\circ\text{C}$  происходит его

деполимеризация [80]. В нем полностью расщеплялись гликозидные связи GlcA и производного 2,3-диамино-2,3-дидезоксиглюкуроновой кислоты (GlcN3NA), тогда как связь производного 2,3-диамино-2,3-дидезоксиманнуровой кислоты (ManN3NA) была устойчива, а связь производного 2,4-диамино-2,4,6-тридезоксиглюкозы (QuiN4N) расщеплялась примерно у половины присутствующих остатков (рис. 2.16). В результате образовалась смесь примерно равных количеств дисахарида (95) и трисахарида (96). Существенное различие в поведении моносахаридов одного класса (производных ManN3NA и GlcN3NA) указывает на конфигурацию сахара как одного из факторов, влияющих на устойчивость гликозидной связи. Значение может иметь также присутствие первого производного в виде амида с аланином и второго в виде свободной кислоты.

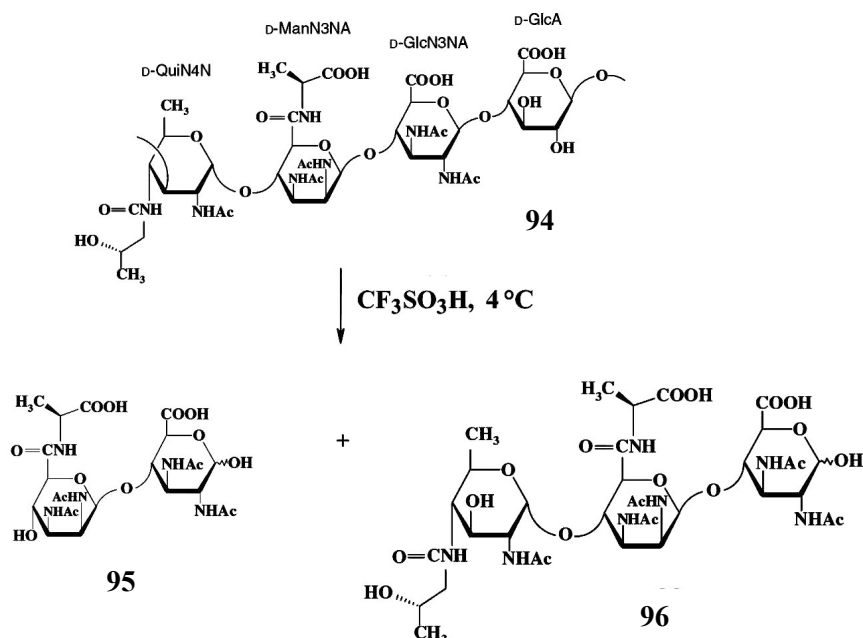
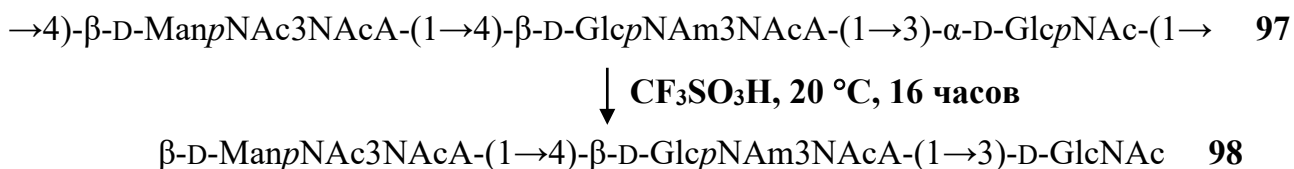


Рис. 2.16. Сольволитическое расщепление полисахарида *Pseudoalteromonas* sp. КММ 634.

Другим примером является избирательное расщепление трифторметансульфоновой кислотой ОПС *E. albertii* O1 (97), устойчивого к действию трифторуксусной кислоты. При сольволизе CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H он деполимеризовался по гликозидным связям остатка GlcNAc, давая трисахарид (98) в качестве единственного продукта [10].



Варьирование условий реакции позволяет проводить направленное сольволитическое расщепление, как это может быть проиллюстрировано на примере избирательного расщепления ОПС *P. vulgaris* O39 (**99**). Действие на него  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  при  $20^\circ\text{C}$  за 16 часов привело к дисахаридному фрагменту (**100**), а при  $-4^\circ\text{C}$  в течение 2 часов – к трисахаридному фрагменту (**101**) (рис. 2.17) [81]. При замене трифторметансульфоновой кислоты на трифторметановую кислоту в тех же условиях ( $20^\circ\text{C}$ , 16 часов) образовалась смесь олигосахаридов **100** и **101** в соотношении 2:1 [81], что характеризует  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$  как более мягкий сольволитический реагент, чем  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ . Как и по отношению к другим сольволитическим реагентам, гликозидная связь производного псевдаминовой кислоты, присутствующего в ОПС (**99**), устойчива к действию сульфокислот.

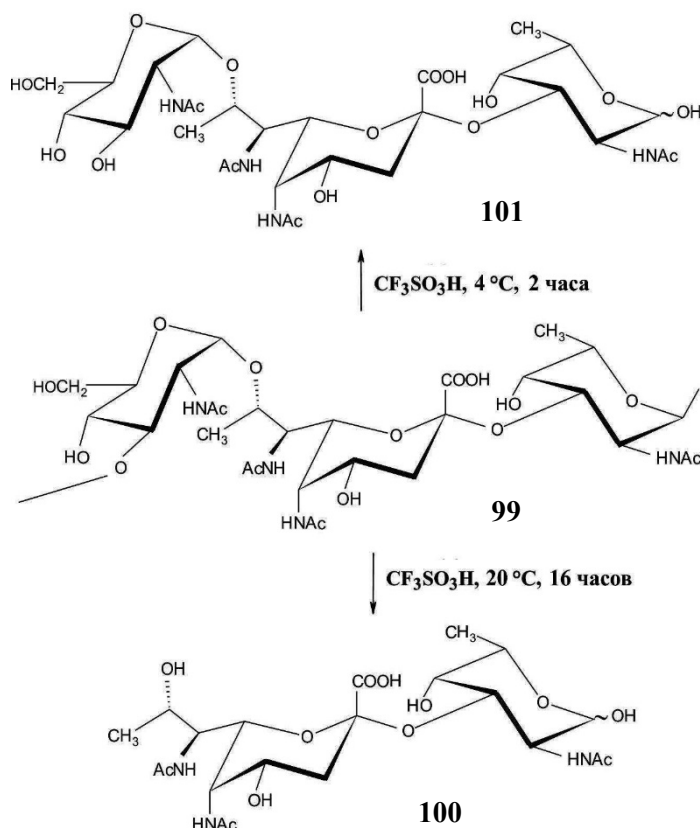
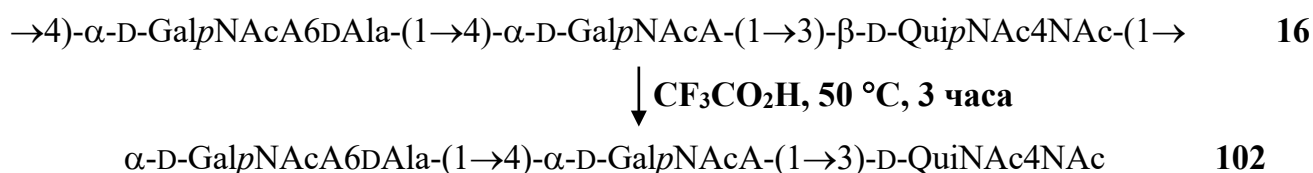


Рис. 2.17. Сольволитическое расщепление ОПС *P. vulgaris* O39.

### 2.2.3.3. Сольволиз трифторуксусной кислотой

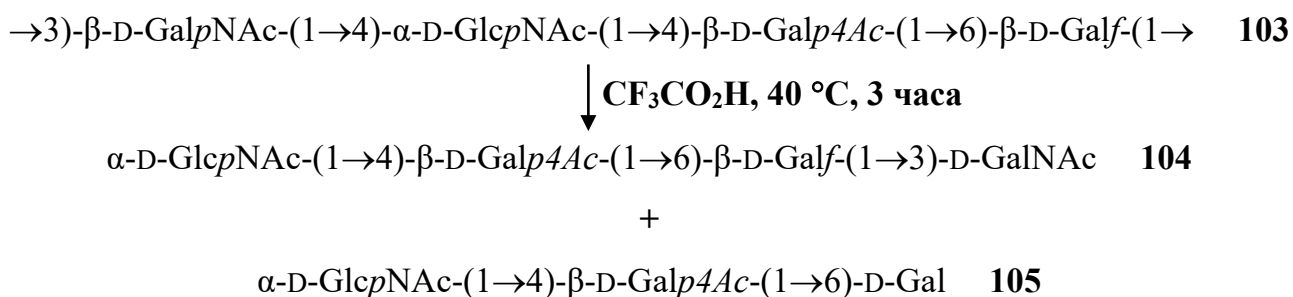
При сольволизе  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  образуются гликозилтрифторацетаты, как это было продемонстрировано в эксперименте с метил- $\alpha$ -L-рамнопиранозидом, который при обработке этим реагентом при 60 °C в течение 30 мин на 50% превращался в 1-O-трифторацетил- $\alpha$ -L-рамнопиранозу [82]. Водная обработка продуктов сольволиза после удаления кислоты приводит к свободным олигосахаридам или модифицированным полисахаридам. Наименее устойчивыми по отношению к  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  являются гликозидные связи фураноз, 6-дезоксигексопираноз (*Rhap*, *Fucp*), 2-ацетамидо-2,6-дидезоксигексопираноз (*QuipNAc*, *FucpNAc*, *QuipNAc4NAc*) и  $\beta$ -связанных 2-ацетамидо-2-дезоксигексопираноз ( $\beta$ -*Glc**pNAc*,  $\beta$ -*Gal**pNAc*), тогда как связи гексопираноз,  $\alpha$ -связанных 2-ацетамидо-2-дезоксигексопираноз и гексуриновых кислот стабильны при температуре 50 °C или ниже [82, 83].

Например, КПС *Acinetobacter baumannii* G7 (**16**) при действии  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  при 50 °C расщеплялся строго избирательно по гликозидной связи остатка *QuiNAc4NAc* при сохранении гликозидных связей производных галактозаминуриновой кислоты. Как и ожидалось, амидная связь присутствующего в этом полисахариде амида *GalNAcA* с аланином при сольволизе не затрагивались. В результате с высоким выходом образовался трисахарид **102**, соответствующий повторяющемуся звену КПС [47].

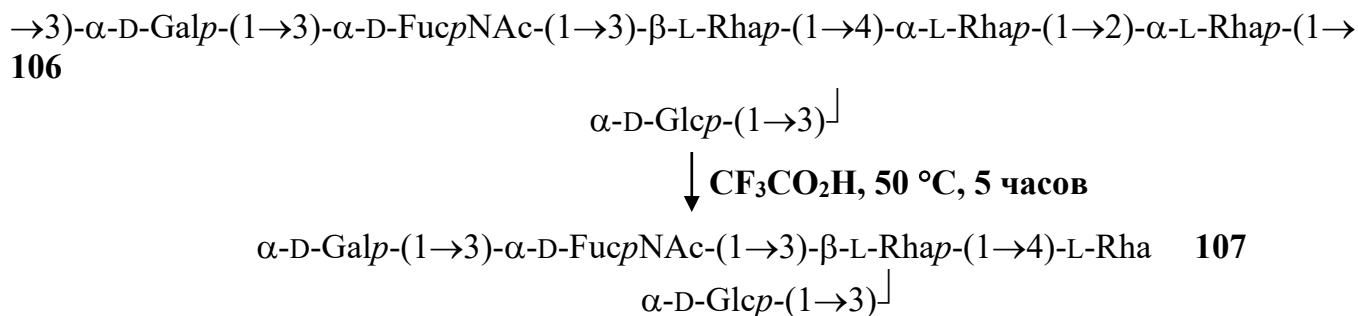


Сольволиз ОПС *E. albertii* O5 (**103**) привел к расщеплению всех связей  $\beta$ -D-*GalpNAc* и части связей  $\beta$ -D-*Gal**f* с образованием олигосахаридов **104** и **105** [12]. Интересно, что при частичном кислотном гидролизе этого ОПС, наоборот, наблюдалась расщепление всех связей  $\beta$ -D-*Gal**f* и части связей  $\beta$ -D-*GalpNA*, в

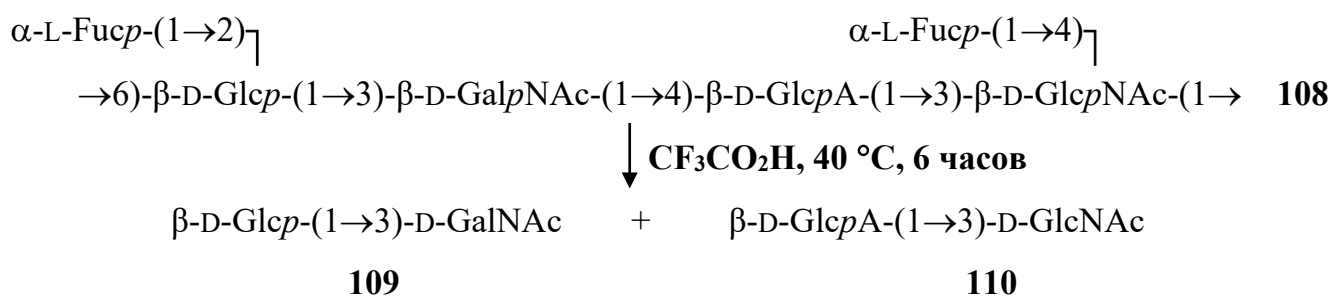
результате чего образовался тот же трисахарид **105**, но другой тетрасахарид (после О-дезацетилирования олигосахариды **53** и **52**, соответственно) (см. секцию 2.2.1).



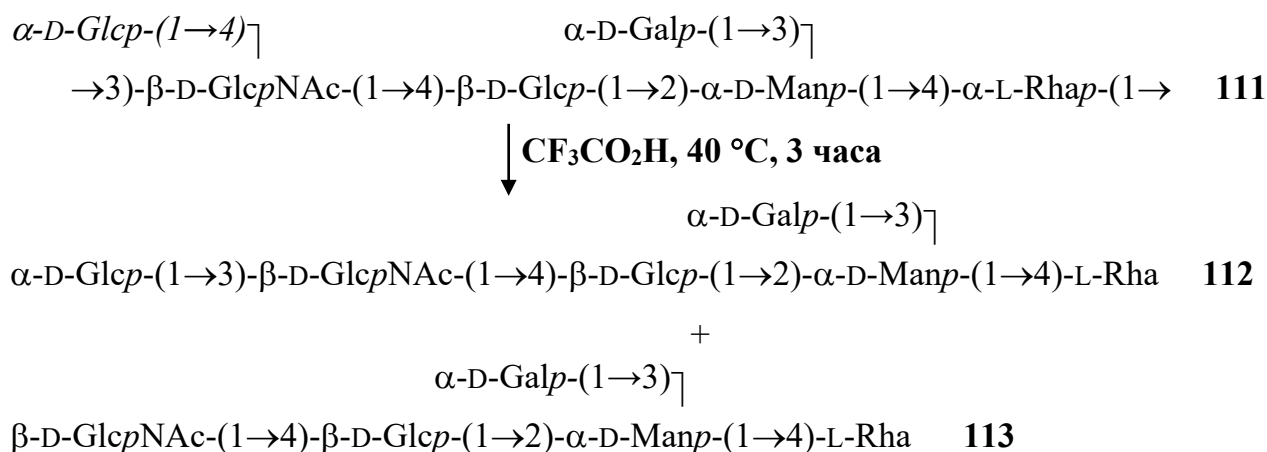
При сольволизе ОПС *E. cloacae* O3 (G3421) (**106**) наиболее легко расщеплялись  $\alpha$ -рамнопиранозидные связи, тогда как  $\beta$ -рамнопиранозидная связь была устойчива, что привело к олигосахариду (**107**) с остатком рамнозы на восстанавливающем конце [84].



Сольволиз ОПС *E. coli* O80 (G3422) (**108**) в еще более мягких условиях приводил к расщеплению связей боковых остатков  $\alpha$ -Fucp и остатков  $\beta$ -GlcpNAc и  $\beta$ -GalpNAc в основной цепи с образованием двух дисахаридов (**109**) и (**110**) [85].

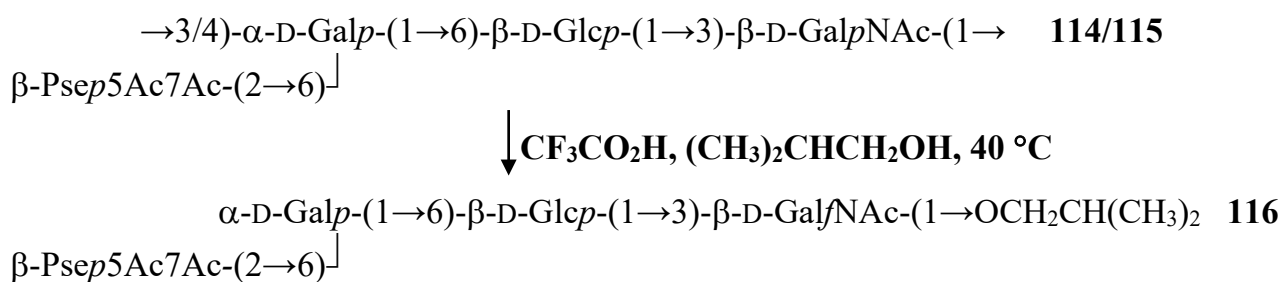


Сольволиз  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  позволил выяснить природу нерегулярности ОПС нетипированного штамма *E. coli* F17 (**111**), который избирательно расщеплялся по гликозидной связи  $\alpha\text{-Rhap}$ , тогда как связи других моносахаридов ( $\alpha\text{-}$  и  $\beta\text{-Glcp}$ ,  $\alpha\text{-Manp}$ ,  $\alpha\text{-Galp}$ ,  $\beta\text{-GlcpNAc}$ ) были устойчивы. В результате были получены гексасахарид **112** и пентасахарид **113** в соотношении  $\sim 2:1$ , соответствующие глюкозилированному и негликозилированному повторяющимся звеньям ОПС [86]. Они были разделены с помощью гель-хроматографии и идентифицированы методами двумерной спектроскопии ЯМР. Таким образом было показано, что в исходном ОПС  $\sim 70\%$  повторяющихся звеньев (выделено курсивом) содержат боковой остаток  $\alpha\text{-Glcp}$ , и следовательно, нерегулярность ОПС обусловлена нестехиометрическим глюкозилированием.

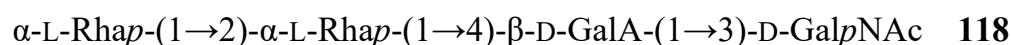
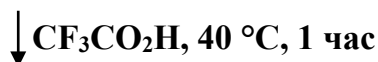
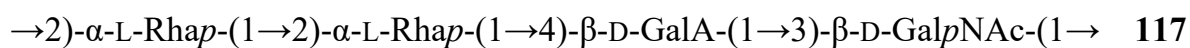


Сольволиз  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  в присутствии алифатического спирта приводит к образованию гликозидов олигосахаридов, которые благодаря гидрофобности агликона могут быть выделены и очищены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенной фазе. Так, этот метод был использован

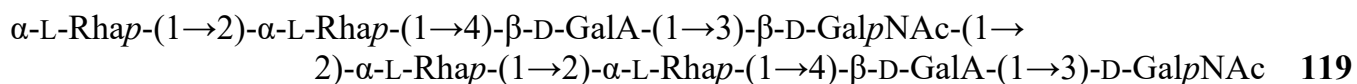
при исследовании строения КПС *Acinetobacter baumannii* VAL114, который отличался различным типом соединения повторяющихся звеньев друг с другом (1→3- или 1→4-связью, структуры **114** и **115**, соответственно). При добавлении в реакционную смесь изобутанола сольволиз этого КПС привел к изобутилгликозиду тетрасахарида **116**, являющегося продуктом избирательного расщепления гликозидной связи остатка β-GalNAc в основной цепи КПС (Н.П. Арбатский, А.С. Шашков, Ю.А. Книрель, неопубликованные данные). При этом боковой остаток производного псевдаминовой кислоты Pse5Ac7Ac, легко отщепляющийся в условиях мягкого кислотного гидролиза, при сольволизе полностью сохранялся. Интересно, что остаток GalNAc, присутствующий в КПС в пиранозной форме, в ходе сольволиза полностью превращался в β-фуранозид. Образование при сольволитическом расщеплении гликозида единственного тетрасахарида **116** позволило определить природу наблюдавшейся структурной гетерогенности КПС *A. baumannii* VAL114.



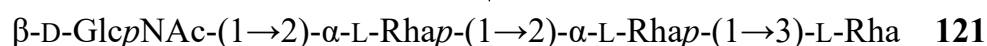
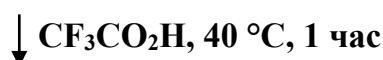
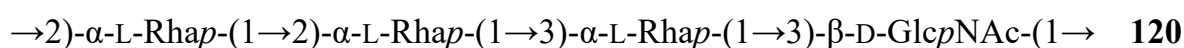
Сольволиз CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H применялся для получения олигосахаридов из ОПС возбудителей шигеллёза (бациллярной дизентерии) *Shigella flexneri* типов Y, 2a, 3a и 6 как потенциальных компонентов конъюгатных противошигеллёзных вакцин [83]. Эти ОПС содержат остатки α-L-Rhap и β-D-GlcpNAc или β-D-GalpNAc, связи которых потенциально лабильны по отношению к расщеплению CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H. В ОПС типа 6 (**117**) наименее устойчивой оказалась связь β-D-GalpNAc, которая избирательно расщеплялась в мягких условиях с образованием примерно равных количеств тетрасахарида (**118**) и октасахаридов (**119**), отвечающих мономеру и димеру повторяющегося звена, соответственно.



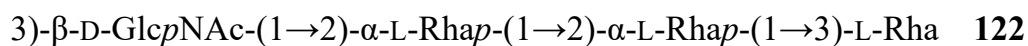
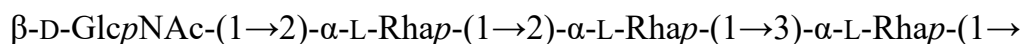
+



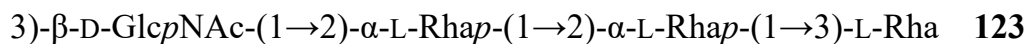
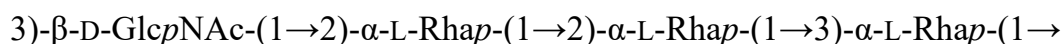
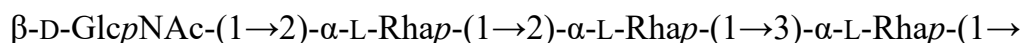
В этих же условиях ОПС *S. flexneri* типов Y и 2a преимущественно расщеплялись по связи 3-замещенного остатка  $\alpha$ -Rhap, давая мономеры, димеры и тримеры повторяющихся звеньев. При этом связи 1 $\rightarrow$ 2-связанных остатков  $\alpha$ -Rhap в этих ОПС, как и в ОПС типа 6 (117), сохранялись. Например, из ОПС типа Y (120) были получены тетрасахарид (121), октасахарид (122) и додекасахарид (123) [83].



+



+



Труднее проходил сольволиз ОПС типа 3a, очевидно из-за O-ацетилирования 3-замещенного остатка  $\alpha$ -L-Rhap в положение 2 [83]. Из него удалось получить только смесь олигосахаридов выше тримера, а ужесточение условий сольволиза приводило к заметному неспецифическому расщеплению других гликозидных связей.



\* \* \*

Таким образом, хотя в большинстве случаев неспецифические методы, используемые для расщепления гликозидных связей, демонстрируют меньшую избирательность по сравнению со специфическими методами, они широко применяются в структурном анализе углеводов. Не предъявляя определенных требований к составу и строению полисахаридов, они чувствительны к их тонким структурным особенностям, вплоть до различий в конфигурациях и положениях замещения моносахаридных остатков. Варьирование условий реакции позволяет проводить направленное сольволитическое (в том числе гидролитические) расщепление.

Сольволиз безводными реагентами не вызывает разрушения кислотолабильных моносахаридов, гликозидный центр которых высвобождается при расщеплении гликозидной связи. При этом сохраняются амидные связи, что открывает доступ к N-ацелированным аminosахарам и амидам гексуроновых кислот в виде мономеров или в составе олигосахаридных фрагментов. Благодаря этим преимуществам избирательный сольволиз находит широкое применение в структурном анализе и может быть использован также для получения из бактериальных полисахаридов компонентов диагностических препаратов и вакцин.

Выявлен ряд закономерностей расщепления гликозидных связей при проведении частичного кислотного гидролиза, ацетолиза и сольволиза фтористоводородной, трифторуксусной и трифторметансульфоновой кислотами. Наиболее эффективное избирательное расщепление достигается в случае присутствия в полисахариде гликозидных связей, обладающих существенно большей устойчивостью (например, связи гексуроновых кислот и гексозаминов со свободной аминогруппой) или, наоборот, большей лабильностью (связи 3,6-дидезоксигексоз, моносахаридов в фуранозной форме, N-ацелированных  $\beta$ -гексозаминов) по сравнению с другими гликозидными связями. Связи 3-деоксиальдулозоновых кислот при действии различных реагентов ведут себя по-разному: они легко расщепляются при мягком кислотном гидролизе, но устойчивы по отношению к сольволизу безводными кислотами.

Полученные данные позволяют выбрать наиболее подходящий реагент и предсказать направление расщепления полисахарида в каждом конкретном случае. Использование одного из двух реагентов с различной сольволитической активностью – трифторметансульфоновой или трифторуксусной кислоты – позволяет получать олигосахаридные фрагменты практически любого гетерополисахарида, содержащего моносахариды как с высокоустойчивыми, так и высоколабильными гликозидными связями, соответственно. Действительно, эти реагенты эффективны при анализе полисахаридов как с высокоустойчивыми гликозидными связями ( $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ ), так и со связями, менее устойчивыми, чем связи гексуроновых кислот и N-ацилгексозаминов ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ ).

В заключение остановимся на вопросе о выходах продуктов реакций, используемых для избирательного расщепления гликозидных связей. Хотя эти реакции приводят к полной деполимеризации исследуемых полисахаридов, выходы целевых продуктов часто невысокие. Кроме потерь при выделении олигосахаридов (обычно с помощью гель-проникающей хроматографии, иногда с последующей высокоэффективной жидкостной хроматографией), которые могут достигать 50%, причиной низких выходов может являться неоднозначное протекание реакции.

Так, распад по Смиту может осложняться переацеталированием и неполнотой гидролиза гликозидной связи окисленного моносахарида (секция 2.1.4), а дефосфорилирование фтористоводородной кислотой и мягкий кислотный гидролиз гликозилфосфатных связей – гидролитическим расщеплением кислотолабильных гликозидных связей (секция 2.1.4). По двум путям протекает дезаминирование 2-аминосахаров (секция 2.1.1), однако в этом случае образующиеся олигосахариды содержат взаимодополняющую информацию о структуре исходного полисахарида и, таким образом, оба могут рассматриваться как целевые продукты. Щелочное  $\beta$ -элиминирование в амидах гексуроновых кислот приводит к одному или нескольким продуктам в зависимости от того, является амидирование стехиометрическим или нет (секция 2.1.2).

При использовании неспецифических методов избирательного расщепления высокие выходы наблюдаются в тех случаях, когда гликозидные связи одних

моносахаридов полностью расщепляются в условиях, в которых связи остальных моносахаридных компонентов полностью устойчивы. Например, строго избирательно протекает гидролитическое расщепление гликозидных связей производных 3-дезоксинулозоновых кислот (секция 2.2.1). При преимущественном расщеплении гликозидных связей определенных моносахаридов образуются более или менее сложные смеси олигосахаридов, а иногда и моносахаридов. Так, при частичном сольволизе трифторуксусной кислотой выходы индивидуальных олигосахаридов в большинстве случаев не превышают 30%, а иногда не достигают и 10% [83].

Оптимальные условия расщепления могут быть подобраны путем анализа образующихся смесей с помощью масс-спектрометрии, а строение выделенных олигосахаридов может быть установлено современными высокочувствительными методами двумерной спектроскопии ЯМР даже в тех случаях, когда их количество не превышает 1 мг.

Таким образом, в аналитической химии высокие выходы целевых продуктов реакций не столь важны, как в синтетической химии, хотя и являются желательными, так как позволяют упростить выделение продуктов и снизить количество вещества, требуемое для анализа. Важно лишь быть уверенным, что полученный олигосахарид (или олигосахариды) соответствует повторяющемуся звену исследуемого полимера или образовался из него, а не из неповторяющейся олигосахаридной области, которая может быть присоединена к тому или иному концу бактериального полисахарида. Это можно установить сравнением спектров ЯМР исходного полисахарида и выделенного олигосахаридного продукта.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

#### 3.1. Установление строения О-полисахаридов *Escherichia albertii*

Общий подход для установления строения даже самых сложных структур ОПС заключается в сочетании химических методов анализа компонентного анализа и спектроскопии ЯМР. О-полисахариды получали путем мягкого кислотного гидролиза ЛПС и выделяли гель-проникающей хроматографией на геле Sephadex G-50. Основным подходом к установлению строения ОПС являлась одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР при использовании методов селективного расщепления.

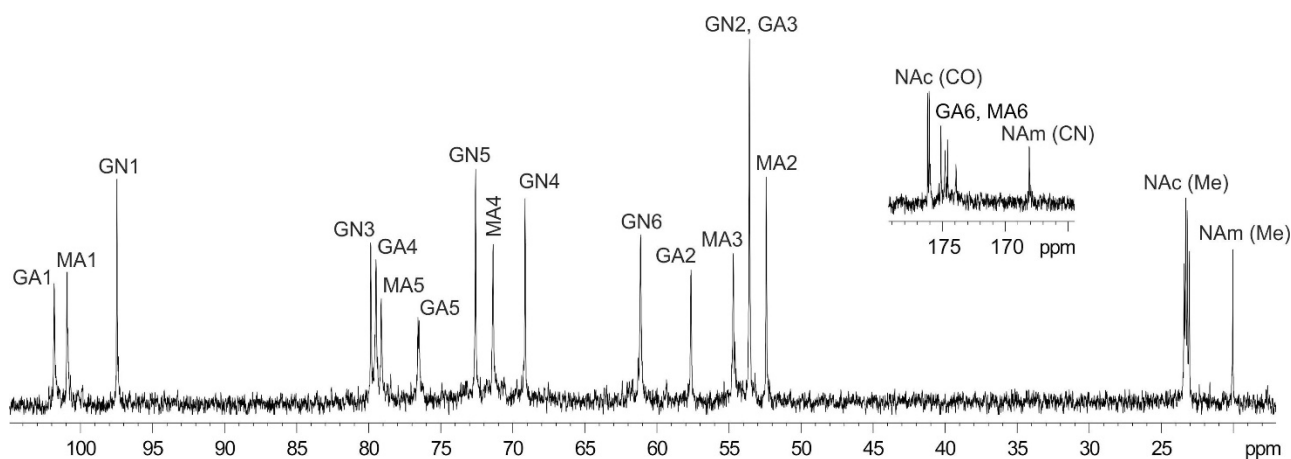
В некоторых случаях применялись химические модификации ОПС, такие как О-дезацетилирование и дефосфорилирование, которые способствовали более надежной интерпретации ЯМР-спектров. В ряде случаев проводили избирательное расщепление ОПС (включая деградацию по Смитсу и сольволиз безводными органическими кислотами), продукты расщепления выделяли распределительной хроматографией на колонке с гелем TSK HW-40, их строение устанавливали методами одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР и подтверждали определением молекулярной массы с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (МС ВР ИЭР).

##### 3.1.1. О-полисахарид *E. albertii* O1

Штаммы типа O1 преобладали среди 52 типированных изолятов *E. albertii*, выделенных в Китае в 2014-2016 гг.

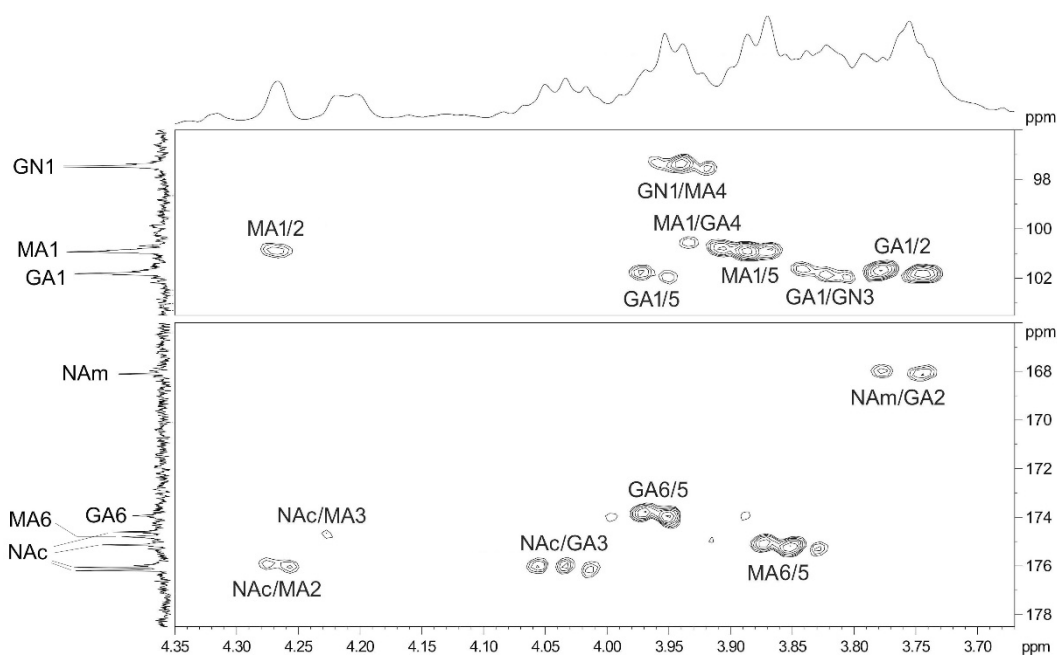
В отличие от других изученных ОПС анализ моносахаридного состава ОПС этого типа методом полного кислотного гидролиза не проводился. Это объяснялось высокой устойчивостью к кислотному расщеплению гликозидных связей производных 2,3-диамино-2,3-дидезоксиуроновых кислот, являющихся двумя из трех компонентов О-звена. Вследствие этого моносахариды не могли быть выделены в свободном виде для последующей дериватизации и идентификации методом ГЖХ, и моносахаридный состав ОПС устанавливали с помощью одномерной и двумерной спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР и на основании генетических данных (раздел 3.2.1).

В спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ОПС (рис. 3.1) присутствовали сигналы трех аномерных атомов (H-1 при  $\delta_{\text{H}}$  4,69, 4,77 и 5,05; C-1 при  $\delta_{\text{C}}$  97,5, 100,9 и 101,8), пять атомов углерода, связанных с азотом, при  $\delta_{\text{C}}$  52,4-57,6, четырех N-ацетильных групп (NAc) ( $\delta_{\text{H}}$  1,86-2,04;  $\delta_{\text{C}}$  23,0-23,4 для Me-групп и 174,6-176,2 для CO-групп) и одной N-ацетимидоильной группы (NAm) ( $\delta_{\text{H}}$  2,19;  $\delta_{\text{C}}$  20,0 для Me-группы и 168,1 для C=N). Таким образом, ОПС имеет трисахаридное O-звено, включающее в основном N-ацетилированные аминоксахара, и один из аминоксахаров несет NAm-группу.



**Рис. 3.1.** Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ОПС *E. albertii* O1. Цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных следующим образом: GN – GlcNAc, GA – GlcNAc3NAcA, MA – ManNAc3NAcA.

Анализ двумерных спектров ЯМР подтвердил присутствие трех моносахаридных остатка (их химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  приведены в Приложении в таблице П1). Они были идентифицированы как N-ацильные производные GlcN и 2,3-диамино-2,3-дидезоксигексуриновых кислот GlcN3NA и ManN3NA на основе а) констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\text{H,H}}$ , позволяющих определить конфигурацию моносахарида; б) корреляции между протонами при атомах углерода, связанных с азотом, и соответствующими атомами углерода при  $\delta_{\text{C}}$  52,4-57,6 в спектре  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC; и в) корреляции между H-5 и C-6 ( $\text{CO}_2\text{H}$ ) производных гексуриновых кислот GlcN3NA и ManN3NA в спектре  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC (рис. 3.2). Корреляция между C=N (C-1 NAm) и H-2 GlcN3NA в том же спектре определяла положение NAm-группы при N-2 остатка GlcN3NA. Следовательно, все другие аминогруппы аминоксахаров N-ацетилированы.



**Рис. 3.2.** Области двумерного спектра  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  НМВС ОПС *E. albertii* O1. Соответствующие фрагменты спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей, соответственно. Обозначения до и после косой черты относятся к атомам углерода и протонам, соответственно, в моносахаридных остатках GlcNAc (GN), GlcNAc3NA (GA) и ManNAc3NA (MA).

Положения замещения моносахаридов определяли по положению в слабом поле сигналов связевых атомов углерода C-3 GlcN, C-4 GlcN3NA и C-4 ManN3NA в ОПС по сравнению с их положением в соответствующих незамещенных моносахаридах. Последовательность моносахаридов в О-звене была определена по данным спектра  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  НМВС (рис. 3.2), который показал корреляции между C-1 GlcN и H-4 ManN3NA, C-1 ManN3NA и H-4 GlcN3NA, C-1 GlcN3NA и H-3 GlcN.

Для подтверждения установленной структуры было проведено избирательное сольволитическое расщепление ОПС. Ожидалось, что оно пройдет по гликозидной связи остатка GlcNAc, менее устойчивой по сравнению со связями производных диаминогексуриновых кислот. Однако, при действии  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  – широкоприменяемого в последнее время сольволитического реагента [20] (секция 2.2.3.3 раздела ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР) – при  $70\text{ }^\circ\text{C}$  расщепления на олигосахаридные фрагменты не наблюдалось, а при  $100\text{ }^\circ\text{C}$  происходила

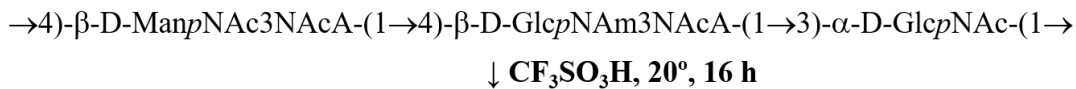
деполимеризация, но строение образовавшихся продуктов установить не удалось из-за неспецифической дегградации сахаров.

Удачным оказалось применение другого сольволитического реагента –  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  (секция 2.2.3.2 раздела ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР), введенного в лаборатории в практику структурного анализа углеводов ранее [20]. В результате его действия на ОПС при 20 °С образовался единственный продукт – трисахарид **1** (рис. 3.3). Его строение было установлено с помощью спектроскопии ЯМР, как описано выше для ОПС (отнесенные химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  приведены в Приложении в таблице П1). Оно было подтверждено также методом МС ВР ИЭР с регистрацией отрицательных ионов: масс-спектр содержал пик иона  $[\text{M}-\text{H}]^-$  при  $m/z$  735,2698 (рассчитанная величина  $m/z$  735,2690).

Восстанавливающий конец трисахаарида **1** занимает остаток GlcNAc, присутствующий в  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномерных формах. Таким образом, ОПС при действии  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  избирательно расщепился по гликозидным связям этого остатка. На невосстанавливаемом конце находится остаток  $\beta$ -D-ManpNAc3NAcA, что следовало из смещения сигнала C4 в слабое поле от 67,9 м.д. в незамещенном остатке  $\beta$ -D-ManpNAc3NAcA в **1** к 71,4 м.д. в 4-замещенном остатке в ОПС (эффект гликозилирования). Характер замещения остатка  $\beta$ -D-GlcpNAc3NAcA при переходе от **1** к ОПС не изменился (Приложение, таблица П1). Полученные данные подтверждают последовательность моносахаридных остатков в ОПС.

Таким образом, ОПС *E. albertii* O1 имеет структуру, приведенную на рис. 3.3. Несмотря на уникальность строения, ОПС *E. albertii* O1 близок по структуре ОПС нескольких родственных друг другу серотипов другого вида патогенных бактерий, а именно *Pseudomonas aeruginosa* вместо D-GlcNAc у *E. albertii*, конфигурацией одной или (у некоторых типов *P. aeruginosa*) обеих 2,3-диамино-2,3-дидезоксигексуроновых кислот и положением NAm-группы.

*Escherichia albertii* O1



*Pseudomonas aeruginosa* O5



**Рис. 3.3.** Расщепление ОПС *E. albertii* O1 сольволизом  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  и строение структурно родственного О-полисахарида *Pseudomonas aeruginosa* O5.

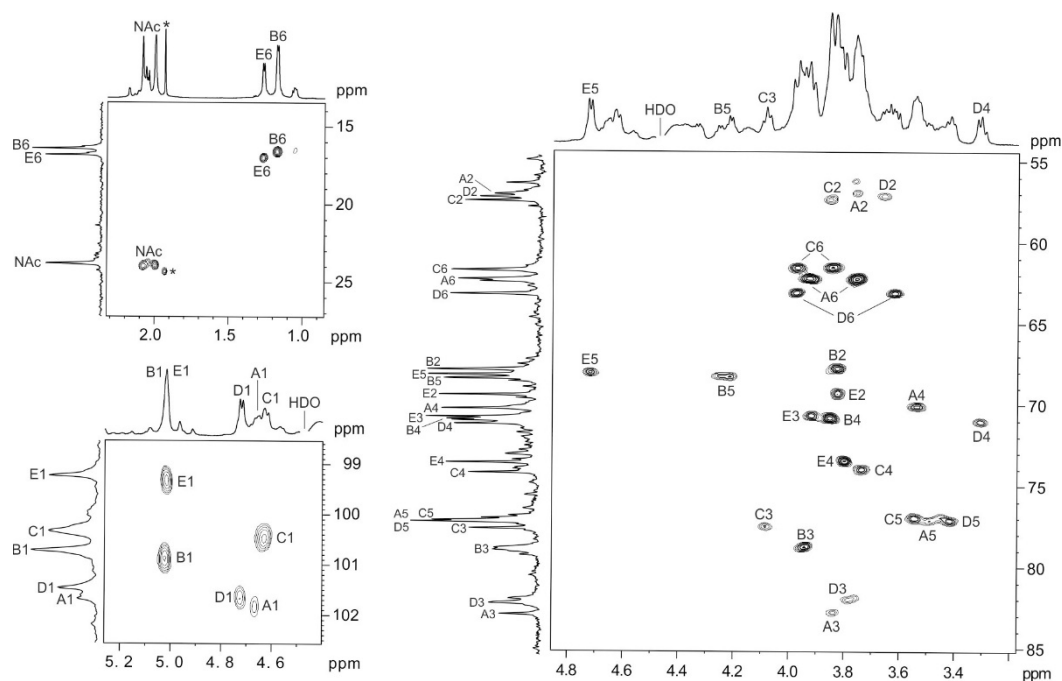
### 3.1.2. О-полисахарид *E. albertii* O2

Спектры ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  показали нерегулярность ОПС, по-видимому, вследствие нестехиометрического О-ацетилирования (присутствовали сигналы О-ацетильных групп при  $\delta_{\text{H}}$  2,16-2,17). Однако О-деацетилирование ОПС действием  $\text{NH}_4\text{OH}$  устранило гетерогенность только частично. Спектры ЯМР полученного О-деацетилированного полисахарида (ДПС) (рис. 3.4; Приложение, таблица П2) показали наличие двух остатков фукозы (**В** и **Е**) с соотношением интегральных интенсивностей сигналов Н-6 ( $\text{CH}_3$ )  $\sim 1,5:1$ , соответственно. На основании этого было сделано предположение, что остаток **Е** присутствует как боковая цепь в большинстве, но не во всех О-звеньях.

Чтобы подтвердить такую причину нерегулярности, ОПС подвергли деградации по Смитту, включавшую окисление перйодатом, восстановление боргидридом и мягкий кислотный гидролиз. Полученный модифицированный полисахарид (МПС) О-деацетилировали. Моносахаридный анализ методом ГЖХ ацетатов полиолов показал снижение содержания фукозы (соотношение **Фус** и **ГлсNAc** в МПС составило  $\sim 1:4$  по сравнению с  $\sim 1:1,4$  в ДПС). Анализ МПС с помощью двумерной спектроскопии ЯМР был проведен аналогично анализу ОПС *E. albertii* O1, описанному в разделе 3.1.1 (отнесенные химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  МПС приведены в Приложении в таблице П2). Он позволил установить структуру



МПС (рис. 3.5), являющегося линейным полимером с тетрасахаридным O-звеном, которое содержит три остатка  $\beta$ -GlcNAc (A, C и D) и один остаток  $\alpha$ -Fucp (B).



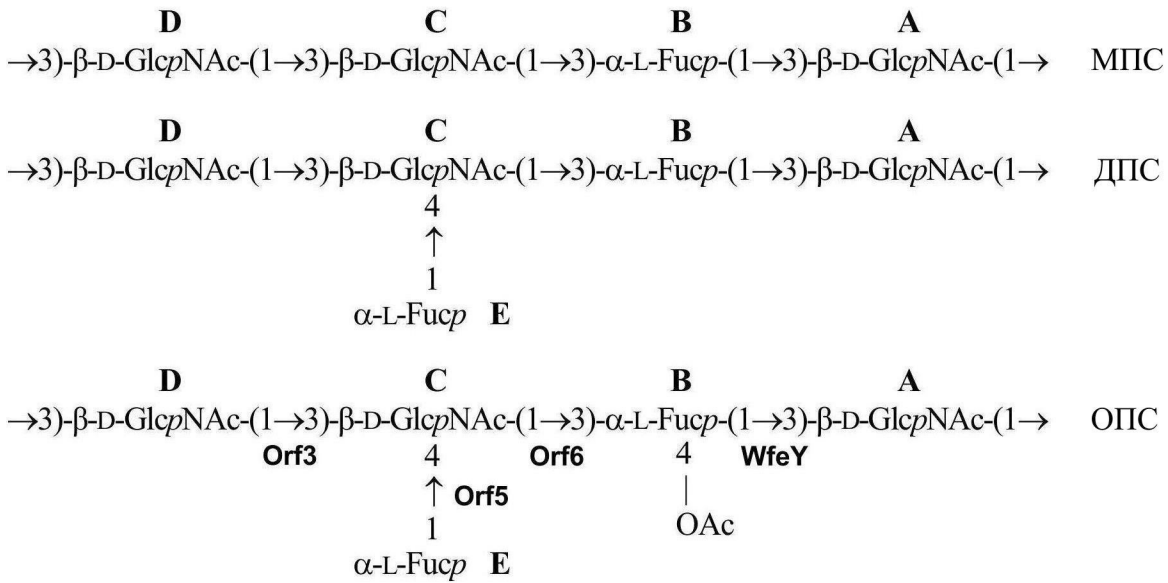
**Рис. 3.4.** Фрагменты спектра  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC ДПС из *E. albertii* O2. Соответствующие части спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей, соответственно. Арабские цифры относятся к парам Н/С в моносахаридных остатках, обозначенных буквами, как указано на рис. 3.5 и в Приложении в таблице П2.

С использованием данных, полученных для МПС, был проведен ЯМР-спектроскопический анализ ДПС (его двумерный спектр  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC показан на рис. 3.4; отнесенные химические сдвиги для доминирующего O-звена, содержащего остаток  $\alpha$ -Fucp E, приведены в Приложении в таблице П2). Как и ожидалось, ДПС оказался разветвленным полимером с остатком фукозы E в боковой цепи. Положение этого остатка было определено на основании корреляций  $\alpha$ -Fuc E H-1/ $\beta$ -GlcNAc C H-4 при  $\delta$  5,01/3,73 в двумерном спектре  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY, а также  $\alpha$ -Fuc E C-1/ $\beta$ -GlcNAc C H-4 и  $\alpha$ -Fuc E H-1/ $\beta$ -GlcNAc C C-4 при  $\delta$  99,3/3,73 и 5,01/74,0, соответственно, в двумерном спектре  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC. Таким образом, ДПС имеет структуру, показанную на рис. 3.5.

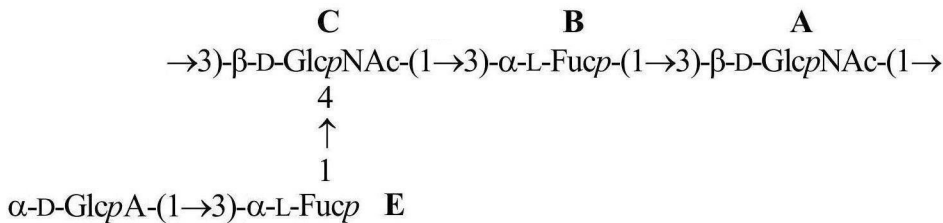
Сравнение спектров  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC ДПС и ОПС показало смещение в слабое поле большей части корреляционного пика Н-4/С-4 остатка  $\alpha$ -Fuc **В** от  $\delta$  3,85/70,8 к  $\delta$  5,26/72,9, соответственно. Это смещение, вызванное дезэкранирующим эффектом О-ацетильной группы, указывало на О-ацетилирование остатка  $\alpha$ -Fuc **В** в положение 4. Этот вывод подтверждался смещением в сильное поле сигналов соседних атомов углерода С-3 и С-5 от  $\delta$  78,6 и 68,3 к  $\delta$  76,2 и 67,3, соответственно ( $\beta$ -эффект О-ацетилирования). Судя по соотношению интегральных интенсивностей сигналов О-ацетильных групп при  $\delta_{\text{H}}$  2,16-2,17 и сигнала  $\text{CH}_3$  (Н-6)  $\alpha$ -Fuc **В** при  $\delta_{\text{H}}$  1,26, степень 4-О-ацетилирования остатка  $\alpha$ -Fuc **В** составляла  $\sim 70\%$ .

На основании полученных данных был сделан вывод о том, что ОПС *E. albertii* O2 имеет структуру, показанную на рис. 3.5. ОПС лишен строгой регулярности, поскольку О-ацетилирование и L-фукозилирование являются нестехиометрическими (степень каждой модификации составляет  $\sim 70\%$ ). Хотя установленная структура ОПС *E. albertii* O2 является уникальной, его О-звено включает тетрасахаридный фрагмент **Е**→**С**→**В**→**А**, который присутствует также в О-звене другой энтеробактерии – *Providencia alcalifaciens* O28 (рис. 3.5) [88].

*Escherichia albertii* O2

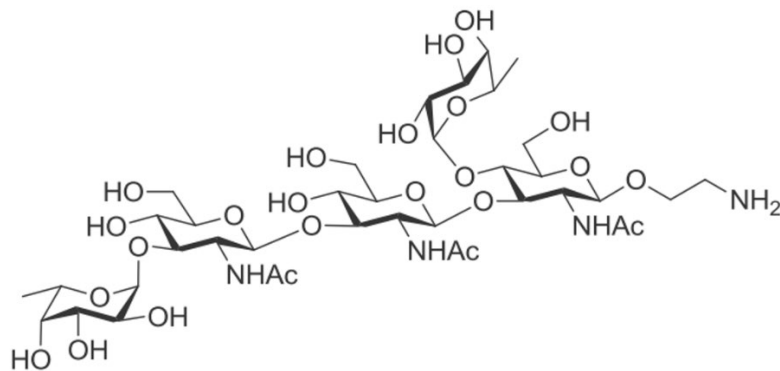


*Providencia alcalifaciens* O28



**Рис. 3.5.** Структуры полисахаридов из *E. albertii* O2 и родственного O-полисахарида *Providencia alcalifaciens* O28. Степень L-фукозилирования звеном **E** и степень O-ацетилирования в ОПС *E. albertii* O2 составляют ~ 70%. Гликозилтрансферазы обозначены рядом со связями, к которым они относятся.

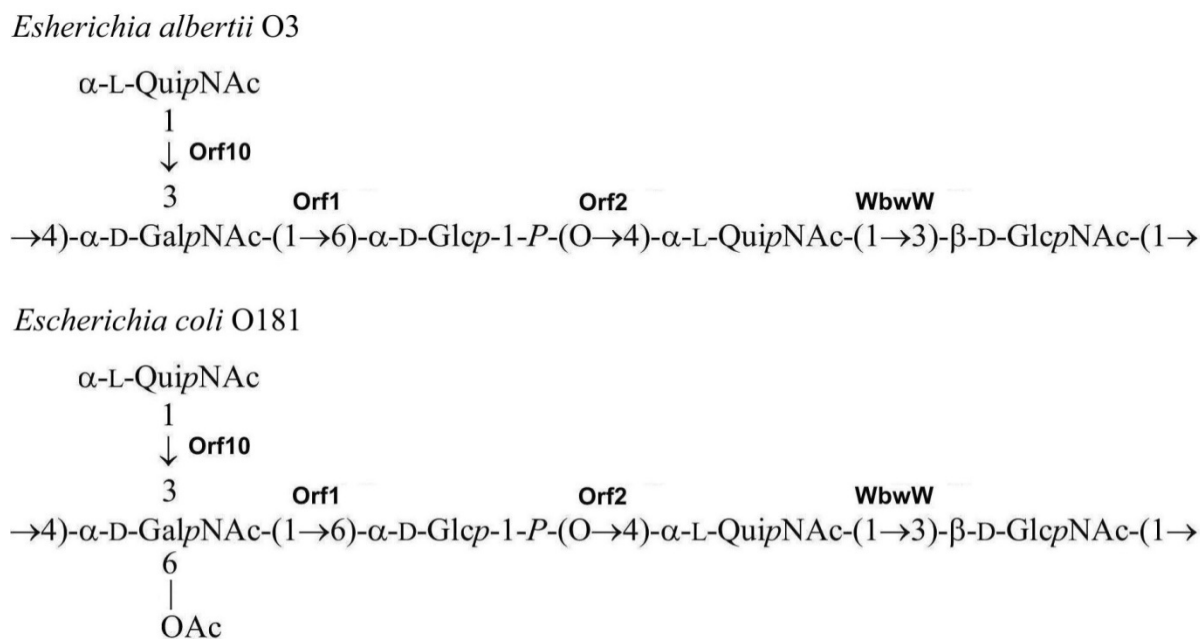
Индийские ученые осуществили химический синтез 2-аминоэтилгликозида пентасахарида, соответствующего повторяющемуся звену ОПС *E. albertii* O2, являющегося потенциальным компонентом конъюгатной вакцины [89].



**Рис. 3.51.** Структура синтезированного 2-аминоэтилгликозида со спейсером, соответствующий повторяющемуся звену ОПС *E. albertii* O2. [89]

### 3.1.3. О-полисахарид *E. albertii* O3, близкородственный О-полисахариду *E. coli* O181

Анализ с помощью спектроскопии ЯМР показал, что структура ОПС *E. albertii* O3 идентична известной структуре ОПС *E. coli* O181 [90] за исключением того, что в ОПС *E. coli* остаток D-GalNAc О-ацетилирован в положении 6, тогда как в ОПС *E. albertii* О-ацетильные группы отсутствуют (рис. 3.6). ОПС имеет разветвленное пентасахаридное О-звено, особенностью которого является присутствие фосфатной группы в основной цепи. Специфическим компонентом ОПС *E. albertii* O3 является L-QuiNAc; в ОПС входят два остатка этого моносахарида – один в основной цепи и другой в моносахаридной боковой цепи.

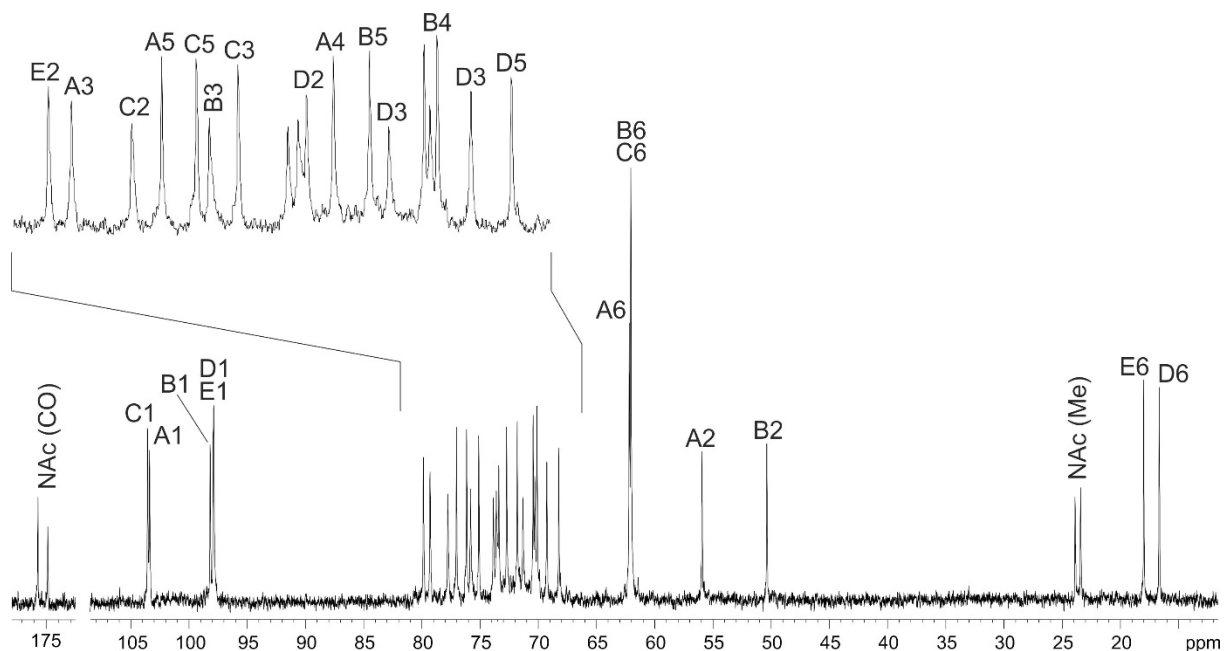


**Рис. 3.6.** Строение близкородственных О-полисахаридов *E. albertii* O3 и *Escherichia coli* O181. Гликозилтрансферазы обозначены рядом со связями, к которым они относятся.

### 3.1.4. О-полисахарид *E. albertii* O4

Анализ методом ГЖХ ацетатов полиолов, полученных после полного кислотного гидролиза ОПС *E. albertii* O4, показал присутствие пяти различных моносахаридов: Rha, Fuc, Gal, GlcNAc и GalNAc.

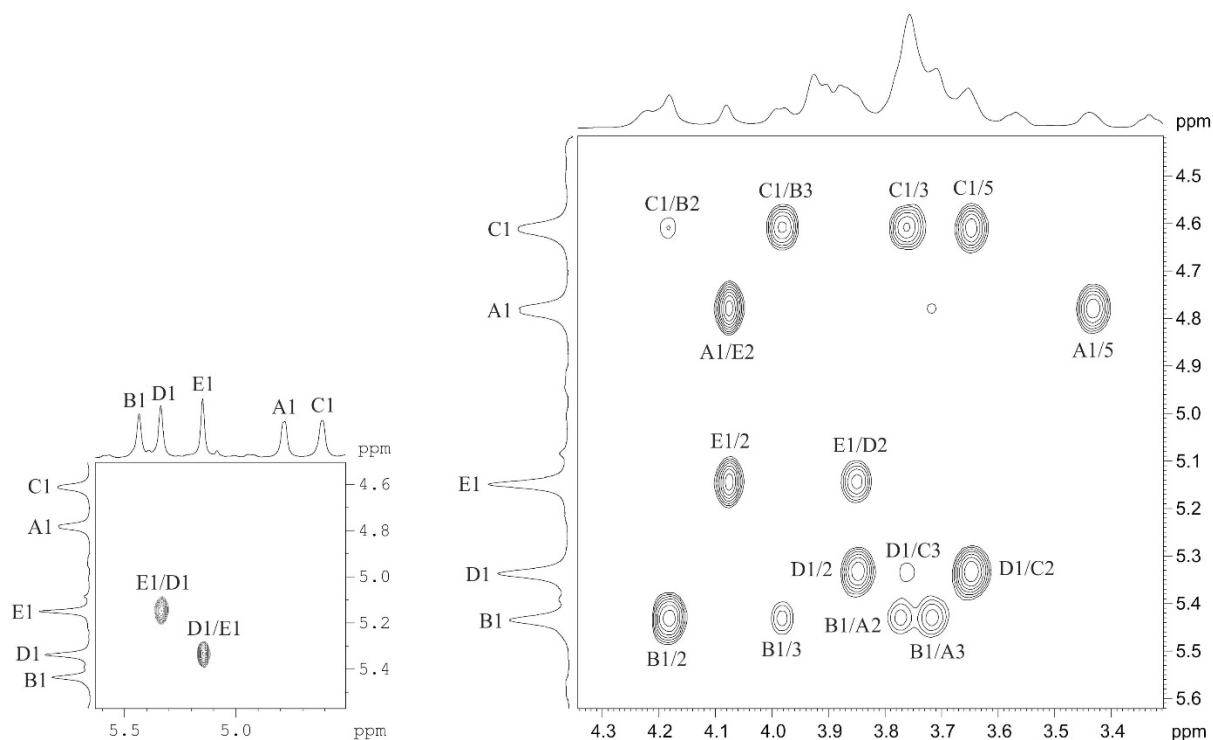
Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ОПС *E. albertii* O4 (рис. 3.7) содержали сигналы пяти моносахаридных остатков (H-1 при  $\delta_{\text{H}}$  4,61-5,43 и C-1 при  $\delta_{\text{C}}$  97,7-103,5), включая две 6-дезоксигексозы (Fuc и Rha, H-6 при  $\delta_{\text{H}}$  1,19 и 1,25, C-6 при  $\delta_{\text{C}}$  16,6 и 18,0) и два N-ацетилгексозамина (GlcNAc и GalNAc, атом C-2, связанный с азотом, при  $\delta_{\text{C}}$  55,9 и 50,3).



**Рис. 3.7.** Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ОПС *E. albertii* O4. Цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных буквами, как показано на рис 3.4 и в Приложении в таблице ПЗ.

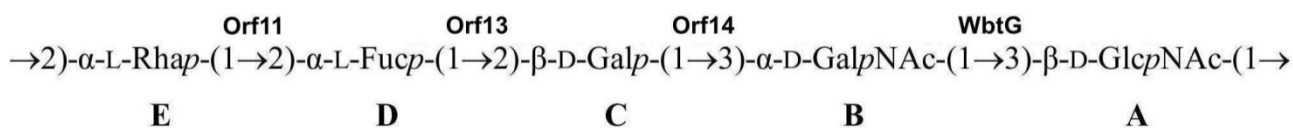
Спектры ЯМР ОПС были расшифрованы с использованием двумерных экспериментов и были идентифицированы пять моносахаридных остатков (Приложение, таблица ПЗ), которые соответствовали моносахаридам, обнаруженным при анализе ОПС методом ГЖХ ацетилированных полиолов (см. выше). Положения замещения моносахаридных остатков определяли по смещению в слабое поле сигналов связевых атомов углерода (Приложение, таблица ПЗ) по сравнению с их положением в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  соответствующих незамещенных моносахаридов. Анализ связей и последовательности моносахаридов в ОПС был проведен с использованием двумерных экспериментов  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  ROESY (рис. 3.8) и  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC. Он выявил корреляции между аномерными атомами (протонами и атомами углерода)

и трансгликозидными атомами (атомами углерода соседних моносахаридных остатков, участвующими в образовании гликозидных связей, и протонами при них).



**Рис. 3.8.** Фрагменты двумерного спектра  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY О-полисахарида *E. albertii* О4. Соответствующие части спектра ЯМР  $^1\text{H}$  показаны вдоль осей. Цифры относятся к протонам в остатках моносахаридов, обозначенных буквами, как показано ниже и в Приложении в таблице П3.

В результате была установлена следующая структура О-звена ОПС *E. albertii* О4:



Эта структура была подтверждена сольволитическим расщеплением  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  и установлением строения образовавшихся олигосахаридов. На основании литературных данных [20] (секция 2.2.3.3 раздела ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР) ожидалось, что три гликозидные связи в пентасахаридном О-звене, образованные моносахаридами  $\alpha\text{-Rhap}$  **E**,  $\alpha\text{-Fucp}$  **D** и  $\beta\text{-GlcpNAc}$  **A**, будут лабильными по отношению к действию  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ .

Сольволиз ОПС безводной  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  при  $50^\circ\text{C}$  в течение 4 часов привел к частичному расщеплению лабильных гликозидных связей и образованию нескольких продуктов (фракции I-V), которые были разделены хроматографией на геле Fractogel TSK-HW 40S. По данным  $^1\text{H}$  ЯМР и МС ВР ИЭР фракция V являлась смесью рамнозы и фукозы, фракции I и II представляли собой большие (крупнее пентасахарида) фрагменты ОПС, а фракции III (основная) и IV представляли собой неразделившиеся смеси олигосахаридов **2-4**, включая пентасахарид **4**, соответствующий O-звену ОПС (рис. 3.9).

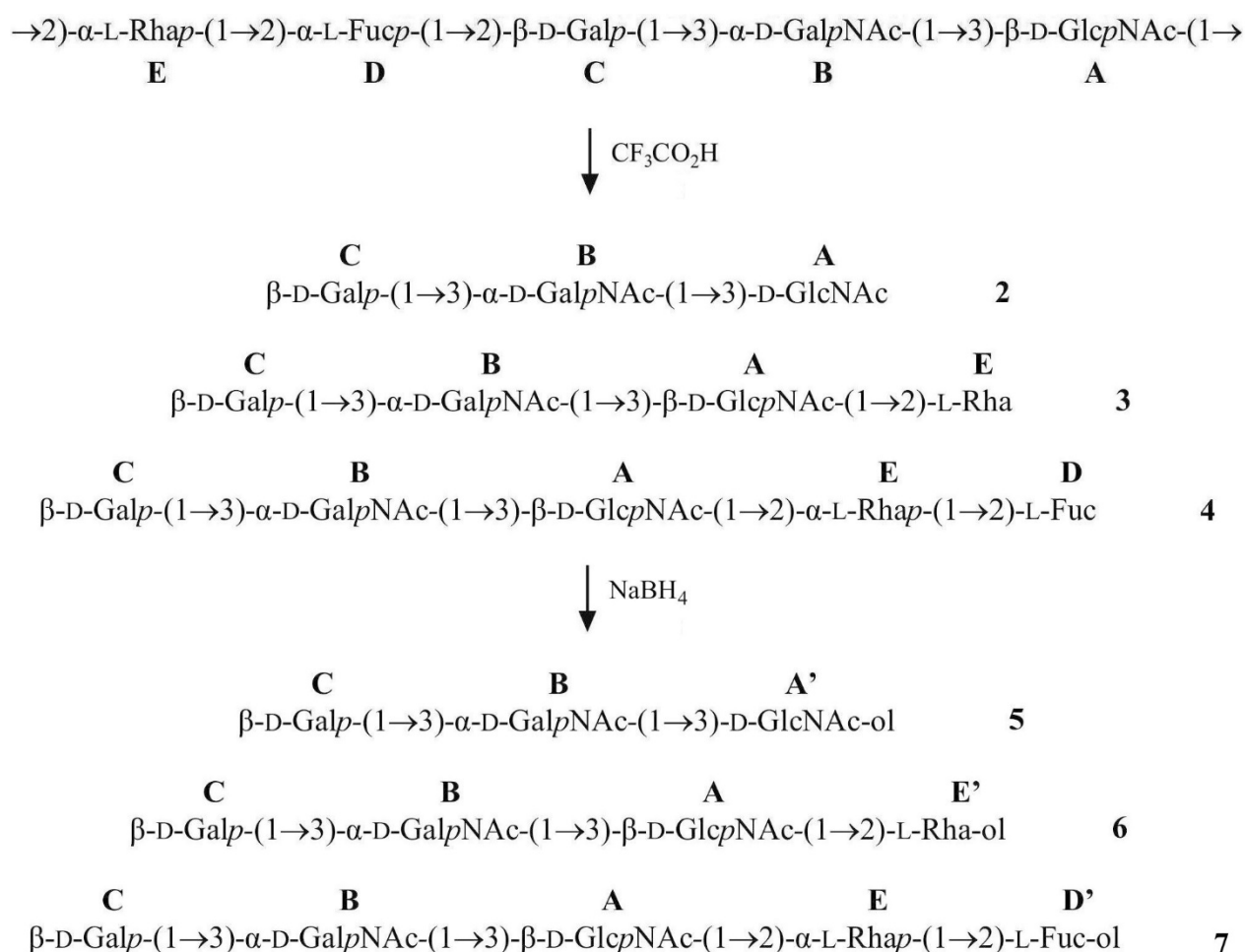
Известно, что восстановленные олигосахариды (олигозилполиолы), могут быть более эффективно разделены хроматографически, чем соответствующие олигосахариды, у которых моносахарид на восстанавливаемом конце находится в виде  $\alpha$ - и  $\beta$ -пиранозных форм, легко переходящих друг в друга в ходе разделения, а для некоторых сахаров также и в виде фуранозных форм. В связи с этим фракция III была восстановлена  $\text{NaBH}_4$  по альдегидной группе моносахаридов, находящихся на восстанавливаемом конце олигосахаридов. Образовавшаяся смесь олигозилполиолов была разделена гель-хроматографией на том же носителе Fractogel TSK-HW 40S, и были получены три фракции III-1–III-3, которые исследовали с помощью спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР (Приложение, таблица П3) и МС ВР ИЭР (Приложение, таблица П4).

Доминирующая фракция III-1 представляла собой олигозилполиол **7**, образовавшийся при восстановлении пентасахарида **4**. Фракция III-3 содержала в основном олигозилполиол **5** (из трисахарида **2**) с примесью (~25%) олигозилполиола **6** (из тетрасахарида **3**), а промежуточная фракция III-2 являлась смесью примерно равных количеств олигозилполиолов **6** и **7**. Строение олигозилполиолов **5-7**, приведенное на рис. 3.9, установлено с помощью двумерной спектроскопии ЯМР, как описано для исходного ОПС (в таблице П3 приведены отнесенные химические сдвиги  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР основных олигосахаридов **5** и **7**).

На невосстанавливаемом конце всех олигосахаридов и олигозилполиолов находился остаток  $\beta$ -галактопиранозы (C), а на другом конце – моносахарид в виде  $\alpha$ -

и  $\beta$ -пиранозных форм (GlcNAc **A**, Rha **E** или Fuc **D** в **2-4**) или полиол (N-ацетилглюкозаминитол **A'**, рамнитол **E'** или фуцитол **D'** в **5-7**), образовавшийся при боргидридном восстановлении соответствующего моносахарида.

Таким образом, наиболее лабильной является гликозидная связь остатка  $\alpha$ -Fuc **D**, при избирательном расщеплении которой образуется основной продукт сольволиза – пентасахарид **4**. Олигосахариды **3** и **2** являются продуктами последующего расщепления двух других лабильных гликозидных связей остатков  $\alpha$ -Rha **E** и  $\beta$ -GlcNAc **A** (соотношение олигосахаридов **4** : **3** : **2**  $\sim$  2 : 0,9 : 1, соответственно).

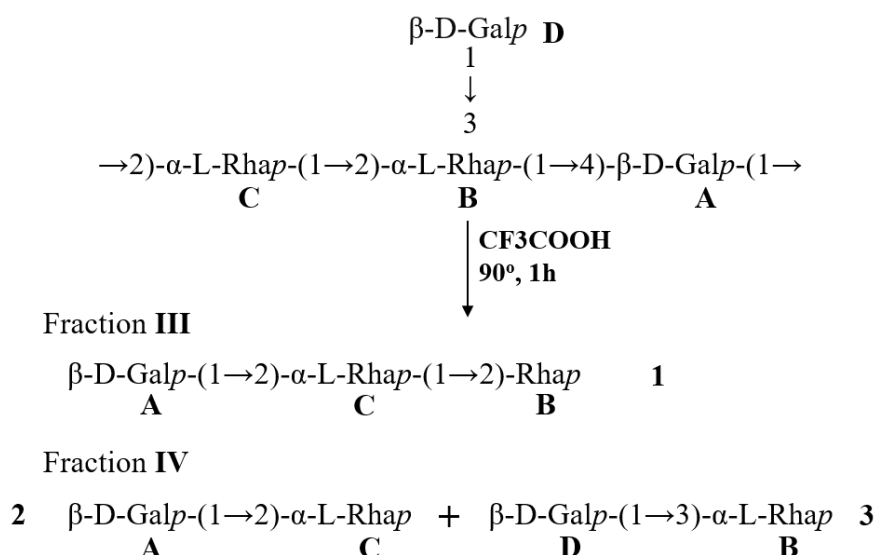


**Рис. 3.9.** Сольволитическое расщепление действием  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  О-полисахарида *E. albertii* O4 и последующее боргидридное восстановление полученных олигосахаридов **2-4** в олигозилполиолы **5-7**. GlcNAc-ol, Rha-ol и Fuc-ol обозначают N-ацетилглюкозаминитол, рамнитол и фуцитол, соответственно.



Аналогичные результаты были получены в случае сольволиза трифторуксусной кислотой при 90°C в течение 1 часа ОПС *E. coli* O60, который привел к частичному расщеплению схожих лабильных связей, а именно гликозидных связей остатков  $\alpha$ -Rha и  $\beta$ -GlcNAc. [17] Фракционирование полученных продуктов гель-проникающей хроматографией на носителе Fractogel TSK HW-40S привело к четырем олигосахаридным фракциям (I-IV), из которых фракции I и IV были доминирующими. Фракции анализировали методами масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (Приложение, таблица П5) и спектроскопии ЯМР. Полученные данные показали, что фракция II содержала смесь тетрасахаридов  $\text{Hex}_2\text{6dHex}_2$ , а фракция I – смесь высших олигосахаридов от гептасахаридов до нонасахаридов (Приложение, таблица П5). Фракция III включала в себя трисахарид **1**  $\text{Hex}_1\text{6dHex}_2$ , который в масс-спектре давал пик иона  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  при  $m/z$  495.1670. Двумерные спектры ЯМР показали, что основным компонентом этой фракции являлся трисахарид  $\beta\text{-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-Rha}$  ( $\delta_{\text{H-1}}$  4.48, 5.10 и 5.23;  $\delta_{\text{C-1}}$  103.6, 101.7 и 94.0 для связанных остатков  $\beta$ -Gal и  $\alpha$ -Rha и остатка  $\alpha$ -Rha на восстанавливаемом конце соответственно).

Масс-спектр фракции IV содержал интенсивный пик иона  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  при  $m/z$  349.1101, который соответствовало дисахариду  $\text{Hex}_1\text{6dHex}_1$ . Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР показал присутствие связанных остатков  $\beta$ -Gal ( $\delta_{\text{H-1}}$  4.46,  $\delta_{\text{C-1}}$  103.7) и  $\alpha$ -Gal ( $\delta_{\text{H-1}}$  5.28,  $\delta_{\text{C-1}}$  102.0) в соотношении ~1.7:1 соответственно на основании соотношения интегральных интенсивностей сигналов H-1 относительно спектра  $^1\text{H}$  ЯМР исходного полисахарида (Приложение, таблица П6). Таким образом, был сделан вывод, что фракция IV состояла из смеси дисахаридов  $\beta\text{-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-Rha}$  **2** и  $\alpha\text{-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-Rha}$  **3** (рис. 3.10). Этот результат подтвердил более высокую устойчивость к сольволитическому расщеплению гликозидных связей гексоз по сравнению со связями 6-дезоксигексоз.

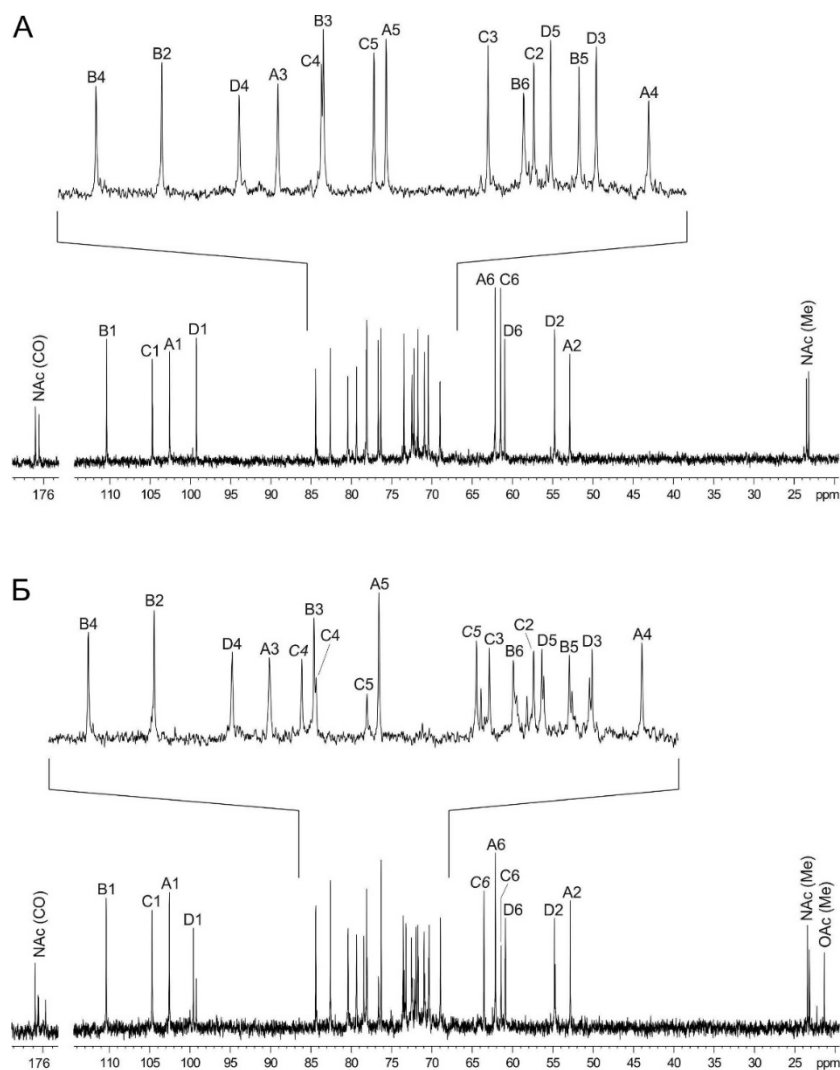


**Рис. 3.10.** Избирательное расщепление ОПС *E. coli* O60 действием CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H.

### 3.1.5. О-полисахарид *E. albertii* O5

В составе ОПС *E. albertii* O5 методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов были идентифицированы Gal, GlcNAc и GalNAc в соотношении 2:0,5:0,9, соответственно.

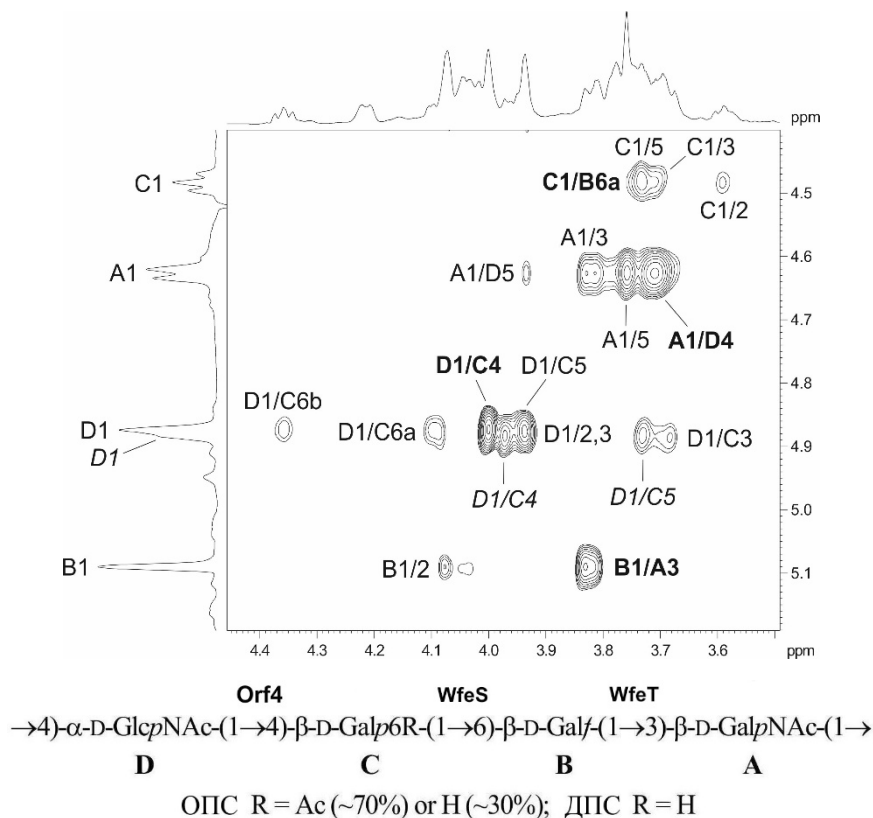
Спектры ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C (рис. 3.11, А) показали нерегулярность структуры ОПС, вероятно связанную с нестехиометрическим О-ацетилированием (в спектрах присутствовали сигналы О-ацетильной группы при δ<sub>H</sub> 2,11 и δ<sub>C</sub> 21,3 для Me-группы и δ<sub>C</sub> 174,7 для СО-группы). В связи с этим ОПС О-деацетилировали мягкой обработкой NH<sub>4</sub>OH. Спектры ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C (рис. 3.11, Б) полученного О-деацетилированного полисахарида (ДПС) были типичными для регулярного полимера. Они содержали сигналы четырех аномерных атомов (δ<sub>H</sub> 4,48-5,10 и δ<sub>C</sub> 99,8-110,4), двух атомов углерода, связанных с азотом, при δ<sub>C</sub> 52,9 и 54,7 и двух N-ацетильных группы при δ<sub>H</sub> 2,07 и 2,08, δ<sub>C</sub> 23,2 и 23,5 для Me-групп, δ<sub>C</sub> 175,5 и 175,9 для СО-групп. Таким образом, ОПС имеет тетрасахаридное О-звено, содержащее два остатка N-ацетиламиносахаров.



**Рис. 3.11.** Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  ДПС (А) и ОПС (Б) из *E. albertii* O5. Цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных буквами, как показано на рис. 3.12 и в Приложении в таблице П7. Сигналы О-ацетилированного звена С показаны курсивом.

В результате отнесения сигналов в спектрах ЯМР ОПС и ДПС с помощью двумерных экспериментов (Приложение, таблица П7) были идентифицированы четыре моносахаридных остатка:  $\beta\text{-Galp}$  (в ДПС) или  $\beta\text{-Galp6Ac}$  (в ОПС),  $\beta\text{-Galf}$ ,  $\alpha\text{-GlcprNAc}$  и  $\beta\text{-GalprNAc}$ . Анализ связей и последовательности моносахаридов в ОПС проводили с использованием двумерного спектра  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY (рис. 3.12), который продемонстрировал корреляционные пики между следующими трансгликозидными протонами: **А** H-1/**Д** H-4, **В** H-1/**А** H-3, **С** H-1/**В** H-6а и **Д** H-1/**С** H-4. Эти данные подтверждались спектром  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  НМВС, который показал корреляции между аномерными протонами и связевыми атомами углерода и наоборот. Положения

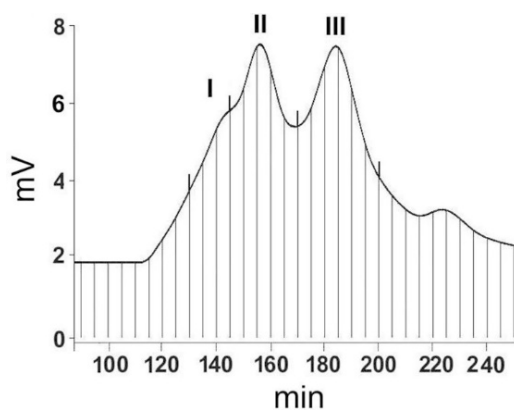
замещения моносахаридов были подтверждены значительным смещением в слабое поле сигналов связевых атомов углерода C-3  $\beta$ -GalpNAc, C-4  $\alpha$ -GlcPNAc и  $\beta$ -Galp и C-6  $\beta$ -Galf (Приложение, таблица П7) по сравнению с их положением в спектрах соответствующих незамещенных моносахаридов.



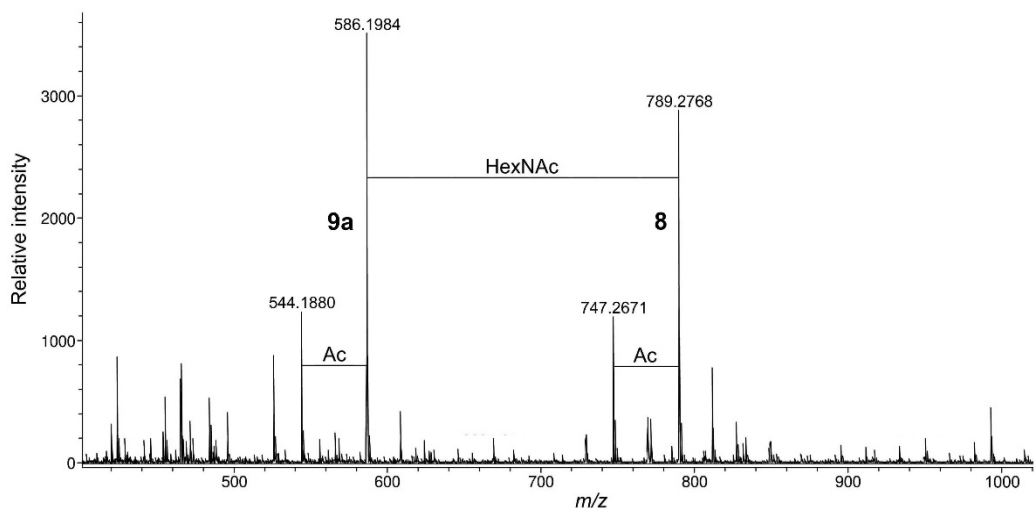
**Рис. 3.12.** Часть двумерного спектра  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY и строение полисахаридов ОПС *E. albertii* O5. Соответствующие части спектра ЯМР  $^1\text{H}$  показаны вдоль осей. Цифры относятся к протонам в остатках моносахаридов, обозначенных буквами, как показано в Приложении в таблице П7. Трансгликозидные корреляционные пики обозначены жирным шрифтом. Гликозилтрансферазы обозначены рядом со связями, к которым они относятся.

Сравнение спектров  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC ДПС и ОПС показало значительное смещение в слабое поле большей части корреляционных пиков Galp Н-6а, 6b/С-6 от 3,69, 3,74/61,4 в ДПС к 4,09, 4,36/63,5 в ОПС. Этот сдвиг указывал на О-ацетилирование части остатков Galp в положение 6, которое подтверждалось сильнополюсным смещением соответствующей части сигнала С-5 Galp от  $\delta$  76,6 в ДПС к 73,5 в ОПС ( $\beta$ -эффект О-ацетилирования). Судя по относительной интенсивности сигналов ЯМР  $^1\text{H}$  О-ацетильной и N-ацетильной групп, степень О-ацетилирования остатка Galp составляла ~70%. Таким образом, ОПС имеют строение, показанное на рис. 3.12.

Для подтверждения структуры проводили сольволиз ОПС действием  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  при 40 °С. В дополнение к связи  $\beta$ -GalpNAc, которая, как известно, легко расщепляется при действии этого реагента [20], ОПС *E. albertii* O5 содержал кислотолабильную  $\beta$ -галактофурнозидную связь. Продукты сольволиза разделяли с помощью гель-проникающей хроматографии (ГПХ) на носителе Fractogel TSK-HW 40S (рис. 3.13). В результате были получены три фракции (I-III), которые изучали методом МС ВР ИЭР (рис. 3.14; Приложение, таблица П8).



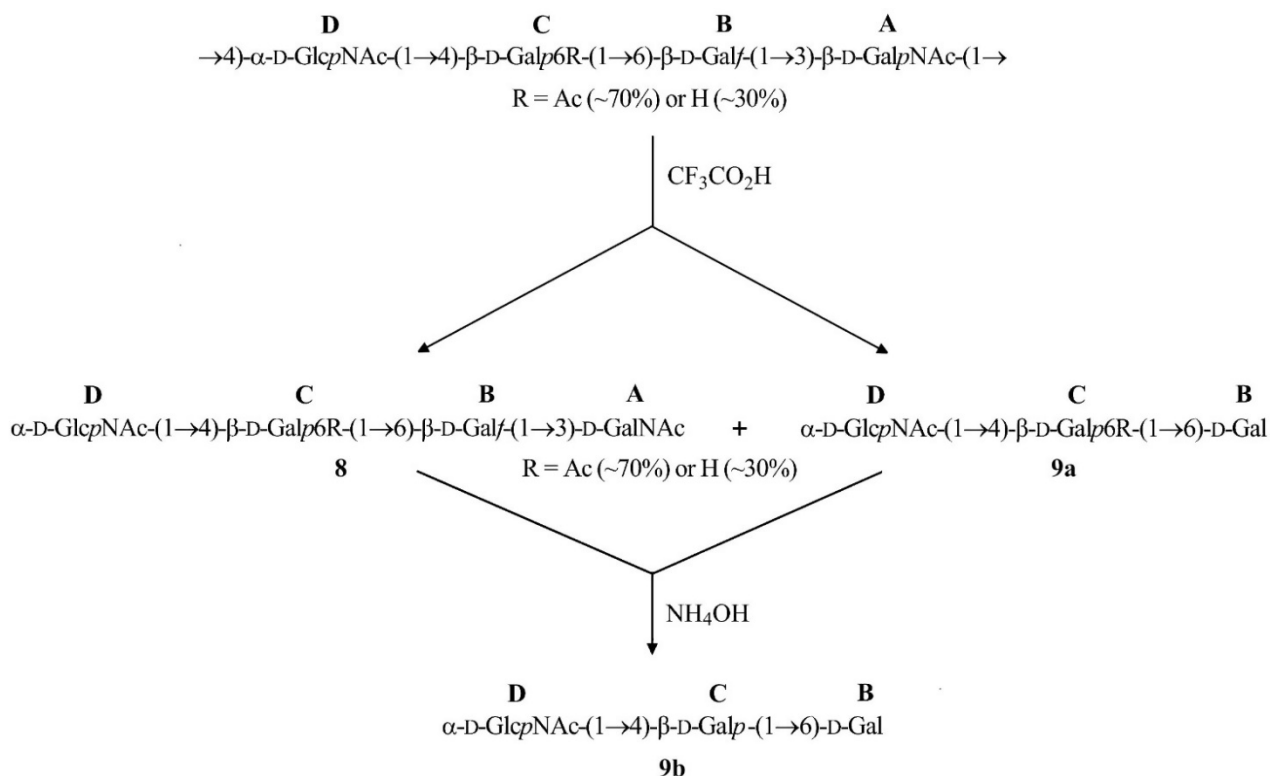
**Рис. 3.13.** Хроматографический профиль ГПХ на носителе Fractogel TSK-HW 40S продуктов сольволиза ОПС *E. albertii* O5 действием  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ .



**Рис. 3.14.** Масс-спектр высокого разрешения с ионизацией электрораспылением и регистрацией отрицательных ионов фракции III, полученной из ОПС *E. albertii* O5 сольволизом  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ . HexNAc обозначает N-ацетилгексозамин.

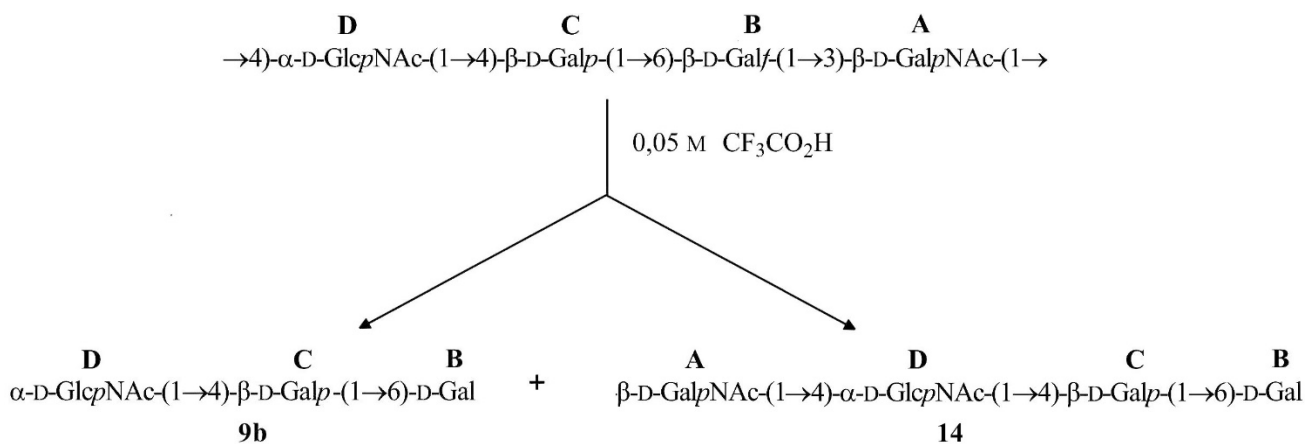
Фракция III представляла собой смесь тетрасахарида **8** (мономер О-звена) и трисахарида **9a** (О-звено без одного остатка N-ацетилгексозамина) (рис. 3.15). Фракция II включала октасахарид **10** (димер) и гептасахарид **11**, а фракция I – додекасахарид **12** (тример) и ундекасахарид **13**, которые отличались от **8** и **9a** присутствием дополнительного одного или двух О-звеньев, соответственно. О-Ацетильные группы не влияли на сольволиз, и олигосахариды были выделены в виде смесей неацетилированных, моно- и мультиацетилированных форм.

Фракцию III (**8** + **9a**) О-дезацетилировали действием  $\text{NH}_4\text{OH}$  при 20 °С, и выделили единственный продукт – трисахарид **9b** (рис. 3.15). Строение полученных олигосахаридов было установлено с помощью спектроскопии ЯМР (отнесенные химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  приведены в Приложении в таблице П7). Образование **9b** не только из **9a**, но и из **8** очевидно является результатом  $\beta$ -элиминирования в 3-замещенном остатке  $\beta\text{-GalpNAc}$  на восстанавливающем конце **8**.



**Рис. 3.15.** Избирательное расщепление ОПС *E. albertii* O5 действием CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H и О-деацетилирование продуктов расщепления.

При гидролизе ДПС 0,05 М CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H была получена смесь примерно равных количеств тетрасахарида **14** и трисахарида **9b** (рис. 3.16). Как и в **9b**, на восстанавливающем конце **14** находился остаток Galp, полученный из Galf (**B**), но на невосстанавливающем конце **14** находился остаток β-GalNAc (**A**), а не α-GlcNAc (**D**), как в **9b**. Структуры этих соединений были подтверждены методом МС ВР ИЭР: масс-спектр содержал пики ионов [M-H]<sup>-</sup> при *m/z* 544,1810 для **9b** и *m/z* 747,2676 для **14** (рассчитанные значения *m/z* 544,1883 и 747,2677, соответственно).



**Рис. 3.16.** Избирательное гидролитическое расщепление действием 0,05 М  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  О-полисахарида *E. albertii* O5.

Таким образом, как безводная, так и 0,05 М  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  избирательно расщепляют ОПС *E. albertii* O5. Первый реагент преимущественно расщеплял гликозидную связь  $\beta\text{-GalpNAc}$ , а второй – связь  $\beta\text{-Galf}$ , тогда как связи других моносахаридных компонентов ( $\alpha\text{-Glc pNAc}$  и  $\beta\text{-Galp}$ ) были стабильными в условиях как сольволиза, так и гидролиза. В результате различные олигосахаридные продукты были получены с использованием разных реагентов.

Выделенные олигосахариды подтвердили структуру ОПС *E. albertii* O5, которая показана на рис. 3.16. Отметим, что изученный ОПС имеет общий трисахаридный фрагмент  $\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Galf-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GalpNAc}$  с ОПС *E. albertii* O7 (раздел 3.7), *Escherichia coli* O124 и O164 и *Shigella dysenteriae* типа 3 [91].

Действие трифторуксусной кислоты на ОПС *E. coli* O54 при 40 ° С в течение 5 часов привел к аналогичным результатам лабильности гликозидных связей 6-дезоксид- $\alpha$ -гексоз и N-ацетил- $\beta$ -гексозаминов. [16] Полученные продукты фракционировали с помощью GPC на Fractogel TSK-HW 40S с получением фракций I-V. Фракции III и IV содержали олигосахариды, которые были изучены с помощью ESI MS высокого разрешения (Приложение, таблица П8) и спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  (Приложение, таблица П7). Фракция III содержала пентасахарид **1** с рибозой на восстанавливающем конце ( $\delta_{\text{H-1/C-1}}$  4,98 / 93,7,  $J_{1,2}$  6,7 Гц для основной формы  $\beta\text{-D-Ribp}$ ). Фракция IV состояла из дисахарида **2** и трисахарида **3** ( $\delta_{\text{H-1/C-1}}$  5,19 / 92,7,  $J_{1,2}$  3,5 Гц и  $\delta_{\text{H-1/C-1}}$  4,76 / 96,3,  $J_{1,2}$  7,8 Гц для  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеры соответственно) и рибозы ( $\delta_{\text{H-1/C-1}}$  5,00 / 94,1,  $J_{1,2}$  6,3 Гц для  $\beta\text{-D-Ribp}$ ) на восстанавливающем конце соответственно (рис. 3.17). Следовательно, эти олигосахариды являются результатом селективного расщепления связей Rib или обеих Rib и GlcNAc. Как и ожидалось, в О-полисахариде *E. coli* O54 связи  $\beta$ -рибофуранозы и N-ацетил- $\beta$ -глюкозамина селективно расщеплялись безводной  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ , причем преимущественно расщеплялась именно  $\beta$ -рибофуранозидная связь. Связи  $\alpha\text{-Rha}$  в этом О-полисахариде были более стабильными, и в выбранных условиях не было получено продуктов их расщепления.



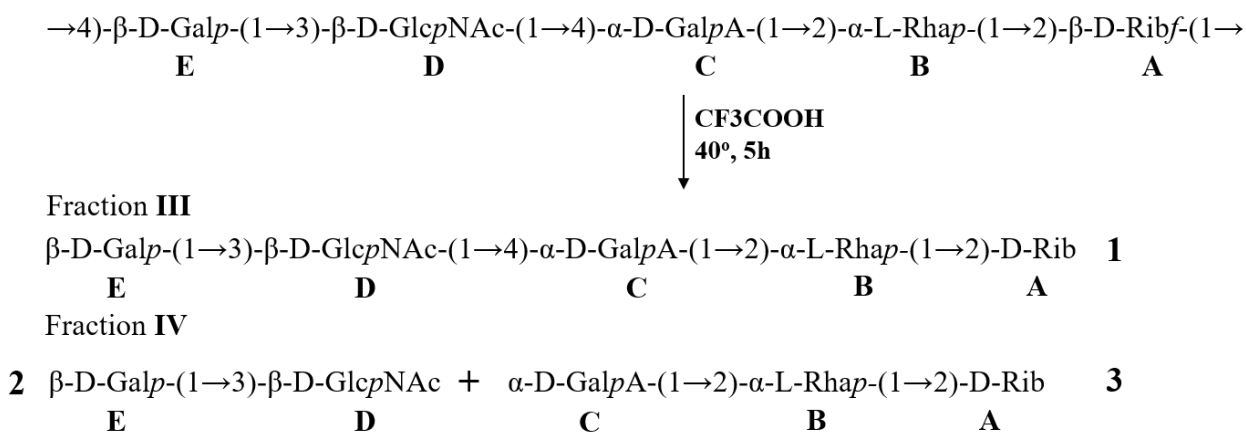


Рис. 3.17. Сольволитическое расщепление действием CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H О-полисахарида *E. coli* O54.

### 3.1.6. О-полисахарид *E. albertii* O6, идентичный О-полисахариду *E. coli* O3

Анализ О-полисахарида с помощью спектроскопии ЯМР *E. albertii* O6 показал, что его структура идентична известной структуре ОПС *E. coli* O3 [92]. Он имеет разветвленное пентасахаридное О-звено с двумя боковыми моносахаридными цепями:

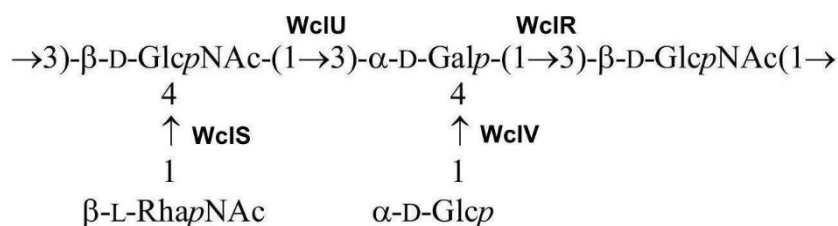


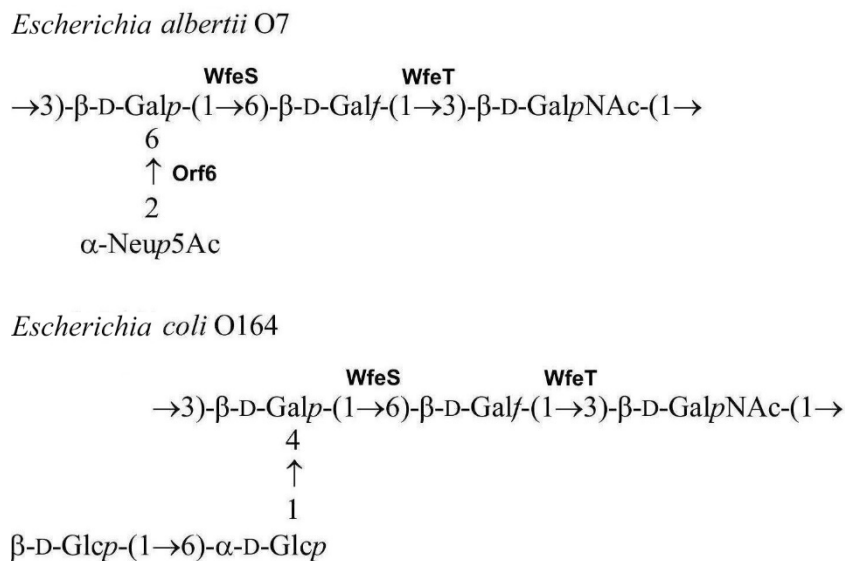
Рис. 3.18. Строение близкородственных О-полисахаридов *E. albertii* O6 и *E. coli* O3. Гликозилтрансферазы обозначены рядом со связями, к которым они относятся.

### 3.1.7. О-полисахарид *E. albertii* O7

Структура ОПС *E. albertii* O7 была установлена сравнением его спектров ЯМР со спектрами полисахарида с такой же структурой, который ранее был выделен из другого штамма *E. albertii* – 10457 (LMG 20973), первоначально идентифицированного как штамм *Hafnia alvei* [70]. ОПС имеет разветвленное тетрасахаридное О-звено с остатком Neu5Ac в боковой цепи (рис. 3.19).

ОПС *E. albertii* O7 имеет такую же структуру линейной части О-звена, что и ОПС *E. coli* O164 (рис. 3.19), а также *E. coli* O124 и *Shigella dysenteriae* типа 3 [91]. Соответственно в этих бактериях гены гликозилтрансфераз *wfeS* и *wfeT*, ответственные за синтез линейной части О-звена, имеют высокую степень гомологии.

Как уже отмечалось, ОПС *E. albertii* O7 имеет также общий трисахаридный фрагмент с ОПС *E. albertii* O5 (раздел 3.5).



**Рис. 3.19.** Строение близкородственных О-полисахаридов *E. albertii* O7 и *E. coli* O164. Гликозилтрансферазы обозначены рядом со связями, к которым они относятся.

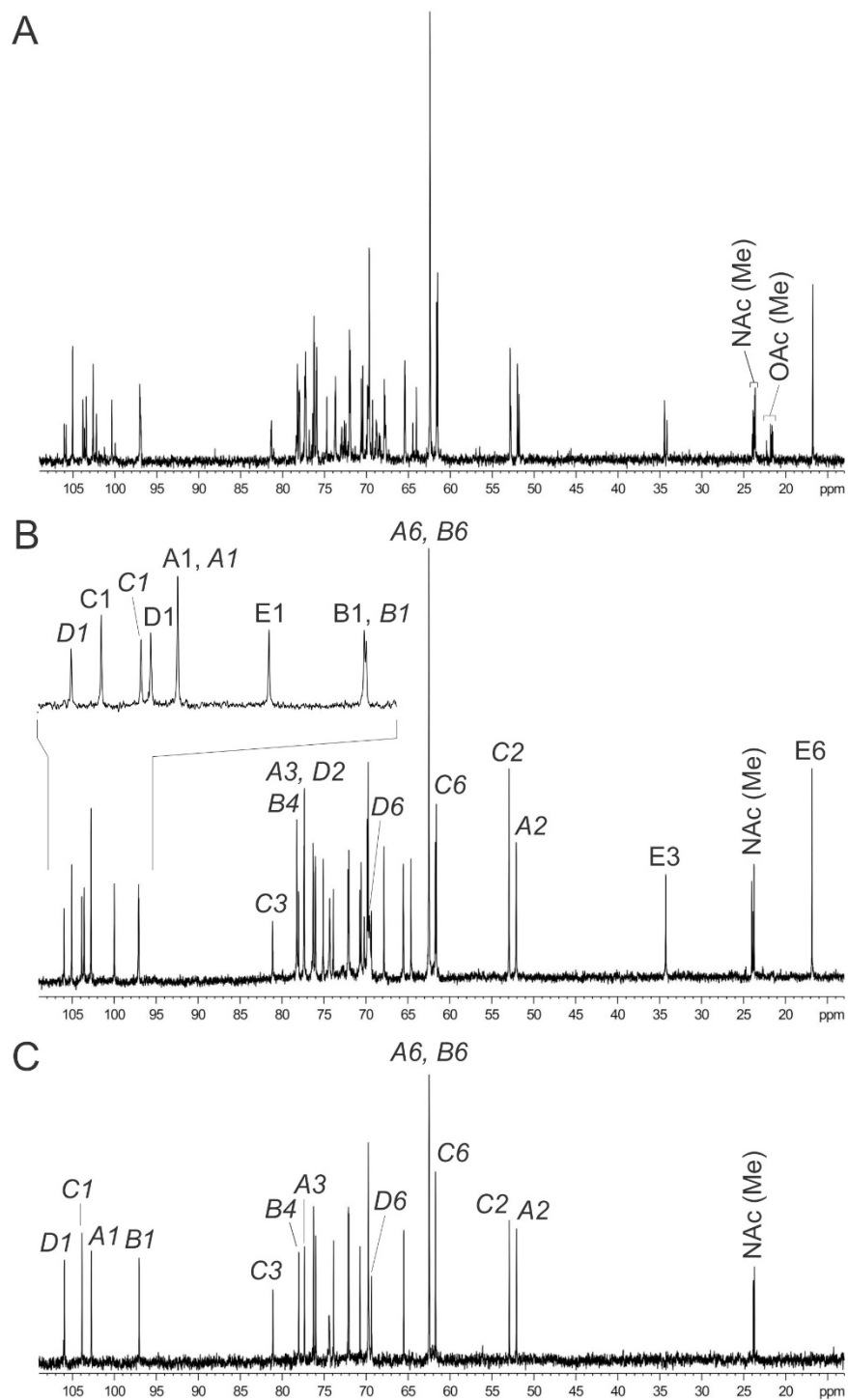
### 3.1.8. О-полисахарид *E. albertii* O8

О-Полисахарид *E. albertii* O8 характеризуется структурным сходством с ОПС *E. coli* O128 – оба имеют одинаковую основную цепь с повторяющимся тетрасахаридным звеном, но различные боковые моносахаридные заместители ( $\alpha$ -Col у первого и  $\alpha$ -L-Fuc у второго) [13].

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  (рис. 3.20А) ОПС содержат множественные второстепенные сигналы О-ацетильных групп при  $\delta\text{H}$  2,15–2,19 и  $\delta\text{C}$  21,5–21,8, что указывает на структурную неоднородность полимера. Обработка ОПС водным раствором аммиака приводила к О-деацетилированному полисахариду (ДПС), который оставался гетерогенным из-за нестехиометрического содержания (~60%) в боковой цепи моносахарида (колитоза, см. ниже). Более длительный гидролиз ДПС в тех же условиях приводил к полному расщеплению колитозы с образованием модифицированного полисахарида без колитозы (МПС).

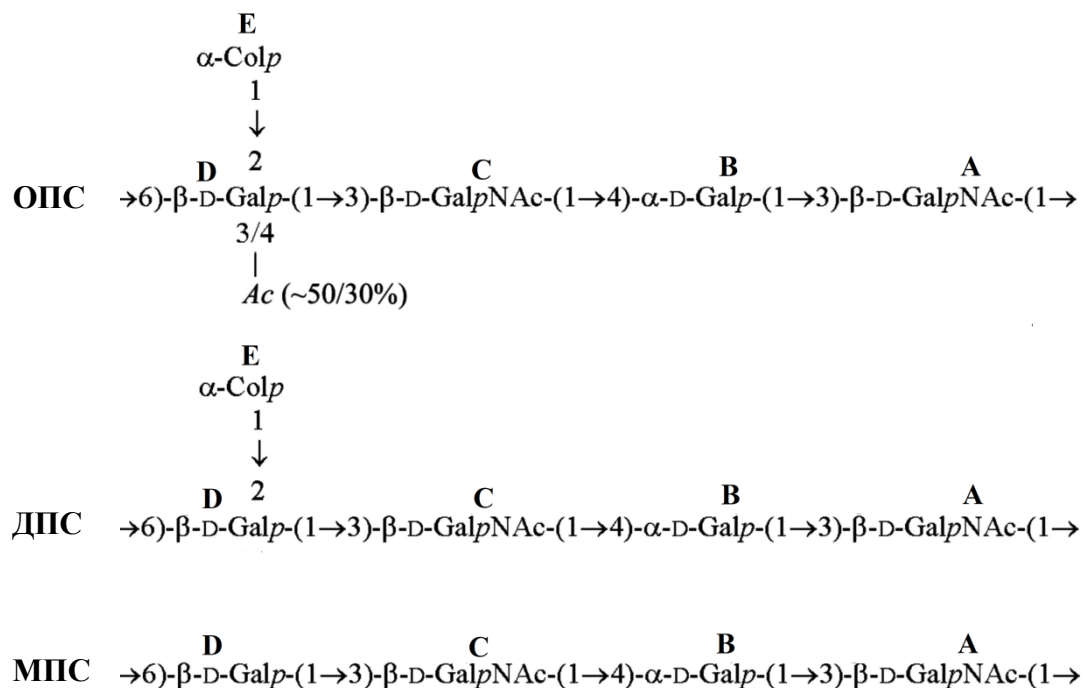
Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР для МПС (рис. 3.20С) показал сигналы четырех аномерных протонов при  $\delta$  4,46–5,09, других протонов моносахаридов при  $\delta$  3,53–4,18 и двух N-ацетильных групп при  $\delta$  2,04 и 2,06. С помощью 2D-экспериментов  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ ,

$^1\text{H}$  TOCSY и  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC удалось соотнести сигналы в спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР. В результате были идентифицированы спиновые системы для одного остатка  $\alpha\text{-Galp}$  (звено **B**) и  $\beta\text{-Galp}$  (звено **D**) и двух остатков  $\beta\text{-GalpNAc}$  (звено **A** и **C**). Таким образом, было установлено, что МПС имеет тетрасахаридное повторяющееся O-звено.



**Рис. 3.20.** Спектры  $^{13}\text{C}$  ЯМР ОПС (A), ДПС (B) и МПС (C) из *E. albertii* O8. Область для групп CO не показана. Цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенным

буквами, как показано на рис. 3.21. Аннотации сигналов О-звена, не содержащего остаток колитозы, выделены курсивом.



**Рис. 3.21.** Структуры О-полисахарида (ОПС), О-дезацетилированного полисахарида (ДПС) и модифицированного полисахарида (МПС) из *E. albertii* O9.

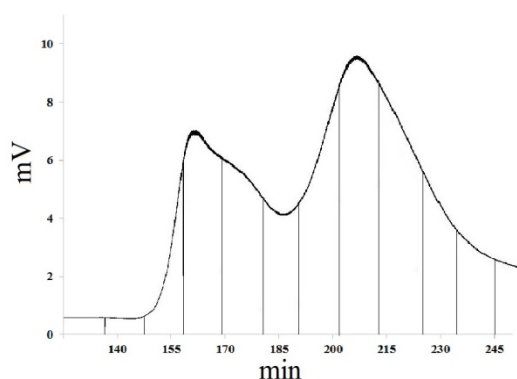
Характер гликозилирования в МПС был установлен по смещению сигналов в слабое поле связующих атомов углерода С-3 звеньев **A** и **C**, С-4 звена **B** и С-6 звена **D** при  $\delta$  77,3, 81,1, 78,1 и 69,6, соответственно, по сравнению с их положением в соответствующих незамещенных моносахаридах [6]. Последовательность моносахаридных остатков в повторяющемся звене МПС (рис. 3.21) определялась следующими корреляциями между аномерными протонами и протонами при атомах углерода связи в спектре  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY: D H-1/CH- 3, CH-1/B H-4, B H-1/A H-3 и A H-1/D H-6 при  $\delta$  4,46/3,88, 4,70/4,18, 5,09/3,82 и 4,58/3,88, 3,96 соответственно.

Место присоединения остатка 3,6-дидезоксигексозы в ДПС (рис. 3.20) было установлено по спектру 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY, который выявил корреляцию E H-1/Gal D H-2 при  $\delta$  5,18. /3.68. Соответственно, химические сдвиги для С-1 звена **E** и С-2 и С-3 звена **D** в PS2 были аналогичны таковым в дисахаридном фрагменте  $\alpha\text{-Colp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Galp}$  О-полисахарид *Salmonella enterica ssp. arizonae* O50 [7]. На этом основании

был сделан вывод, что ДПС содержит тот же дисахаридный фрагмент, что и О-звено *S. enterica* O50, и, следовательно, звено Е представляет собой остаток колитозы. Определенный таким образом моносахаридный состав ДПС был подтвержден химическим анализом моносахаридов. ГЖХ ацеталей альдита, полученных из ДПС гидролизом 1 М  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  при 100 °С, выявила наличие Gal и GalNAc в соотношении 0,9:1, а также следовые количества колитозы, которая, по-видимому, разрушается в ходе гидролиза ацетала.

### 3.1.9. О-полисахарид *E. albertii* O9

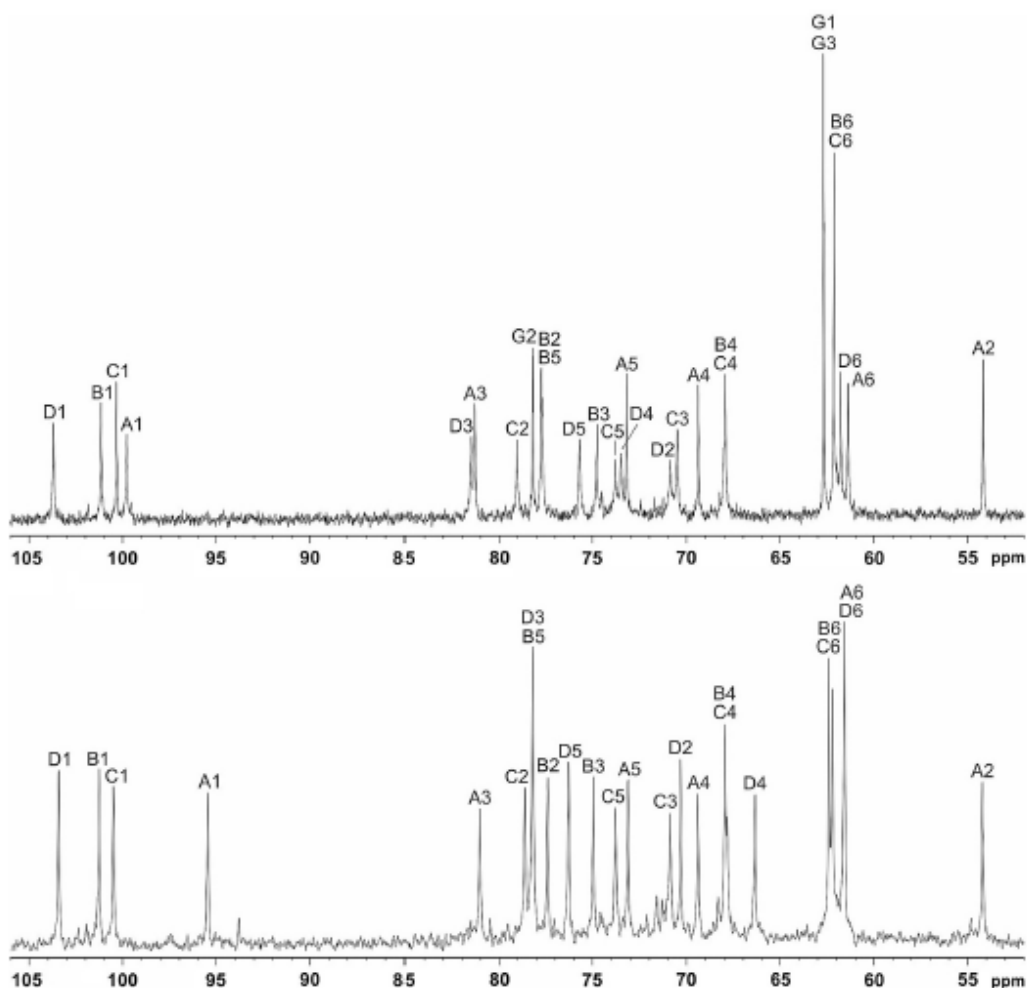
Была получена смесь двух полисахаридов с помощью гель-проникающей хроматографии на сефадексе G-50 после слабой кислотной деградации липополисахарида *Escherichia albertii* EA149, отнесенного к серотипу O9 (рис. 3.22). Полисахарид, элюированный из геля первым, состоял из повторяющейся единицы тетрасахарида, содержащей по два остатка, каждый из D-Gal, D-GlcNAc и фосфат глицерина. Он имел уникальную структуру, которая была установлена одно- и двумерной ЯМР-спектроскопией на ядрах  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$ , примененной к исходному и дефосфорилированному полисахариду, и подтверждена деградацией по Смиту. Второй элюированный полисахарид имел ту же структуру, что и маннан, выделенный ранее из липополисахарида *Escherichia coli* O8 [92].



**Рис. 3.22.** Хроматографический профиль ГПХ на геле Sephadex G-50 продуктов слабого кислотного гидролиза ОПС *E. albertii* O9.

Полисахарид, элюированный первым (ОПС), имел тетрасахаридное повторяющееся О-звено, содержащее по одному остатку каждого из  $\beta$ -GlcNAc (A) и

$\beta$ -Galp (D) и два остатка  $\beta$ -Manp (B и C). Кроме того, в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  (рис. 3.23) присутствовали сигналы глицерина, а спектр ЯМР  $^{31}\text{P}$  показал сигнал для монофосфатной группы при  $\delta$  0,05, из чего можно сделать вывод о присутствии фосфата глицерина.



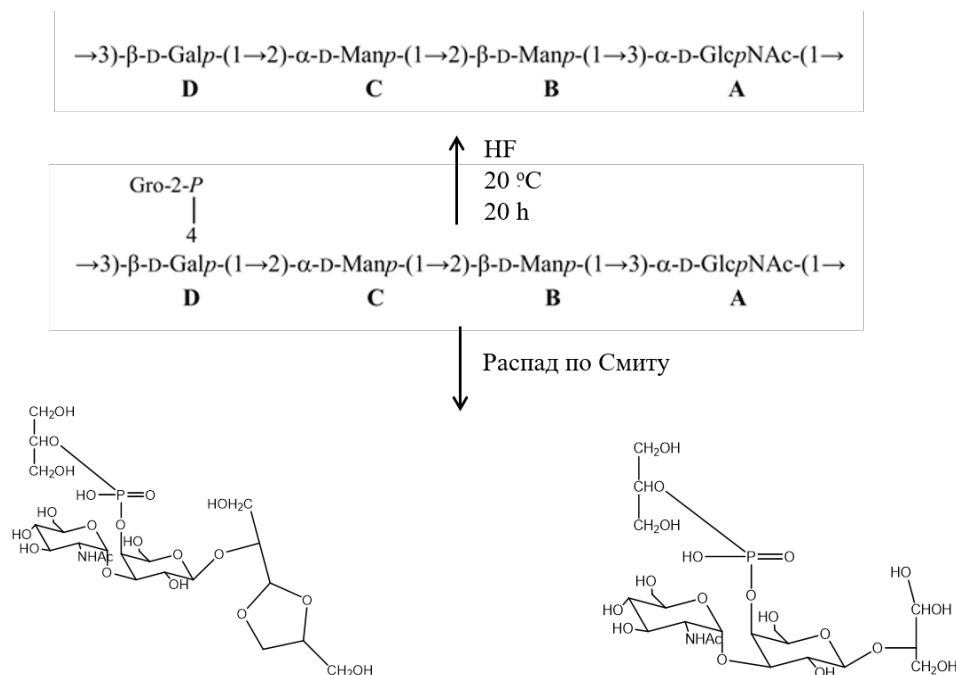
**Рис. 3.23.** Спектры  $^{13}\text{C}$  ЯМР О-полисахарида (ОПС, сверху) и дефосфорилированного полисахарида (МПС, внизу) *E. albertii* O9. Сигналы для групп CO не показаны.

Последовательность моносахаридов в повторяющемся звене ОПС была определена с помощью экспериментов  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  ROESY и  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC. Спектр ROESY показал следующие корреляции между аномерными протонами и протонами на атомах углерода связи соседних моносахаридных остатков: А Н-1 / D Н-3, D Н-1 / С Н-2, С Н-1 / В Н-2 и В Н-1 / А Н-3 при  $\delta$  4,97 / 3,72, 4,48 / 4,24, 5,24 / 3,93 и 4,76 / 3,99, соответственно. Спектр  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC продемонстрировал соответствующие корреляции между аномерными протонами и связующими атомами углерода и

наоборот. Спектр  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  НМВС показал корреляцию фосфатной группы с H-4 Galp и H-2 глицерина при  $\delta$  0,05 / 4,60 и 0,05 / 4,29, соответственно.

Состав ОПС был подтвержден сахарным анализом с использованием ГЖХ ацелированных альдитов. Он продемонстрировал присутствие Man, Gal и GlcNAc в соотношении  $\sim 2: 0,5: 1,1$ , а также небольшое количество Glc, который является составной частью липополисахаридного ядра, присоединенного к полисахариду. Более низкое, чем ожидалось, содержание Gal, очевидно, связано с его неполным высвобождением при кислотном гидролизе из-за фосфорилирования.

Структура ОПС подтверждена дефосфорилированием 48%-ной плавиковой кислотой распадом по Смиту. Строение полученного модифицированного полисахарида (МПС) и олигосахарид (ОС), показанные на рис. 3.24, установлено с помощью ЯМР-спектроскопии, как описано выше ( $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр МПС см. рис. 3.22; химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  для МПС и ОС приведены в таблице П11). На основании полученных данных был сделан вывод, что ОПС имеет структуру, показанную на рис. 3.23.



**Рис. 3.24.** Строение ОПС, дефосфорилированного полисахарида (МПС) и олигосахаридных продуктов распада по Смиту из *E. albertii* O9.

Аналогичный структурный анализ методами ГЖХ и спектроскопии ЯМР были применены к полисахариду, элюированного с геля Сефадекс G-50 вторым. Обнаружено, что он представляет собой маннан, имеющий ту же структуру, что и полисахарид, полученный ранее из ЛПС *E. coli* O8 [15].



## 3.2. Характеристика генных кластеров О-антигенов *Esherichia albertii*

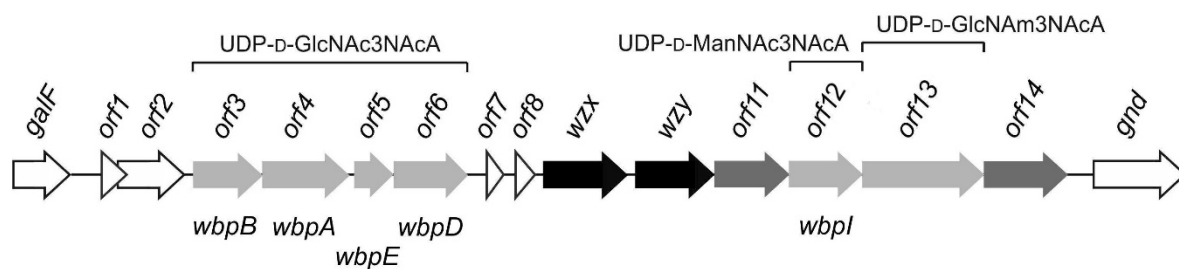
Генный кластер О-антигена (ГКО) *E. albertii*, кодирующий необходимые для биосинтеза ОПС гены, находится на хромосоме между консервативными генами *galF* и *gnd*. Типичный ГКО содержит гены трех основных типов: а) гены биосинтеза нуклеотид-активированных предшественников специфических моносахаридных компонентов ОПС (D-маннозы, 6-дезоксигексоз, N-ацетил-D-галактозамина, производных 6-дезоксиаминосахаров и нонулозоновых кислот), б) гены гликозилтрансфераз для последовательного переноса моносахаридов при сборке О-звена, присоединенного к ундекапренилдифосфатному носителю (UndPP), на цитоплазматической стороне внутренней мембраны и в) гены процессинга О-антигена: флиппазы *wzx* для трансмембранного переноса О-звена и О-антиген-полимеразы *wzy* для полимеризации О-звена на периплазматической стороне мембраны. Гены биосинтеза нуклеотидных предшественников распространенных моносахаридов (D-глюкозы, D-галактозы, N-ацетил-D-глюкозамина и т.д.) являются генами «домашнего хозяйства» и не представлены в ГКО.

Предположительные функции генов биосинтеза исследованных ОПС устанавливали путем сравнения генов в секвенированных ГКО с последовательностями в доступных базах данных, в том числе с генами с известными функциями, с учетом полученных данных о структурах ОПС. Ниже приведены состав и организация ГКО *E. albertii*, исследованных в настоящей работе.

### 3.2.1. Генный кластер О-антигена *E. albertii* O1

Генный кластер О-антигена *E. albertii* O1 содержит 14 генов или так называемых открытых рамок считывания (*orf1-orf14*), потенциально способных кодировать белки (рис. 3.25). Кроме четырех генов транспозаз и интеграз (*orf1,2,7,8*), в кластере присутствовали десять генов, необходимых для биосинтеза О-антигена. В их числе гены двух гликозилтрансфераз (*orf11,14*), гены процессинга О-антигена – флиппазы *Wzx* и О-антиген-полимеразы *Wzy*, и шесть генов, кодирующих ферменты

пути биосинтеза нуклеотидных (уридиндифосфатных, UDP) предшественников производных 2,3-диамино-2,3-дидезоксигексуроновых кислот.



**Рис. 3.25.** Состав и организация ГКО *E. albertii* O1. Гены процессинга О-антигена показаны черным, гены гликозилтрансфераз темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов светло-серым, фланкирующие гены и гены транспозаз и интеграз – белым цветом. Функции генов, предсказанные на основании гомологии с последовательностями в базе данных GenBank, описаны в тексте. Внизу указаны гомологичные гены *Pseudomonas aeruginosa* O5.

У бактерий *P. aeruginosa*, имеющих ОПС, сходный по структуре с ОПС *E. albertii* O1, UDP-D-GlcNAc3NAcA и UDP-D-ManNAc3NAcA синтезируются из UDP-D-GlcNAc участием пяти ферментов (WbpA, WbpB, WbpD, WbpE и WbpI) [60]. Гены *wpdB*, *wpdA*, *wpdD*, *wpdE* и *wpdI* *P. aeruginosa* являются гомологами генов *orf3*, *4*, *5*, *6* и *12* *E. albertii* O1, соответственно, и очевидно эти гены выполняют одинаковые функции у обеих бактерий. *orf13* гомологичен многим бактериальными аминотрансферазам и предположительно осуществляет восстановительное аминирование ацетильной группы (NAc→NAm) в положении 2 остатка UDP-D-GlcNAc3NAcA, тем самым превращая его в UDP-D-GlcNAc3NAcA.

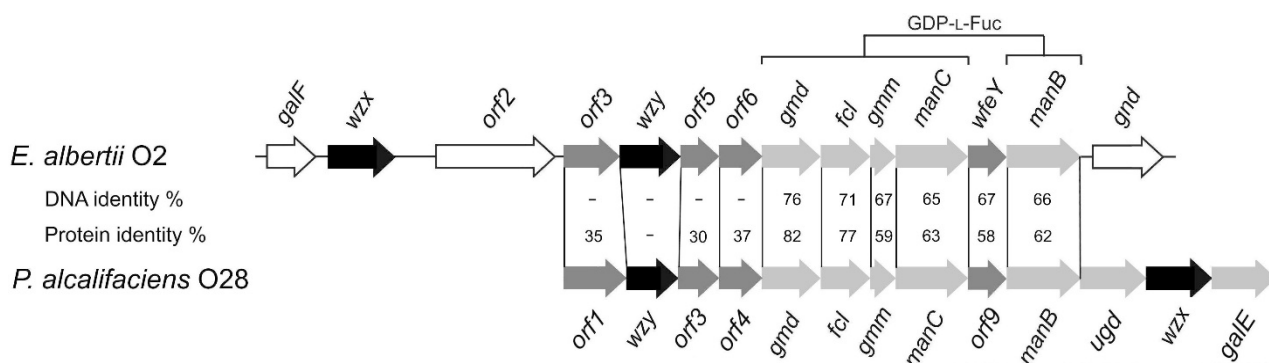
Так как ген *wesA*, отвечающий за присоединение первого моносахарида О-звена к липидному носителю, находится вне ГКО (раздел 2.2.2), наличие в ГКО генов двух гликозилтрансфераз (*orf11*, *14*) соответствует трисахаридному О-звену *E. albertii* O1. Эти гены не имеют близких гомологов в генетической базе данных GenBank, и их отнесение к конкретным гликозидным связям требует проведения дополнительного биохимического исследования.

Присутствие в ГКО генов *wzx* и *wzy* указывает на то, что О-антиген *E. albertii* O1 синтезируется по Wzx/Wzy-зависимому пути (раздел 2.2.2). По этому же пути синтезируются О-антигены всех остальных типов *E. albertii*, исследованных в

настоящей работе. Присутствующие в ГКО гены транспозаз и интеграз не участвуют в биосинтезе О-антигена.

### 3.2.2. Генный кластер О-антигена *E. albertii* O2

Генный кластер О-антигена *E. albertii* O2 содержит 12 генов, включая гены четырех гликозилтрансфераз (*orf3*, 5, 6, *wfeY*), гены процессинга О-антигена – флиппазы *wzx* и О-антиген-полимеразы *wzy*, и пять генов (*manB*, *manC*, *gmd*, *gcl* и *gmm*), кодирующих ферменты хорошо известного пути биосинтеза нуклеотидного (гуанозиндифосфатного, GDP) предшественника L-фукозы – GDP-L-Fuc [62]. Таким образом, состав ГКО согласуется с установленной структурой ОПС; в частности, присутствие генов четырех гликозилтрансфераз соответствует пентасахаридному О-звену *E. albertii* O2.



**Рис. 3.26.** Сравнение генных кластеров О-антигенов *E. albertii* O2 и *Providencia alcalifaciens* O28. Гены процессинга О-антигена показаны черным, гены гликозилтрансфераз темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов светло-серым, фланкирующие гены и ген с неизвестной функцией – белым цветом.

Большая часть ГКО *E. albertii* O2 (*orf3-orf12*) и *Providencia alcalifaciens* O28 [61] являются сходными (рис. 3.26), и эти кластеры могли произойти друг от друга или от общего предшественника. Однако три из четырех нуклеотидных последовательностей гликозилтрансфераз (*orf3*, 5, 6 у *E. albertii* O2) практически не имеют гомологии, а гомология соответствующих белков составляет только 30-37%. В связи с этим было затруднительно определить, какие из этих ферментов имеют одинаковые функции, и анализ гликозилтрансфераз *E. albertii* O2 проводили сравнением с ферментами других бактерий.

Гликозилтрансфераза, кодируемая *orf11 E. albertii* O2, на 91-92% идентична *WfeY E. coli* O156 и O168, образующей первую связь О-звена  $\alpha$ -L-Fucp-(1→3)-D-GlcpNAc [63, 64]. Эта связь (B→A) также присутствует в *E. albertii* O2, и поэтому *orf11* очевидно имеет ту же функцию, что *wfeY*. Таким образом, остаток  $\beta$ -D-GlcpNAc является первым моносахаридом О-звена, перенос которого на липидный носитель инициирует биосинтез О-антигена.

Ген *orf5 E. albertii* O2 гомологичен гену *orf11* этой же бактерии, идентифицированному как ген фукозилтрансферазы, а также гену *wfeV E. coli* O168. ОПС *E. albertii* O2 и *E. coli* O168 имеют общую связь  $\alpha$ -L-Fucp-(1→4)-D-GlcpNAc (E→C), и на основании этих данных был сделан вывод, что *orf5* кодирует вторую фукозилтрансферазу *E. albertii* O2, ответственную за присоединение бокового остатка  $\alpha$ -L-Fucp (E).

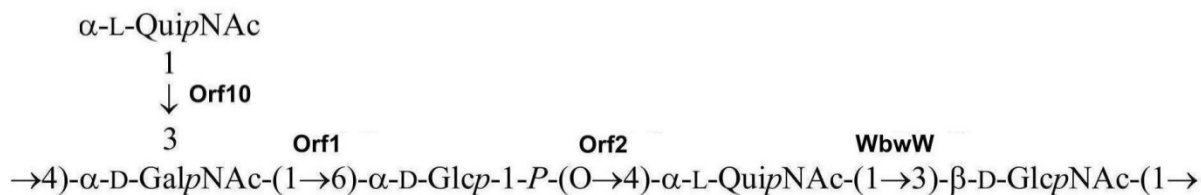
Два оставшихся гена (*orf3* и *orf6*) очевидно кодируют гликозилтрансферазы, ответственные за перенос двух остатков  $\beta$ -D-GlcpNAc с образованием связей C→B и D→C. На рисунке 3.23 показано предположительное отнесение этих ферментов к гликозидным связям, но для их однозначного отнесения требуется экспериментальное подтверждение.

В ГКО нет гена ацетилтрансферазы, и, следовательно, О-ацетилирование остатка L-Fucp (B) кодируется вне ГКО. *orf2* кодирует гипотетический белок, роль которого в синтезе О-антигена неясна.

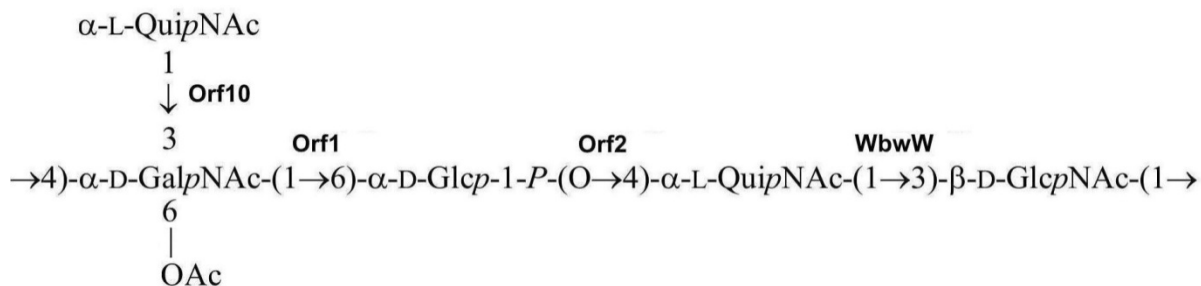
### 3.2.3. Генный кластер О-антигена *E. albertii* O3

Структура ОПС *E. albertii* O3 идентична известной структуре ОПС *E. coli* O181 [65] за исключением того, что в ОПС *E. coli* остаток D-GalNAc О-ацетилирован в положении 6, тогда как в ОПС *E. albertii* О-ацетильные группы отсутствуют (рис. 3.27). ОПС имеет разветвленное пентасахаридное О-звено, особенностью которого является присутствие фосфатной группы в основной цепи. Специфическим компонентом ОПС *E. albertii* O3 является L-QuiNAc; в ОПС входят два остатка этого моносахарида – один в основной цепи и другой в моносахаридной боковой цепи.

*Escherichia albertii* O3

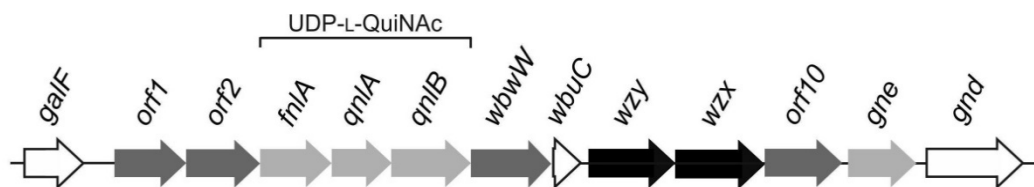


*Escherichia coli* O181



**Рис. 3.27.** Строение близкородственных О-полисахаридов *E. albertii* O3 и *Escherichia coli* O181. Гликозилтрансферазы обозначены рядом со связями, к которым они относятся.

Генные кластеры О-антигенов *E. albertii* O3 и *E. coli* O181 идентичны на 83% и содержат гомологи одних и тех же генов, расположенные в одинаковом порядке. В соответствии с пентасахаридным О-звеном ГКО *E. albertii* O3 включает четыре гена гликозилтрансфераз (рис. 3.28), которые были отнесены к гликозидным связям с использованием опубликованных данных для *E. coli* O181 [65]. Присутствуют также гены флиппазы *wzx* и О-антиген-полимеразы *wzy*. Три гена (*fnlA*, *qnlA* и *qnlB*) необходимы для синтеза UDP-L-QuiNAc – нуклеотидного предшественника L-QuiNAc [62]. Ген *gne* кодирует 4-эпимеразу, которая превращает UDP-D-GlcNAc в UDP-D-GalNAc [60]. Короткая последовательность *wbuC* является остатком гена с неизвестной функцией.

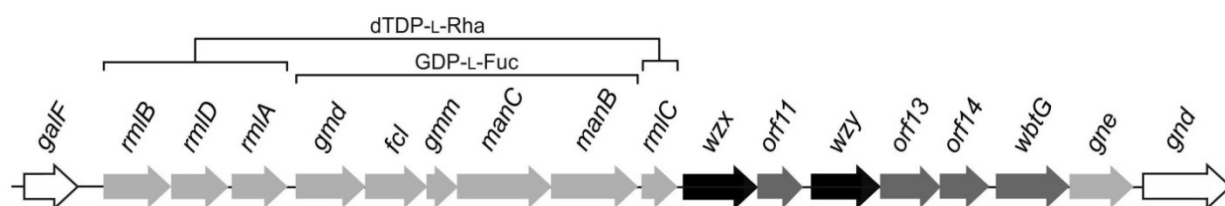


**Рис. 3.28.** Состав и организация ГКО *E. albertii* O3. Гены процессинга О-антигена показаны черным, гены гликозилтрансфераз темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов светло-серым, фланкирующие гены и ген с неизвестной функцией – белым цветом.

### 3.2.4. Генный кластер О-антигена *E. albertii* O4

Генный кластер О-антигена *E. albertii* O4 (рис. 3.29) содержит 16 генов. Из них 10 генов ответственны за биосинтез нуклеотидных предшественников специфических моносахаридных компонентов ОПС: GDP-L-Fuc, dTDP-L-Rha, а также UDP-D-GalNAc (ген *gne*). Пути биосинтеза этих соединений хорошо известны [62].

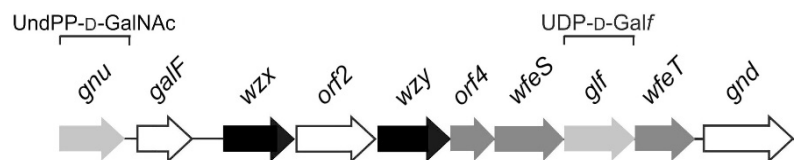
В ГКО присутствуют гены четырех гликозилтрансфераз (*orf11*, *13*, *14* и *wbtG*), которые необходимы для создания четырех внутренних гликозидных связей пентасахаридного О-звена. На основании гомологии с имеющимися известными функциями генами в базе данных GenBank эти гликозилтрансферазы были отнесены к гликозидным связям. ГКО включает также ген О-антиген-полимеразы *Wzy*, ответственной за образование связи между О-звеньями (полимеризацию), и ген флиппазы *Wzx* для переноса О-звена на липидном носителе через внутреннюю мембрану.



**Рис. 3.29.** Состав и организация ГКО *E. albertii* O4. Гены процессинга О-антигена показаны черным цветом, гены гликозилтрансфераз – темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников сахаров – светло-серым, фланкирующие гены – белым цветом.

### 3.2.5. Генный кластер О-антигена *E. albertii* O5

Генный кластер О-антигена *E. albertii* O5 содержит семь генов между консервативными генами *galF* и *gnd* (рис. 3.30). Ген *gnu*, также участвующий в биосинтезе О-антигена, находится рядом с геном *galF*. Он кодирует 4-эпимеразу *Gnu*, превращающую UndPP-D-GlcNAc в UndPP-D-GalNAc (раздел 2.2.2). Присутствие гена *gnu* показывает, что первым моносахаридом О-звена *E. albertii* O5 является D-GalNAc. Ген галактопиранозомутаза *Glf*, необходимой для синтеза другого предшественника моносахаридного компонента ОПС – UDP-D-Galf из UDP-D-Galp [68], входит в состав ГКО.



**Рис. 3.30.** Состав и организация ГКО *E. albertii* O5. Гены процессинга O-антигена показаны черным цветом, гены гликозилтрансфераз – темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников сахаров – светло-серым, фланкирующие гены и ген с неизвестной функцией – белым цветом.

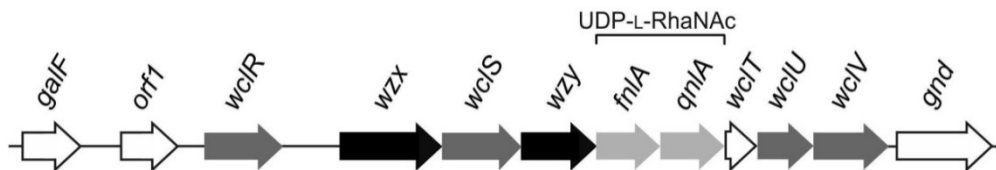
В ГКО присутствуют гены трех гликозилтрансфераз: *orf4*, 5 и 7. Гены *orf5* и *orf7* являются близкими гомологами генов *wfeS* и *wfeT* бактерии *E. albertii* O7, которые отвечают за образование гликозидных связей  $\beta$ -D-Galp-(1→6)-D-Galf и  $\beta$ -D-Galf-(1→3)-D-GalpNAc, соответственно (раздел 3.7). Эти связи присутствуют также в O-антигене *E. albertii* O5, и гены *orf5* и *orf7* были отнесены к ним и названы соответственно (рис. 3.29). Ген *orf4* очевидно отвечает за третью гликозидную связь  $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1→4)-D-Galp в O-звене *E. albertii* O5. Он является гомологом гена *wfeR* бактерий *E. coli* O124 и *Shigella dysenteriae* типа 3, в ОПС которых присутствует сходная связь  $\alpha$ -D-Glcp-(1→4)-D-Galp [64].

Наличие генов *wzx* для флипазы и *wzy* для O-антиген-полимеразы указывает на то, что O-антиген *E. albertii* O5 синтезируется по Wzx/Wzy-зависимому пути. В ГКО отсутствует ген ацетилтрансферазы, и, следовательно, 6-O-ацетилирование остатка D-Galp в ОПС кодируется геном, расположенным в другом месте генома. Ген *orf2* кодирует гипотетический белок, роль которого в биосинтезе O-антигена остается неизвестной.

### 3.2.6. Генный кластер O-антигена *E. albertii* O6

Генный кластер O-антигена *E. albertii* O6 на 98% идентичен ГКО *E. coli* O3. В нем присутствуют два гена для синтеза UDP-L-RhaNAc – нуклеотидного предшественника L-RhaNAc [62], тогда как остальные моносахаридные компоненты O-звена являются общими сахарами и гены для их синтеза кодируются вне ГКО. Как и ожидалось, ГКО включает гены процессинга O-антигена *wzx* и *wzy* и четыре гена

гликозилтрансфераз, которые получили те же названия, что и у *E. coli* O3 (рис. 3.31). Функции двух генов (*orf1* и *wclT*) неизвестны.

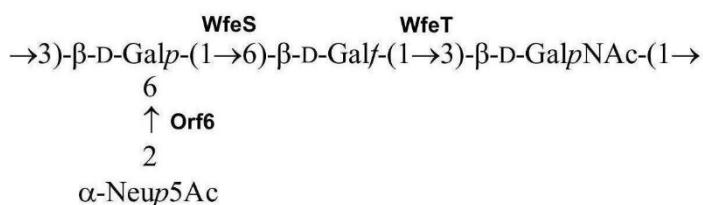


**Рис. 3.31.** Состав и организация ГКО *E. albertii* O6. Гены процессинга O-антигена показаны черным, гены гликозилтрансфераз темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов светло-серым, фланкирующие гены и гены с неизвестной функцией – белым цветом.

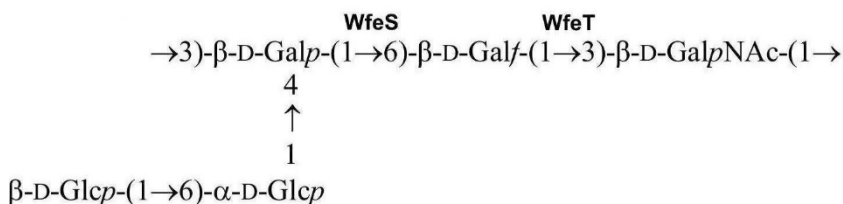
### 3.2.7. Генный кластер O-антигена *E. albertii* O7

ОПС *E. albertii* O7 имеет такую же структуру линейной части O-звена, что и ОПС *E. coli* O164 (рис. 3.32), а также *E. coli* O124 и *Shigella dysenteriae* типа 3 [91]. Соответственно в этих бактериях гены гликозилтрансфераз *wfeS* и *wfeT*, ответственные за синтез линейной части O-звена, имеют высокую степень гомологии. Как уже отмечалось, ОПС *E. albertii* O7 имеет также общий трисахаридный фрагмент с ОПС *E. albertii* O5 (раздел 3.5).

*Escherichia albertii* O7



*Escherichia coli* O164

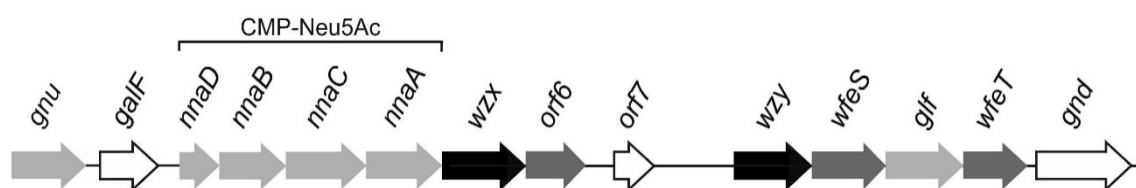


**Рис. 3.32.** Строение близкородственных O-полисахаридов *E. albertii* O7 и *E. coli* O164. Гликозилтрансферазы обозначены рядом со связями, к которым они относятся.

Как и у *E. albertii* O5, у *E. albertii* O7 первым сахаром O-звена является GalNAc. Соответственно рядом с геном *galF* присутствует ген *gnu* (рис. 3.33, который кодирует 4-эпимеразу Gnu, отвечающую за синтез UndPP-D-GalNAc из UndPP-D-GlcNAc (раздел



2.2.2). В соответствии с присутствием в ОПС двух специфических моносахаридов: Galf и Neu5Ac, в ГКО входит ген мутаза *glf* для синтеза UDP-D-Galf из UDP-D-Galp [68] и набор из четырех генов *nnaA-nnaD* для синтеза CMP-Neu5Ac – нуклеотидного (цитидиндифосфатного) предшественника N-ацетилнейраминовой кислоты [71]. Присутствуют также три гена гликозилтрансфераз для сборки тетрасахардного O-звена и гены процессинга O-антигена *wzx* и *wzy* (рис. 3.33). Функция гена *orf7* остается неясной.



**Рис. 3.33.** Состав и организация ГКО *E. albertii* O7. Гены процессинга O-антигена показаны черным, гены гликозилтрансфераз темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов светло-серым, фланкирующие гены и ген с неизвестной функцией – белым цветом.

### 3.2.8. Генный кластер O-антигена *E. albertii* O8

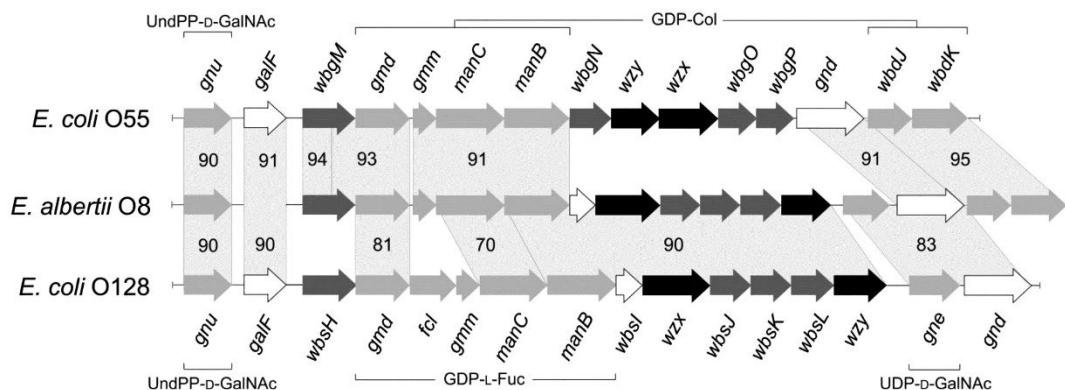
Генный кластер *E. albertii* O8 был секвенирован между консервативными генами *galF* и *gnd* и соседними генами выше *galF* и ниже *gnd*. Генам были присвоены функции путем сравнения с последовательностями генных кластеров *E. coli* O55 и *E. coli* O128 (рис. 3.34), имеющими родственные O-полисахаридные структуры. Генные кластеры *E. albertii* НК18069 и *E. coli* O55 имеют общие гены синтеза GDP-Col, нуклеотидного предшественника колитозы [13], и ген одной из гликозилтрансфераз, WbgM, относящийся к  $\alpha$ -D-Galp-(1 → 3)-D-GalpNAc связи, которая является первой в O55-звене [13].

Все остальные гены в кластере НК18069, необходимые для сборки и процессинга O-единицы, являются гомологами соответствующих генов в *E. coli* O128 [13]. Примечательна высокая гомология между гликозилтрансферазой WbsJ, отнесенной к связи  $\alpha$ -L-Fucp-(1 → 2)-D-Galp в O128-антигене, и соответствующим ферментом, кодируемым в кластере НК18069, который предположительно необходим для образования  $\alpha$ -Colp-(1 → 2)-D-Galp связи. Эта особенность, по-

видимому, связана с близким структурным родством колитозы и L-фукозы, причем первая является 3-дезоксипроизводным последней.

Таким образом, генный кластер *E. albertii* НК18069 включал гены синтеза нуклеотидных предшественников специфических моносахаридных компонентов О-полисахарида (GDP-Col, UDP-D-GalNAc, UndPPD-GalNAc), необходимое количество генов гликозилтрансфераз и ген ацетилтрансферазы, а также гены процессинга О-антигена, кодирующие флиппазу Wzx и полимеразу Wzy (рис. 3.34).

Хотя структура О-полисахарида и кластер генов О-антигена *E. albertii* НК18069 родственны *E. coli* O55 и O128, они обладают уникальными особенностями. Таким образом, штамм НК18069 был избран в качестве кандидата на новую О-серогруппу *E. albertii* O8.



**Рис. 3.34.** Состав и организация ГКО *E. albertii* O8 в сравнении с ГКО близкородственных *E. coli* O55 и O128. Гены процессинга О-антигена показаны черным, гены гликозилтрансфераз темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов светло-серым, фланкирующие гены и ген с неизвестной функцией – белым цветом.

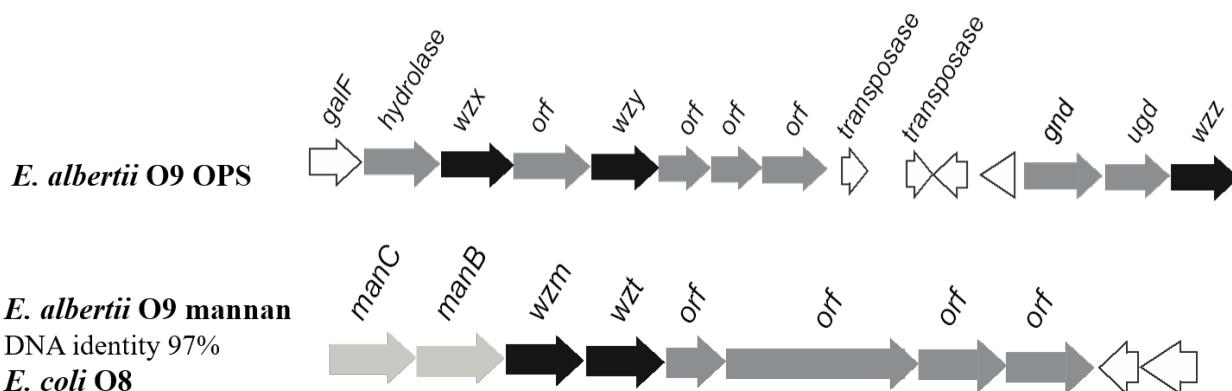
### 3.2.9. Генный кластер О-антигена *E. albertii* O9

Локус *E. albertii* O9 для биосинтеза полисахаридов обнаружен на хромосоме, фланкированной консервативным геном *galF* (кодирующим УТР-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазу) и опероном синтеза гистидина (*his*). Размер и содержание G + C локуса составили 29 853 пар оснований и 42,29% соответственно. Локус включал в себя два последовательно расположенных кластера специфических генов для синтеза полисахаридов, один (GC1) – по флиппаза Wzx/О-антиген-

полимераза Wzy-зависимому пути, а другой (GC2) – по ABC-транспортер Wzm / Wzt-зависимому пути [26].

Кластер PGC1 фланкирован консервативными генами *galF* и *gnd*, за которыми следуют два других консервативных гена: *ugd* для UDP-глюкозо-6-дегидрогеназы и *wzz* для регулятора длины цепи O-антигена. Он также включает гены процессинга O-антигена *wzx* и *wzy*, ген глицерофосфотрансферазы и три гена гликозилтрансфераз. Это содержание соответствует ОПС *E. albertii* O9, за исключением отсутствия генов синтеза нуклеотидного предшественника маннозы, которые присутствуют в кластере PGC2 (рис. 3.35).

Наряду с генами *wzm* и *wzt*, кластер PGC2 содержит гены *manB* и *manC* для синтеза GDP-D-Man, три гена гликозилтрансфераз и ген метилтрансферазы. Он на 97% идентичен кластеру полисахаридных генов *E. coli* O8 (GenBank AB811598), который ответственен за синтез маннана с такой же структурой [15].



**Рис. 3.35.** Состав и организация ГКО ОПС *E. albertii* O9 и маннана. Гены процессинга O-антигена показаны черным, гены гликозилтрансфераз темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов светло-серым, фланкирующие гены и ген с неизвестной функцией – белым цветом.

## 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 4.1. Бактериальные штаммы и выращивание

В работе использовались девять штаммов *Escherichia albertii*, выделенных из различных источников в КНР в городе Цзыгун провинции Сычуань в период 2014-2020 гг. [5]. Они представляют девять типов O1-O9, в которые штаммы были объединены на основании а) последовательности нуклеотидов в полиморфном генном кластере O-антигена (ГКО) и б) идентичности внутри типов при различиях между типами по серологической специфичности.

Бактериальные клетки выращивались китайскими партнерами из Национального института контроля и предотвращения инфекционных заболеваний Китайского центра контроля и предотвращения болезней (Чанпин, Пекин, КНР) на агаре на чашках с лизогенным бульоном при 37 °С. Единичную колонию инокулировали в лизогенный бульон и инкубировали в течение 16 часов при 37 °С при встряхивании со скоростью 220 мин<sup>-1</sup>.

### 4.2. Выделение и деградация липополисахаридов; получение и O-деацетилирование O-полисахаридов

Липополисахариды выделяли из бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом по методу Вестфала [72], экстракт без разделения слоев диализовали, клетки отделяли центрифугированием, белки и нуклеиновые кислоты осаждали из супернатанта добавлением водной 50%-ной Cl<sub>3</sub>CCO<sub>2</sub>H при 4 °С до рН 2 [73]. Осадок отделяли центрифугированием, супернатант диализовали сначала против проточной, затем против дистиллированной воды и лиофилизовали. Выходы ЛПС (4,0-7,3% от веса клеток) приведены в таблице 2.

Липополисахариды (70-100 мг) гидролизовали 2% АсОН при 100 °С в течение 1-2 часов до выпадения осадка липида, который удаляли центрифугированием (13,000×g, 20 мин). Высокомолекулярные ОПС выделяли фракционированием супернатанта с помощью ГПХ на колонке (56 × 2,6 см) с носителем Sephadex G-50

Superfine («Amersham Biosciences», Швеция) в 0,05 М пиридин-ацетатном буфере с рН 4,5, контролируя элюцию с помощью дифференциального рефрактометра («Кнауер», Германия). Выходы ОПС (13-32% от веса ЛПС) представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Выходы ЛПС и ОПС *E. albertii* и время деградации ЛПС

| Тип | Выход ЛПС<br>(% от веса клеток) | Время деградации<br>ЛПС (мин) | Выход ОПС<br>(% от веса ЛПС) |
|-----|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| O1  | 4,5                             | 90                            | 26                           |
| O2  | 4,0                             | 75                            | 13                           |
| O3  | 4,8                             | 60                            | 25                           |
| O4  | 5,2                             | 90                            | 31                           |
| O5  | 7,3                             | 90                            | 24                           |
| O6  | 6,7                             | 120                           | 32                           |
| O7  | 5,9                             | 60                            | 25                           |
| O8  | 4,2                             | 90                            | 42                           |
| O9  | 4,6                             | 120                           | 17                           |

#### 4.3. О-Дезацетилирование

О-Дезацетилирование применялось для получения регулярных полимеров из ОПС *E. albertii* O2 и O5, которые содержали О-ацетильные группы в нестехиометрическом количестве (~40-80%). ОПС (20 мг) обрабатывали 12,5% NH<sub>4</sub>OH при 37 °С в течение 16 часов. Осадок отделяли центрифугированием (13000×g, 20 мин), аммиак удаляли током воздуха, раствор лиофилизovali и получили О-дезацетилированные ОПС.

#### 4.4. Определение состава полисахаридов

Нейтральные моносахариды и аminosахара идентифицировали в виде ацетилированных полиолов [74] методом ГЖХ на хроматографе Maestro (Agilent 7820) («Интерлаб», Россия) с колонкой НР-5 (0,32 мм × 30 м) в градиенте температуры от 160 °С (1 мин) до 290 °С (7 °С/мин). ОПС (0,5 мг) гидролизovali 2 М

CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (120 °С, 2 часа), гидролизат упаривали, остаток восстанавливали NaBH<sub>4</sub> (5 мг) в 1 М NH<sub>4</sub>OH (20 °С, 16 часов), подкисляли конц. АсОН (30 мкл), добавляли 10%-ный раствор АсОН в метаноле (0,5 мл) и растворитель удаляли током воздуха. Для полного удаления борной кислоты дважды добавляли метанол (0,5 мл) с последующим упариванием током воздуха. Полученные полиолы ацетилировали смесью Ас<sub>2</sub>О–пиридин (1:1, 120 °С, 40 мин), смесь разбавляли водой, ацетилированные производные экстрагировали этилацетатом, экстракт концентрировали до объема 100 мкл и полученный раствор использовали для анализа ГЖХ. Ацетилированные полиолы идентифицировали с использованием стандартов, полученных из соответствующих заведомых моносахаридов.

## 4.5. Избирательное расщепление

### 4.5.1. Сольволиз трифторуксусной кислотой

Сольволиз безводной CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H [54] применялся для избирательного расщепления ОПС *E. albertii* O4 и O5, а также *E. coli* O60 и O54. Сольволиз ОПС (20 мг) проводили CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (0,2 мл) в стеклянном герметичном контейнере при нагревании до необходимой температуры. Кислоту удаляли током воздуха, остаток растворяли в воде и фракционировали ГПХ на носителе Fractogel TSK-HW 40S в 1% АсОН. Условия сольволиза и выходы продуктов приведены в таблице 3.

Продукты сольволиза *E. albertii* O4 (3,2 мг) восстанавливали NaBH<sub>4</sub> в воде (20 °С, 16 часов), олигозилполиолы **5** (0,4 мг), **6** (0,3 мг) и **7** (0,4 мг) выделяли ГПХ на том же носителе.

**Таблица 3.** Условия сольволиза и гидролиза ОПС *E. albertii* и *E. coli* и выход продуктов.

| Тип   | Реагент                           | Температура (°С) | Время (часы) | Продукт(ы)          | Выход (%) |
|-------|-----------------------------------|------------------|--------------|---------------------|-----------|
| EA O1 | CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H | 20               | 16           | трисахарид <b>1</b> | 76        |

|        |  |     |      |                        |       |
|--------|--|-----|------|------------------------|-------|
| EA O4  | CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H        | 50  | 4/24 | трисахарид <b>2</b>    | 16/25 |
|        |  |     |      | тетрасахарид <b>3</b>  | 7/3   |
|        |  |     |      | пентасахарид <b>4</b>  | 8/25  |
| EA O5  | CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H        | 40  | 3    | тетрасахарид <b>8</b>  | 13    |
|        |  |     |      | трисахарид <b>9a</b>   | 13    |
| EA O5  | 0,05 M CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H | 100 | 1    | трисахарид <b>9b</b>   | 28    |
|        |  |     |      | тетрасахарид <b>14</b> | 28    |
| EC O54 | CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H        | 40  | 5    | пентасахарид <b>1</b>  | 18    |
|        |  |     |      | дисахарид <b>2</b>     | 4     |
|        |  |     |      | трисахарид <b>3</b>    | 4     |
| EC O60 | CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H        | 90  | 1    | трисахарид <b>1</b>    | 23    |
|        |  |     |      | дисахарид <b>2</b>     | 8     |
|        |  |     |      | дисахарид <b>3</b>     | 8     |

#### 4.5.2. Сольволиз трифторметансульфоновой кислотой

В исследовании ОПС *E. albertii* O1 использовался сольволиз безводной трифторметансульфоновой кислотой CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H [48], который при 20 °С избирательно расщеплял гликозидную связь α-GlcNAc, устойчивую к действию безводной CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H. Раствор ОПС *E. albertii* O1 (5,5 мг) в 0,2 мл CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H в герметичном стеклянном контейнере выдерживали в атмосфере аргона 16 часов при 20 °С, реакционную смесь нейтрализовали 25% NH<sub>4</sub>OH, и ГПХ на колонке (85 × 1,6 см) с носителем Fractogel TSK-HW 40S в 1% AcOH выделили трисахарид **1** (4,2 мг).

#### 4.5.3. Кислотный гидролиз

О-Дезацетилированный ОПС *E. albertii* O5 (9 мг) гидролизовали 0,05 M CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (0,5 мл) при 100 °С в течение 1 часа, раствор упаривали, остаток растворяли в воде и ГПХ на колонке (85 × 1,6 см) с носителем Fractogel TSK-HW 40S в 1% AcOH выделили смесь равных количеств олигосахаридов **9b** и **14** (5 мг).

#### 4.5.4. Распад по Смиту

Распад по Смиту применялся для превращения нерегулярного разветвленного ОПС *E. albertii* O2 и O9 в регулярный линейный МПС за счет деградации и удаления боковых остатков  $\alpha$ -Fuc E, присутствующих в нестехиометрическом количестве. Растворы ОПС (20 мг) в 0,05 М NaIO<sub>4</sub> (2 мл) выдерживали 72 часа в темноте при 20 °С, добавляли 20 мг NaBH<sub>4</sub>, через 16 часов подкисляли конц. AcOH, обессоливали ГПХ на колонке (85 × 1,6 см) с носителем Fractogel TSK-HW 40S в 1% AcOH, гидролизовали 2%-ной AcOH (100 °С, 2 часа) и ГПХ на том же носителе выделили модифицированные линейные полисахариды с выходом ~40%.

#### 4.6. Масс-спектрометрия

Метод МС ВР ИЭР использовался для определения молекулярной массы и тем самым подтверждения строения олигосахаридов, полученных избирательным расщеплением ОПС. Для олигосахаридов, содержащего кислотные компоненты (производные гексуроновых кислот), регистрировали отрицательные ионы, для нейтральных олигосахаридов – отрицательные или положительные ионы.

Анализ проводили на масс-спектрометре micrOTOF II («Bruker Daltonics»). Диапазон сканирования масс  $m/z$  50–3000, калибровка использовалась как внешняя, так и внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, «Fluka»). Образцы (~50 нг/мкл) растворяли в смеси воды и ацетонитрила (1:1 по объему) и вводили шприцем в распылитель со скоростью потока 3 мкл/мин, в качестве газа-распылителя использовали азот (4 л/мин). Разность потенциалов на капиллярном входе составляла 4500 В или –3000 В при регистрации отрицательных и положительных ионов, соответственно, выходная разность потенциалов 150 В, температура интерфейса 180 °С.



#### 4.7. Спектроскопия ЯМР

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  регистрировали на спектрометрах Avance II 600 и DRX-500 («Bruker»), с рабочей частотой для протонов 600 и 500 МГц соответственно, и атомов углерода 150 МГц. Сбор и обработку данных проводили с помощью программы TopSpin 2.1 («Bruker»). Отнесение сигналов и анализ корреляций в спектрах ЯМР проводили с использованием двумерных экспериментов, коррелирующих химические сдвиги протонов с протонами ( $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY) и протонов с атомами углерода ( $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC).

Образцы ОПС и олигосахаридов лиофилизировали двукратно из 99,9%-ной  $\text{D}_2\text{O}$  для замены подвижных протонов на атомы дейтерия, затем растворяли в 99,95%-ной  $\text{D}_2\text{O}$ . Для микроколичеств образцов использовали ампулы Shigemi. В качестве внутреннего стандарта использовали натрий-3-триметилсилилпропаноат-2,2,3,3- $\text{d}_4$  ( $\delta_{\text{H}}$  0 м. д.,  $\delta_{\text{C}}$  -1,6 м. д.), температуру (20-55 °С) выбирали с учетом положения остаточного сигнала растворителя (HDO). В экспериментах с детектированием протонов сигнал HDO подавляли предоблучением в течение 1 сек. Для детектирования NH-протонов съемку спектров ЯМР проводили в смеси  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1 по объему).

Для двумерной спектроскопии ЯМР использовали следующие параметры:  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY, разрешение  $512 \times 1024$ , релаксационная задержка 1 сек;  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  TOCSY, разрешение  $512 \times 1024$ , длительность MLEV17 спин-лока 60 мсек, релаксационная задержка 1 сек;  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY, разрешение  $512 \times 1024$ , время смешивания 200 мсек, релаксационная задержка 1 сек;  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMQC, разрешение  $256 \times 1024$ , релаксационная задержка 1 сек;  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC, разрешение  $512 \times 1024$ , релаксационная задержка 1,5 сек, задержка для развития многосвязевых корреляций 60 мсек (оптимизирована для константы спин-спинового взаимодействия 8 Гц). Аподизацию осуществляли по обеим осям  $t_1$  и  $t_2$  с помощью синусоидальной функции в эксперименте COSY или квадратичной синусоидальной функции в остальных экспериментах.

## 4.8. Биоинформатический анализ

Полногеномное секвенирование бактериального генома проводилось китайскими партнерами на безвозмездной основе. Нуклеотидные последовательности ГКО *E. albertii* депонированы в базу данных GenBank под номерами доступа, указанными в таблице 4.1. Поиск гомологов генов в базе данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) осуществляли онлайн с помощью программы BLASTP ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа является структурно-генетическим исследованием О-полисахаридов (О-антигенов) *Escherichia albertii* – одного из важных в медицинском отношении видов рода эшерихия, проведенным совместно химиками ИОХ РАН и генетиками Китайского центра контроля и предотвращения болезней (Пекин, КНР) и Нанькайского университета (Тянь-дзинь, КНР). В отличие от другого вида эшерихий, кишечной палочки *Escherichia coli*, бактерии *E. albertii* открыты недавно и изучены мало, а в структурном отношении ОПС - вовсе не исследованы.

На основании молекулярного типирования китайские партнеры выявили девять типов *E. albertii* [1]. В данной работе установлены приведенные ниже структуры ОПС представителей всех девяти типов (Таблица 4), подтвердившие обоснованность предложенной классификации штаммов.

**Таблица 4. Структуры ОПС *E. albertii*, установленные в настоящей работе.**

| Серотип               | Структура ОПС  |
|-----------------------|--|
| <i>E. albertii</i> O1 | →4)-β-D-ManpNAc3NAcA-(1→4)-β-D-GlcpNAc3NAcA-(1→3)-α-D-GlcpNAc-(1→  |
| <i>E. albertii</i> O2 | <div style="text-align: center;">           α-L-Fucp (~70%)<br/>           1<br/>           ↓<br/>           3         </div> <div style="text-align: center;">           OAc<br/>           ↓<br/>           4         </div> →3)-β-D-GlcpNAc-(1→3)-β-D-GlcpNAc-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-β-D-GlcpNAc 1→ |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <i>E. albertii</i> O3 | $\begin{array}{c} \alpha\text{-L-QuipNAc} \\ 1 \\ \downarrow \\ 3 \end{array}$ $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}1\text{-}P\text{-}(O\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-QuipNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow$ |
| <i>E. albertii</i> O4 | $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow$ $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow$                                    |
| <i>E. albertii</i> O5 | $\begin{array}{c} OAc \\ \downarrow \\ 6 \end{array}$ $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow$   |
| <i>E. albertii</i> O6 | $\begin{array}{cc} \beta\text{-L-RhapNAc} & \alpha\text{-D-Glcp} \\ 1 & 1 \\ \downarrow & \downarrow \\ 4 & 4 \end{array}$ $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow$                               |
| <i>E. albertii</i> O7 | $\begin{array}{c} \alpha\text{-Neup5Ac} \\ 2 \\ \downarrow \\ 6 \end{array}$ $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galf}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow$   |
| <i>E. albertii</i> O8 | $\begin{array}{c} \alpha\text{-Colp} \\ 1 \\ \downarrow \\ 2 \\ \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc}\text{-}(1\rightarrow \\ 3/4 \\ \uparrow \\ OAc \end{array}$  |
| <i>E. albertii</i> O9 | $\begin{array}{c} Gro\text{-}2\text{-}P \\ \downarrow \\ 4 \end{array}$ $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Manp}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-}(1\rightarrow$                                 |

Первым моносахаридом О-звена является D-GlcNAc или D-GalNAc, с переноса 1-фосфата которого на липидный носитель UndP начинается биосинтез ОПС. Соответствующая трансфераза кодируется в генном кластере общего энтеробактериального антигена, и в ГКО ее ген не дублируется [3]. Кроме D-GlcNAc, многие ОПС содержат три других общих моносахарида – D-Glc, D-Gal и D-Rib, биосинтез которых осуществляется бактериями независимо от того, являются они компонентами ОПС или нет. Если первый моносахарид – D-GalNAc, как у *E. albertii* O5 и O7, рядом с ГКО имеется ген 4-эпимеразы *gnu*, превращающей D-GlcNAc-PPUnd в D-GalNAc-PPUnd. Ген *ugd* для синтеза D-GlcA присутствует у всех бактерий,

независимо то того, присутствует этот моносахарид в составе ОПС или нет. Ферменты для биосинтеза других специфических моносахаридов кодируются в ГКО; это D-Man, 6-дезоксигексозы (L-Rha, L-Fuc), 3,6-дидезокси-L-ксило-гексоза (колитоza). 6-дезоксигексозамины (D-QuiNAc, L-QuiNAc, L-RhaNAc, L-FucNAc, производные D-Fuc3N и Qui4N, L-RhaNAc3NAc), производные 2,3-диамино-2,3-дидезоксигексуроновых кислот (D-ManNAc3NAcA, D-GlcNAc3NAcA) и N-ацетилнейраминавая кислота (Neu5Ac).

Общий трисахаридный фрагмент присутствует в ОПС *E. albertii* O5 и O7. ОПС *E. albertii* O3 и O6 идентичны по структуре ОПС *E. coli* O181 и O3, соответственно, за исключением отсутствия O-ацетилирования у *E. albertii* O3, характерного для *E. coli* O181. ОПС *E. albertii* O7 имеет такую же структуру, что и изученный ранее штамм *E. albertii* LMG 20973, первоначально ошибочно отнесенный к *H. alvei* [4]. ОПС четырех остальных типов (*E. albertii* O1, O2, O4 и O5) являются уникальными. При этом ОПС *E. albertii* O1, O2 и O7 имеют общие или близкородственные по структуре олигосахаридные фрагменты с ОПС других бактерий: O1 с *Pseudomonas aeruginosa* O5, O2 с *Providencia alcalifaciens* O28, O7 с *E. coli* O124, *E. coli* O164 и *Shigella dysenteriae* типа 3.

Путем сравнения с последовательностями, представленными в доступной базе данных GenBank с учетом полученных данных о строении ОПС, в ГКО *E. albertii* обнаружены все гены, нужные для биосинтеза ОПС этих бактерий. В их числе гены, кодирующие ферменты путей синтеза специфических компонентов ОПС, и гены необходимого числа гликозилтрансфераз для сборки O-звеньев. Для большинства изученных штаммов на основании гомологии с представленными в базе данных GenBank ферментами, имеющими известные функции, гликозилтрансферазы были отнесены к гликозидным связям, в образовании которых они принимают участие.

Полученные данные представляют собой химическую и генетическую основу для классификации бактерий *E. albertii*, которая необходима для идентификации штаммов, эпидемиологического мониторинга и улучшенной диагностики инфекционных заболеваний, вызываемых этими бактериями. Высокоспецифические гены биосинтеза O-антигенов, прежде всего гены процессинга *wzx* и *wzu*, являются

удобной мишенью для полимеразной цепной реакции, которая может быть положена в основу экспресс-диагностики этих инфекций.

Основным методом структурного анализа ОПС была одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Она давала информацию о размере О-звена, природе моносахаридов и неуглеводных заместителей, размерах циклов моносахаридов, конфигурациях гликозидных связей, положении гликозилирования моносахаридов и местах присоединения О-ацетильных групп, последовательности моносахаридов в О-звене. Для подтверждения строения использовалось избирательное расщепление ОПС с образованием олигосахаридов или ОПС (*E. albertii* O2) модифицированных полисахаридов. Продукты расщепления идентифицировали с помощью спектроскопия ЯМР и (для олигосахаридов) методом МС ВР ИЭС.

Для избирательного расщепления использовались как “классические” методы (частичный кислотный гидролиз, дефосфорилирование 48% HF, распад по Смиту), так и недавно введенное в практику анализа углеводов избирательное сольволитическое расщепления безводными сильными органическими кислотами:  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  и  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  [16]. Первая является более щадящей и избирательно расщепляет только немногие гликозидные связи: в настоящей работе связи б-дезоксигексоз, моносахаридов в фуранозной форме (*Gal*f и *Rib*f) и N-ацетил-β-гексозаминов, тогда как под действием второй расщепляются гликозидные связи и многих других моносахаридов. Например,  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  избирательно расщепляла гликозидную связь α-GlcNAc в ОПС *E. albertii* O1, которая была устойчива к действию  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  даже при высокой температуре. Интересно, что при гидролизе 0,05 М  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  в ОПС *E. albertii* O5 расщеплялись те же гликозидные связи, что и при сольволизе безводной  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ , но преимущественное направление реакции было различным (по связи β-GalNAc в первом случае или β-Galf во втором случае). Таким образом, методы избирательного расщепления гликозидных связей получили дальнейшее развитие в структурном анализе полисахаридов.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено строение О-полисахаридов типовых штаммов всех девяти известных О-серогрупп *Escherichia albertii* и подтверждена обоснованность отнесения изученных штаммов к отдельным О-серогруппам,
2. Полученные данные о строении О-полисахаридов, являются химической основой для классификации штаммов бактерий *E. albertii*, необходимой для диагностики и эпидемиологического мониторинга.
3. Выявлена межвидовая идентичность одной пары и близкое структурное родство другой пары О-полисахаридов *E. albertii* и кишечной палочки *Escherichia coli*.
4. Показано соответствие установленных структур О-полисахаридов составу генных кластеров О-антигенов *E. albertii* и с использованием полученных структурных данных определены предположительные функции генов, участвующих в биосинтезе О-полисахаридов.
5. Для структурного анализа ОПС успешно использован и оптимизирован на новых объектах разработанный в нашей лаборатории удобный и эффективный метод получения олигосахаридных фрагментов полисахаридов сольволизом безводными кислотами, такими как трифторметансульфокислота и трифторуксусная кислоты.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. A. Knirel // *Bacterial lipopolysaccharides: Structure, chemical synthesis, biogenesis and interaction with host cells*. Y. A. Knirel, M. A. Valvano, eds. Springer, Wien-New York, 2011. P. 41-115.
2. M. A. Valvano, S. E. Furlong, K. B. Patel // *Bacterial lipopolysaccharides: Structure, chemical synthesis, biogenesis and interaction with host cells*. Y. A. Knirel, M. A. Valvano, eds. Springer, Wien-New York, 2011. P. 275-310.
3. C. R. H. Raetz, C. Whitfield // *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, **71**, 635-700.
4. M. M. Cunneen, B. Liu, L. Wang, P. R. Reeves // *PLoS ONE*, 2013, **8**, e67646.
5. H. Wang, H. Zheng, Q. Li, Y. Xu, J. Wang, P. Du, X. Li, X. Liu, L. Zhang, N. Zou, G. Yan, Z. Zhang, H. Jing, J. Xu, Y. Xiong // *Front. Microbiol.* 2017, **8**, Article 1857.
6. G. Huys, M. Cnockaert, J. M. Janda, J. Swings // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003, **53**, 807-810.
7. N. Asoshima, M. Matsuda, K. Shigemura, M. Honda, H. Yoshida, H. Hiwaki, et al. // *Jpn. J. Infect. Dis.* 2014, **67**, 139-140.
8. Ooka T., Ogura Y., Katsura K., Seto K., Kobayashi H., Kawano K., Tokuoka E., Furukawa M., Harada S., Yoshino S., Seto J., Ikeda T., Yamaguchi K., Murase K., Gotoh Y., Imuta M., Nishi J., T. A. Gomes Gomes, Beutin L., Hayashi T. // *Genome Biol. Evol.* 2015, **7**, 3170-3179.
9. T. J. Inglis, A. J. Merritt, N. Bzdyl, S. Lansley, M. N. Urosevic // *New Microbes New Infect.* 2015, **8**, 171-173.
10. H. Zheng, A. S. Shashkov, Y. Xiong, O. I. Naumenko, H. Wang, S. N. Senchenkova, J. Wang, Y. A. Knirel // *Carbohydr. Res.* 2017, **446-447**, 28-31.
11. O. I. Naumenko, H. Zheng, S. N. Senchenkova, H. Wang, Q. Li, A. S. Shashkov, J. Wang, Y. A. Knirel, Y. Xiong. // *Carbohydr. Res.* 2017, **449**, 17-22.
12. O. I. Naumenko, H. Zheng, Y. Xiong, S. N. Senchenkova, H. Wang, A. S. Shashkov, A. O. Chizhov, Q. Li, Y. A. Knirel, J. Wang // *Carbohydr. Res.* 2018, **457**, 25-31.
13. O. I. Naumenko, Y. Xiong, H. Zheng, S. N. Senchenkova, H. Wang, A. S. Shashkov, Q. Li, J. Wang, Y. A. Knirel // *Carbohydr. Res.* 2018, **461**, 80-84.

14. H. Zheng, O. I. Naumenko, H. Wang, Y. Xiong, J. Wang, A. S. Shashkov, Q. Li, Y. A. Knirel // *Carbohydr. Res.* 2019, **480**, 73-79.
15. O. I. Naumenko, H. Zheng, A. S. Shashkov, Y. Sun, S. N. Senchenkova, L. Bai, J. Wang, H. Wang, Q. Li, Y. A. Knirel, Y. Xiong // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, **142**, 609-614.
16. O. I. Naumenko, X. Guo, S. N. Senchenkova, P. Geng, A. V. Perepelov, A. S. Shashkov, B. Liu, Y. A. Knirel // *Carbohydr. Res.* 2018, 462, 34-38.
17. A. V. Perepelov, O. I. Naumenko, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel // *Russ. Chem. Bull.*, 2018, 67, 2131-2134.
18. S. N. Senchenkova, W. Hou, O. I. Naumenko, P. Geng, A. S. Shashkov, A. V. Perepelov, B. Yang, Y. A. Knirel // *Carbohydr. Res.* 2018, 460, 47-50.
19. Ю. А. Книрель, О. И. Науменко, С. Н. Сенченкова, А. В. Перепелов // *Успехи химии.* 2019, **88**, 406-424.
20. О. И. Науменко, С. Н. Сенченкова, Ю. А. Книрель // *Биоорганическая химия* 2019, **45**, 576-587.
21. O. I. Naumenko, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, H. Zheng, Y. Xiong, H. Wang, J. Wang // *Abstr. 19th European Carbohydrate Symposium*, 2–6 July 2017, Barcelona, Spain. P283.
22. O. I. Naumenko, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, H. Zheng, Y. Xiong, H. Wang, J. Wang // *Abstr. 15th Finnish Microbial Pathogenesis Days*, 21–23 August 2017, Helsinki, Finland. P. 18.
23. O. I. Naumenko, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, A. O. Chizhov, Y. A. Knirel // *Abstr. 29th International Carbohydrate Symposium*, 14–19 July 2018, Lisbon, Portugal. P-A4.
24. О. И. Науменко, С. Н. Сенченкова, А. С. Шашков, Ю. А. Книрель // *Тезисы IV Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология»*, 23–28 сентября 2018 г., Киров. С. 79-80.



25. O. I. Naumenko, S.N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, H. Zheng, Y. Xiong, H. Wang, Q. Li, J. Wang // *20th European Carbohydrate Symposium*, 30 June–5 July 2019, Leiden, The Netherlands. P165.
26. Y. A. Knirel, M. A. Valvano // *Encyclopedia of Biophysics*, G. C. K. Roberts, ed. Springer, Heidelberg-New York-Dordrecht-London, 2013. P. 162-168.
27. S. T. Islam, J. S. Lam // *Can. J. Microbiol.*, 2014, **60**, 697-716.
28. L. M. Willis, C. Whitfield. *Carbohydr. Res.*, 2013, **378**, 35-44.
29. J. Ø. Duus, C. H. Gotfredsen, K. Bock // *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 4589-4614.
30. А. Ф. Свиридов, О. С. Чижов // *Биоорг. химия*, 1976, **2**, 315-350.
31. G. O. Aspinall // *The Polysaccharides*, Vol. 1. G.O. Aspinall ed. Academic Press, New York, 1982, P. 35-131.
32. Y. A. Knirel, E. V. Vinogradov, A. J. Mort // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1989, **47**, 167-202.
33. Y. A. Knirel, A. V. Perepelov. // *Aust. J. Chem.* 2002, **55**, 69-72.
34. K. A. Hughes, I. W. Sutherland, J. Clark, M. V. Jones // *J. Appl. Microbiol.* 1998, **85**, 583-590.
35. S. Ernst, R. Langer, C. L. Cooney, R. Sasisekharan // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995, **30**, 387-444.
36. G. O Aspinall., E. Przybylski, R. G. S. Ritchie, Chung On Wong // *Carbohydr. Res.* 1978, **66**, 225-243.
37. B. A. Dmitriev, Y. A. Knirel, N. K. Kochetkov, I. L. Hofman // *Eur. J. Biochem.* 1976, **66**, 559-566.
38. F.-P. Tsui, R. Schneerson, R. A. Boykins, A. B. Karpas, W. Egan // *Carbohydr. Res.* 1981, **97**, 293-306.
39. Erbing C., Granath K., Kenne L., Lindberg B. // *Carbohydr. Res.* 1976, **47**, C5-C7.
40. E. Vinogradov, Z. Sidorczyk, Y. A. Knirel // *Aust. J. Chem.* 2002, **55**, 61-67.
41. E. Vinogradov, M. B. Perry // *Eur. J. Biochem.* 2000, **267**, 2439-2446.
42. B. Bartodziejska, F. V. Toukach, E. V. Vinogradov, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, A. Ziolkowski, J. Czaja, M. B. Perry, Y. A. Knirel, A. Rozalski // *Eur. J. Biochem.* 2000, **267**, 6888-6896.

43. E. Vinogradov, F. St. Michael, A. D. Cox // *Carbohydr. Res.* 2018, **468**, 69-72.
44. Bystrova O. V., Knirel Y. A., Lindner B., Kocharova N. A., Kondakova A. N., Zähringer U., Pier G. B. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006, **46**, 85-99.
45. Shashkov A. S., Vinogradov E. V., Knirel Y. A., Nifant'ev N. E., Kochetkov N. K., Dabrowski J., Kholodkova E. V., Stanislavsky E. S. // *Carbohydr. Res.* 1993, **241**, 177-188.
46. Yokota S.-I., Kaya S., Kawamura T., Araki Y., Ito E. // *J. Biochem.* 1986, **99**, 1551-1561.
47. J. J. Kenyon, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, M. M. Shneider, A. V. Popova, Y. A. Knirel, R. M. Hall. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, **144**, 857-862.
48. M. Curvall, B. Lindberg, J. Lönngren // *Carbohydr. Res.* 1975, **42**, 73-82.
49. Erbing C., Kenne L., Lindberg B., Hammarström S. // *Carbohydr. Res.* 1978, **60**, 400-403.
50. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Sviridov A. F. // *Carbohydr. Res.* 1970, **14**, 277-285.
51. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Sviridov A. F. // *Methods Carbohydr. Chem. Vol. VIII: General methods* // Ed. Whistler R.L., BeMiller J.N. Acad. press, NY-London-Toronto-Sydney-San Francisco, 1980. P. 123-125.
52. Goldstein I.J., Hay G. W., Lewis B. A., Smith F. // *Methods Carbohydr. Chem. Vol. V: General polysaccharides* // Ed. Whistler R.L., BeMiller J.N. Acad. press, NY, 1965. P. 361-370.
53. Perepelov A. V., Guo X., Filatov A. V., Liu B., Knirel Y. A. // *Carbohydr. Res.* 2015, **416**, 32-36.
54. Perepelov A. V., Filatov A. V., Wang Q., L'vov V. L., Quan Y., Shashkov A. S., Wang L., Knirel Y. A. // *Carbohydr. Res.* 2014. V. 388. P. 30-36.
55. L'vov V. L., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. // *Carbohydr. Res.* 1984. V. 126. P. 249-259.
56. Y. S. Ovod, E. L. Zdrovenko, A. S. Shashkov, N. A. Kocharova, Y. A. Knirel. Structure of the O polysaccharide and serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. *ribicola* NCPPB 1010. *Eur. J. Biochem.* 2000, **267**, 2372-2379.

57. D. Oxley, S. G. Wilkinson // *Carbohydr. Res.* 1990, **204**, 85-91.
58. B. Lindberg, J. Lönngren, W. Nimmich, U. Ruden // *Acta Chem. Scand.* 1973, **27**, 3787-3790.
59. Кочарова Н.А., Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Холодкова Е. В. // *Биоорган. хим.* 1988, **14**, 697-700.
60. Senchenkova S. N., Perepelov A. V., Cedzynski M. Swierzko A.S., Ziolkowski A., Shashkov A.S., Kaca W., Knirel Y. A., Jansson P.-E. // *Carbohydr. Res.* 2004, **339**, 1347-1352.
61. A. S. Shashkov, B. Yang, S. N. Senchenkova, A. V. Perepelov, B. Liu, Y. A. Knirel // *Carbohydr. Res.* 2016, **426**, 26-32.
62. L. Feng, S. N. Senchenkova, J. Yang, A. S. Shashkov, J. Tao, H. Guo, G. Zhao, Y. A. Knirel, P. Reeves, L. Wang // *J. Bacteriol.* 2004, **186**, 383-392.
63. Shashkov A. S., Wang T., Perepelov A. V., Weintraub A., Liu B., Widmalm G., Knirel Y. A. // *Carbohydr. Res.* 2015, **417**, 11-14.
64. Han R., Perepelov A. V., Wang Y., Filatov A.V., Wang M., Shashkov A. S., Wang L., Knirel Y. A. // *Carbohydr. Res.* 2017, **443-444**, 49-52.
65. Y. A. Knirel, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, A. V. Perepelov, S. D. Shevelev, B. Liu, L. Feng, L. Wang // *Adv. Sci. Lett.* 2009, **2**, 384-387.
66. Knirel Y. A., Paredes L., Jansson P.-E., Weintraub A., Widmalm G., Albert M. J. // *Eur. J. Biochem.* 1995, **232**, 391-396.
67. Jann B., Shashkov A. S., Kochanowski H., Jann K. // *Carbohydr. Res.* 1995, **277**, 353-358.
68. L'vov V. L., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Arifulina A. E., Senchenkova S. N., Yakovlev A. V., Dmitriev B. A. // *Carbohydr. Res.* 1995, **279**, 183-192.
69. Tarcsay L., Jann B., Jann K. // *Eur. J. Biochem.* 1971, **23**, 505-514.
70. S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, N. K. Kochetkov, K. Zych, Z. Sidoreczyk // *Carbohydr. Res.* 1996, **293**, 71-78.
71. Grimmecke H.-D., Mamat U., Kuhn I., Shashkov A. S., Knirel Y. A. // *Carbohydr. Res.* 1994, **252**, 309-316.
72. Aspinall G. O., Baillie J. // *J. Chem. Soc.* 1963, 1702-1714.

73. Dmitriev B. A., Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // *Eur. J. Biochem.* 1982, **125**, 229-237.
74. Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Pier G. B. // *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 11291-11295.
75. Anderson M., Carlin N., Leontein K., Lindquist U., Slettengren, K. // *Carbohydr. Res.* 1989, **185**, 211-223.
76. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // *Eur. J. Biochem.* 1987, **163**, 627-637.
77. Vinogradov E. V., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K. // *Carbohydr. Res.* 1987, **170**, C1-C4.
78. Perepelov A. V., Babicka D., Senchenkova S. N., Shashkov A. S., Moll H., Rozalski A., Zähringer U., Knirel Y. A. // *Carbohydr. Res.* 2001, **331**, 195-202.
79. Perepelov A. V., Babicka D., Shashkov A. S., Senchenkova S. N., Rozalski A., Knirel Y. A. // *Carbohydr. Res.* 2000, **328**, 229-234.
80. Perepelov A. V., Senchenkova S. N., Shashkov A. S., Komandrova N. A., Tomshich S. V., Shevchenko L. S., Knirel Y. A., Kochetkov N. K. // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2000, 363-366.
81. Kondakova A. N., Perepelov A. V., Bartodziejska B., Shashkov A. S., Senchenkova S. N., Wykrota M., Knirel Y. A., Rozalski A. // *Carbohydr. Res.* 2001, **333**, 241-249.
82. Филатов А. В. // Установление строения О-специфических полисахаридов энтеробактерий *Enterobacter cloacae* и *Escherichia coli*. Сольволиз трифторуксусной кислотой как удобный метод избирательного расщепления гликозидных связей: диссертация кандидата химических наук. ИОХ РАН, Москва, 2016.
83. Lvov V. L., Filatov A. V., Perepelov A. V., Shpirt A. M., Shashkov A. S., Chizhov A. O., Knirel Y. A. // *Mendeleev Commun.* 2016, **26**, 279-281.
84. Perepelov A. V., Filatov A. V., Wang M., Shashkov A. S., Wang L., Knirel Y. A. // *Carbohydr. Res.* 2016, **427**, 55-59.
85. Senchenkova S.N., Guo X., Filatov A.V., Perepelov A.V., Liu B., Shashkov A.S., Knirel Y.A. 2016. *Carbohydr. Res.*, **432**, 83-87.

86. Y. A. Knirel, P. A. Ivanov, S. N. Senchenkova, O. I. Naumenko, O. G. Ovchinnikova, A. S. Shashkov, A. K. Golomidova, V. V. Babenko, E. E. Kulikov, A. V. Letarov. 2019. *Int. J. Biol. Macromol.*, **124**, 389-395.
87. Y.A. Knirel. 1990. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **17**, 273-304.
88. O.G. Ovchinnikova, N.A. Kocharova, A.N. Kondakova, M. Bialczak-Kokot, A.S. Shashkov, , Y.A. Knirel, A. Rozalski. 2011. *Carbohydr. Res.* **346**, 2638-2641.
89. M. Bera, A. Adak, B. Mukhopadhyay. 2019. *Carbohydr. Res.* **485**. Article 107817.
90. C. Fontana, A. Weintraub, G. Widmalm, 2015. *Chemistry Open* **4**, 47-55.
91. K. H. Jonsson, A. Weintraub, G. Widmalm. 2006. *Carbohydr. Res.* **341**, 2986-2989.
92. E. C. Medina, G. Widmalm, A. Weintraub, P. A. Vial, M. M. Levine, A. A. Lindberg // *Eur. J. Biochem.* 1994, **224**, 191-196.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

В таблицах приведены химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , м.д.). Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  показаны курсивом, химические сдвиги ЯМР  $^{13}\text{C}$  связевых атомов углерода ( $\delta$ , м.д.) выделены полужирным шрифтом.

**Таблица П1.** Химические сдвиги  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР О-полисахарида и трисахарида **1** из *E. albertii* O1

| Моносахаридный остаток                                      | C-1         | C-2         | C-3         | C-4         | C-5         | C-6               |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
|   | <i>H-1</i>  | <i>H-2</i>  | <i>H-3</i>  | <i>H-4</i>  | <i>H-5</i>  | <i>H-6a, H-6b</i> |
| <b>О-полисахарид</b>  |             |             |             |             |             |                   |
| $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$     | 97,5        | 53,6        | <b>79,9</b> | 69,2        | 72,6        | 61,1              |
|   | <i>5,05</i> | <i>3,88</i> | <i>3,83</i> | <i>3,53</i> | <i>3,63</i> | <i>3,75, 3,79</i> |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc3NAcA-(1 $\rightarrow$ | 101,8       | 57,6        | 53,6        | <b>79,1</b> | 76,5        | 173,9             |
|   | <i>4,69</i> | <i>3,76</i> | <i>4,03</i> | <i>3,88</i> | <i>3,96</i> |                   |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-ManpNAc3NAcA-(1 $\rightarrow$ | 100,9       | 52,4        | 54,7        | <b>71,4</b> | 79,5        | 174,8             |
|   | <i>4,77</i> | <i>4,27</i> | <i>4,21</i> | <i>3,94</i> | <i>3,87</i> |                   |
| <b>Трисахарид 1<math>\alpha</math></b>                      |             |             |             |             |             |                   |
| $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-GlcpNAc                      | 92,2        | 54,4        | <b>80,3</b> | 70,0        | 72,4        | 62,0              |
|   | <i>5,09</i> | <i>3,95</i> | <i>3,93</i> | <i>3,54</i> | <i>3,87</i> | <i>3,79, 3,83</i> |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc3NAcA-(1 $\rightarrow$ | 102,0       | 58,1        | 53,6        | <b>78,6</b> | 77,8        |                   |
|   | <i>4,73</i> | <i>3,75</i> | <i>4,07</i> | <i>3,88</i> | <i>3,89</i> |                   |
| $\beta$ -D-ManpNAc3NAcA-(1 $\rightarrow$                    | 100,5       | 52,4        | 54,8        | 67,9        | 80,4        |                   |
|   | <i>4,72</i> | <i>4,33</i> | <i>4,01</i> | <i>3,67</i> | <i>3,76</i> |                   |
| <b>Трисахарид 1<math>\beta</math></b>                       |             |             |             |             |             |                   |
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc                       | 96,3        | 56,9        | <b>82,7</b> | 70,1        | 76,7        | 62,1              |
|   | <i>4,65</i> | <i>3,75</i> | <i>3,74</i> | <i>3,52</i> | <i>3,46</i> | <i>3,76, 3,89</i> |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc3NAcA-(1 $\rightarrow$ | 101,0       | 58,3        | 54,2        | <b>78,5</b> | 78,0        |                   |
|   | <i>4,88</i> | <i>3,77</i> | <i>4,07</i> | <i>3,88</i> | <i>3,88</i> |                   |
| $\beta$ -D-ManpNAc3NAcA-(1 $\rightarrow$                    | 100,5       | 52,3        | 54,8        | 67,9        | 80,3        |                   |
|   | <i>4,76</i> | <i>4,37</i> | <i>4,01</i> | <i>3,67</i> | <i>3,76</i> |                   |

Химические сдвиги N-ацетильных групп:  $\delta_{\text{H}}$  1,86, 1,96, 1,98, 2,04;  $\delta_{\text{C}}$  23,0-23,6 (Me), 174,6-176,6 (CO); N-ацетимидоильной группы:  $\delta_{\text{H}}$  2,19;  $\delta_{\text{C}}$  20,0-20,3 (Me) and 168,1-168,2 (C=N).



**Таблица П2.** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  полисахаридов из *E. albertii* O2

| Моносахаридный остаток   | C-1         | C-2         | C-3         | C-4         | C-5         | C-6                 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
|  | <i>H-1</i>  | <i>H-2</i>  | <i>H-3</i>  | <i>H-4</i>  | <i>H-5</i>  | <i>H-6 (6a, 6b)</i> |
| <b>О-Дезацетилированный О-полисахарид (ДПС)</b>  |             |             |             |             |             |                     |
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$   | 101,8       | 56,9        | <b>82,8</b> | 70,1        | 77,1        | 62,2                |
| <b>A</b>   | <i>4,66</i> | <i>3,76</i> | <i>3,84</i> | <i>3,54</i> | <i>3,48</i> | <i>3,75, 3,92</i>   |
| $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$   | 100,9       | 67,7        | <b>78,6</b> | 70,8        | 68,3        | 16,6                |
| <b>B</b>   | <i>5,02</i> | <i>3,83</i> | <i>3,94</i> | <i>3,85</i> | <i>4,22</i> | <i>1,17</i>         |
| $\rightarrow 3,4$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$                                       | 100,5       | 57,3        | <b>77,5</b> | <b>74,0</b> | 77,0        | 61,5                |
| <b>C</b>   | <i>4,63</i> | <i>3,85</i> | <i>4,09</i> | <i>3,73</i> | <i>3,54</i> | <i>3,84, 3,97</i>   |
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$   | 101,6       | 57,1        | <b>82,0</b> | 71,0        | 77,1        | 63,1                |
| <b>D</b>   | <i>4,72</i> | <i>3,66</i> | <i>3,78</i> | <i>3,31</i> | <i>3,42</i> | <i>3,62, 3,97</i>   |
| $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$  | 99,3        | 69,3        | 70,6        | 73,4        | 68,0        | 16,9                |
| <b>E</b>   | <i>5,01</i> | <i>3,82</i> | <i>3,92</i> | <i>3,80</i> | <i>4,72</i> | <i>1,26</i>         |
| <b>Модифицированный (О-дезацетилированный и деградированный по Смитсу) О-полисахарид (МПС)</b> |             |             |             |             |             |                     |
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$   | 101,7       | 55,9        | <b>82,6</b> | 69,8        | 77,0        | 62,1                |
| <b>A</b>   | <i>4,67</i> | <i>3,78</i> | <i>3,84</i> | <i>3,53</i> | <i>3,51</i> | <i>3,77, 3,94</i>   |
| $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$   | 100,7       | 67,5        | <b>78,7</b> | 70,7        | 68,1        | 16,4                |
| <b>B</b>   | <i>5,03</i> | <i>3,83</i> | <i>3,97</i> | <i>3,86</i> | <i>4,26</i> | <i>1,18</i>         |
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$   | 100,2       | 56,8        | <b>81,6</b> | 69,9        | 76,6        | 62,0                |
| <b>C</b>   | <i>4,67</i> | <i>3,76</i> | <i>3,76</i> | <i>3,55</i> | <i>3,46</i> | <i>3,76, 3,94</i>   |
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$   | 100,3       | 56,0        | <b>82,6</b> | 70,0        | 77,3        | 62,0                |
| <b>D</b>   | <i>4,65</i> | <i>3,77</i> | <i>3,84</i> | <i>3,53</i> | <i>3,47</i> | <i>3,76, 3,94</i>   |

Химические сдвиги  $^1\text{H}$  ЯМР выделены курсивом.

Химические сдвиги N-ацетильных групп:  $\delta_{\text{H}}$  1,99-2,09;  $\delta_{\text{C}}$  23,2-23,9 (Me) и 175,5-175,6 (CO).



**Таблица ПЗ.** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  О-полисахарида и олигозилполиолов из *E. albertii* О4.

| Моносахаридный остаток  | C-1        | C-2         | C-3         | C-4        | C-5        | C-6                 |
|-------------------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|---------------------|
|                         | <i>H-1</i> | <i>H-2</i>  | <i>H-3</i>  | <i>H-4</i> | <i>H-5</i> | <i>H-6 (6a, 6b)</i> |
| <b>О-полисахарид</b>    |            |             |             |            |            |                     |
| →3)-β-D-GlcpNAc-(1→     | 103,3      | 55,9        | <b>79,1</b> | 72,7       | 77,0       | 62,1                |
| <b>A</b>                | 4,78       | 3,78        | 3,71        | 3,56       | 3,44       | 3,68, 3,88          |
| →3)-α-D-GalpNAc-(1→     | 98,1       | 50,3        | <b>75,7</b> | 70,1       | 71,8       | 62,0                |
| <b>B</b>                | 5,43       | 4,18        | 3,98        | 4,18       | 3,92       | 3,75, 3,75          |
| →2)-β-D-Galp-(1→        | 103,5      | <b>77,6</b> | 75,1        | 70,4       | 76,2       | 62,0                |
| <b>C</b>                | 4,61       | 3,64        | 3,76        | 3,92       | 3,64       | 3,75, 3,75          |
| →2)-α-L-Fucp-(1→        | 97,9       | <b>73,4</b> | 69,2        | 73,3       | 68,2       | 16,6                |
| <b>D</b>                | 5,33       | 3,85        | 3,72        | 3,70       | 4,23       | 1,19                |
| →2)-α-L-Rhap-(1→        | 97,7       | <b>79,8</b> | 71,3        | 73,8       | 70,3       | 18,0                |
| <b>E</b>                | 5,15       | 4,07        | 3,91        | 3,33       | 3,87       | 1,25                |
| <b>Олигозилполиол 5</b> |            |             |             |            |            |                     |
| β-D-Galp-(1→            | 106,0      | 71,9        | 73,8        | 69,9       | 76,3       | 62,1                |
| <b>C</b>                | 4,48       | 3,53        | 3,63        | 3,93       | 3,68       | 3,78                |
| →3)-α-D-GalpNAc-(1→     | 100,8      | 49,9        | <b>78,1</b> | 69,8       | 72,5       | 62,3                |
| <b>B</b>                | 5,15       | 4,41        | 4,05        | 4,31       | 4,07       | 3,79, 3,81          |
| →3)-D-GlcNAc-ol         | 61,5       | 55,2        | <b>77,3</b> | 72,0       | 70,9       | 64,2                |
| <b>A*</b>               |            | 4,29        | 4,12        | 3,60       | 3,69       | 3,68 3,81           |
| <b>Олигозилполиол 7</b> |            |             |             |            |            |                     |
| β-D-Galp-(1→            | 106,1      | 71,2        | 73,8        | 59,9       | 76,2       | 1,8                 |
| <b>C</b>                | 4,46       | 3,53        | 3,64        | 3,92       | 3,67       | 76                  |
| →3)-α-D-GalpNAc-(1→     | 98,6       | 49,7        | <b>78,3</b> | 59,8       | 71,9       | 2,2                 |
| <b>B</b>                | 5,44       | 4,36        | 3,92        | 4,26       | 3,93       | 77                  |

**Таблица ПЗ (продолжение).** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  О-полисахарида и олигосилполиолов из *E. albertii* О4.

|  |       |             |             |      |      |            |
|--|-------|-------------|-------------|------|------|------------|
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ | 103,7 | 55,7        | <b>79,2</b> | 72,1 | 76,9 | 61,6       |
| <b>A</b>   | 4,72  | 3,83        | 3,76        | 3,71 | 3,44 | 3,76, 3,89 |
| $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$   | 99,4  | <b>80,7</b> | 71,0        | 73,4 | 70,5 | 17,9       |
| <b>E</b>   | 5,25  | 4,08        | 3,88        | 3,35 | 3,79 | 1,27       |
| $\rightarrow 2$ )-L-Fuc-ol                             | 62,7  | <b>77,5</b> | 71,0        | 74,1 | 67,0 | 20,0       |
| <b>D*</b>  | 3,82  | 4,04        | 3,73        | 3,45 | 4,11 | 1,26       |

Химические сдвиги  $^1\text{H}$  ЯМР выделены курсивом.

Химические сдвиги N-ацетильных групп:  $\delta_{\text{H}}$  2,03-2,08,  $\delta_{\text{C}}$  23,4-23,9 (Me), 174,8-176,0 (CO).

**Таблица П4.** Данные масс-спектров высокого разрешения с ионизацией электрораспылением и регистрацией положительных ионов олигосахаридов **2-4** и олигозилполиолов **5-7** из ОПС *E. albertii* О4.

| Олиго-сахарид | Моносахаридный состав                         | Молекулярная масса, Да | Пик иона $[M+Na]^+$ при $m/z$ |              |
|---------------|---|------------------------|-------------------------------|--------------|
|               |   |                        | экспериментальный             | рассчитанный |
| <b>2</b>      | Hex(HexNAc) <sub>2</sub>                      | 586,2221               | 609,2127                      | 609,2114     |
| <b>3</b>      | Hex(HexNAc) <sub>2</sub> 6dHex                | 732,2800               | 755,2690                      | 755,2693     |
| <b>4</b>      | Hex(HexNAc) <sub>2</sub> (6dHex) <sub>2</sub> | 878,3380               | 901,3281                      | 901,3272     |
| <b>5</b>      | HexHexNAcHexNAc-ol                            | 588,2378               | 611,2286                      | 611,2270     |
| <b>6</b>      | Hex(HexNAc) <sub>2</sub> 6dHex-ol             | 734,2957               | 757,2779                      | 757,2849     |
| <b>7</b>      | Hex(HexNAc) <sub>2</sub> 6dHex6dHex-ol        | 880,3536               | 903,3415                      | 903,3428     |

Hex, 6dHex, HexNAc, 6dHex-ol и HexNAc-ol обозначают гексозу, 6-дезоксигексозу, N ацетилгексозамин, 6-дезоксигекситол и N-ацетилгексозаминитол, соответственно.

**Таблица П5.** Данные масс-спектров высокого разрешения с ионизацией электрораспылением олигосахаридов, полученных из О-полисахарида *E. coli* O60 сольволизом CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H.

| Олигосахарид                        | Молекулярная масса, Да | Пик иона [M+Na] <sup>+</sup> при <i>m/z</i> |              |
|-------------------------------------|------------------------|---|--------------|
|                                     |                        | экспериментальный                           | рассчитанный |
| Фракция IV                          |                        |   |              |
| Hex <sub>1</sub> 6dHex <sub>1</sub> | 326.1213               | 349.1101                                    | 349.1105     |
| Фракция III                         |                        |   |              |
| Hex <sub>1</sub> 6dHex <sub>2</sub> | 472.1792               | 495.1670                                    | 495.1684     |
| Фракция II                          |                        |   |              |
| Hex <sub>2</sub> 6dHex <sub>2</sub> | 634.2320               | 657.2182                                    | 657.2213     |
| Фракция I                           |                        |   |              |
| Hex <sub>2</sub> 6dHex <sub>5</sub> | 1072.4058              | 1095.3927                                   | 1027.3950    |
| Hex <sub>3</sub> 6dHex <sub>4</sub> | 1088.4007              | 1111.3877                                   | 1111.3899    |
| Hex <sub>4</sub> 6dHex <sub>3</sub> | 1104.3956              | 1127.3777                                   | 1127.3848    |
| Hex <sub>3</sub> 6dHex <sub>5</sub> | 1234.4586              | 1257.4455                                   | 1257.4478    |
| Hex <sub>4</sub> 6dHex <sub>4</sub> | 1250.4535              | 1273.4382                                   | 1273.4427    |
| Hex <sub>3</sub> 6dHex <sub>6</sub> | 1380.5165              | 1403.5021                                   | 1403.5057    |
| Hex <sub>4</sub> 6dHex <sub>5</sub> | 1396.5114              | 1419.4972                                   | 1419.5006    |
| Hex <sub>5</sub> 6dHex <sub>4</sub> | 1412.5063              | 1435.4862                                   | 1435.4955    |

Hex и 6dHex обозначают гексозу и 6-дезоксигексозу соответственно.

**Таблица Пб.** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  полисахарида *E. coli* O60.

| Моносахаридный остаток                                 | C-1<br><i>H-1</i> | C-2<br><i>H-2</i> | C-3<br><i>H-3</i> | C-4<br><i>H-4</i> | C-5<br><i>H-5</i> | C-6<br><i>H-6 (6a, 6b)</i> |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$    | 104.3             | 71.6              | 72.9              | <b>78.9</b>       | 76.7              | 62.0                       |
| <b>A</b>   | <i>4.48</i>       | <i>3.58</i>       | <i>3.78</i>       | <i>4.01</i>       | <i>3.76</i>       | <i>3.76, 3.76</i>          |
| $\rightarrow 2,3$ )- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ | 101.6             | <b>76.3</b>       | <b>78.8</b>       | 73.3              | 70.9              | 17.6                       |
| <b>B</b>   | <i>4.84</i>       | <i>4.27</i>       | <i>4.02</i>       | <i>3.71</i>       | <i>4.17</i>       | <i>1.27</i>                |
| $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$   | 100.1             | <b>79.5</b>       | 70.7              | 73.7              | 70.9              | 17.9                       |
| <b>C</b>   | <i>5.28</i>       | <i>4.21</i>       | <i>3.84</i>       | <i>3.48</i>       | <i>3.86</i>       | <i>1.34</i>                |
| $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$                      | 102.2             | 69.7              | 70.8              | 70.7              | 73.3              | 62.8                       |
| <b>D</b>   | <i>5.31</i>       | <i>3.86</i>       | <i>3.83</i>       | <i>3.99</i>       | <i>3.96</i>       | <i>3.73, 3.80</i>          |

Химические сдвиги  $^1\text{H}$  ЯМР выделены курсивом.

**Таблица П7.** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  полисахаридов и олигосахаридов из *E. albertii* O5.

| Моносахаридный остаток                          | C-1               | C-2               | C-3         | C-4         | C-5  | C-6          |
|---|-------------------|-------------------|-------------|-------------|------|--------------|
|   | H-1               | H-2               | H-3         | H-4         | H-5  | H-6 (6a, 6b) |
| <b>О-полисахарид</b>                            |                   |                   |             |             |      |              |
| →3)-β-D-GalpNAc-(1→                             | 102,5             | 52,9              | <b>79,3</b> | 68,9        | 76,3 | 62,1         |
| <b>A</b>  | 4,63              | 4,03              | 3,83        | 4,07        | 3,76 | 3,76, 3,81   |
| →6)-β-D-Galf-(1→                                | 110,4             | 82,5              | 78,1        | 84,4        | 71,0 | <b>72,5</b>  |
| <b>B</b>  | 5,09              | 4,08              | 4,05        | 4,03        | 4,00 | 3,74, 4,01   |
| →4)-β-D-Galp6Ac-(1→                             | 104,7             | 72,2              | 73,2        | <b>78,4</b> | 73,5 | 63,5         |
| <b>C<sub>Ac</sub></b>                           | 4,49              | 3,58              | 3,71        | 4,00        | 3,95 | 4,09, 4,36   |
| →4)-β-D-Galp-(1→                                | 104,7             | 72,2              | 73,2        | <b>78,0</b> | 76,6 | 61,4         |
| <b>C</b>  | 4,48              | 3,58              | 3,71        | 3,97        | 3,73 | 3,69, 3,74   |
| →4)-α-D-GlcpNAc-(1→                             | 99,5 <sup>a</sup> | 54,8 <sup>b</sup> | 70,3        | <b>80,4</b> | 71,7 | 60,9         |
| <b>D</b>  | 4,87 <sup>a</sup> | 3,94              | 3,93        | 3,71        | 4,23 | 3,68, 3,77   |
| <b>О-Дезацетилированный О-полисахарид (ДПС)</b> |                   |                   |             |             |      |              |
| →3)-β-D-GalpNAc-(1→                             | 102,6             | 52,9              | <b>79,3</b> | 69,0        | 76,3 | 62,1         |
| <b>A</b>  | 4,63              | 4,03              | 3,83        | 4,08        | 3,76 | 3,77, 3,81   |
| →6)-β-D-Galf-(1→                                | 110,4             | 82,6              | 78,1        | 84,4        | 70,9 | <b>72,5</b>  |
| <b>B</b>  | 5,10              | 4,09              | 4,07        | 4,05        | 4,01 | 3,75, 4,06   |
| →4)-β-D-Galp-(1→                                | 104,7             | 72,2              | 73,5        | <b>78,1</b> | 76,6 | 61,4         |
| <b>C</b>  | 4,48              | 3,59              | 3,71        | 3,98        | 3,74 | 3,69, 3,74   |
| →4)-α-D-GlcpNAc-(1→                             | 99,8              | 54,7              | 70,4        | <b>80,4</b> | 71,7 | 60,9         |
| <b>D</b>  | 4,89              | 3,95              | 3,93        | 3,71        | 4,23 | 3,68, 3,78   |
| <b>Тетрасахарид 8</b>                           |                   |                   |             |             |      |              |
| →3)-α-D-GalpNAc                                 | 92,5              | 50,3              | <b>76,9</b> | 70,2        | 71,9 |              |
| <b>Aα</b>                                       | 5,21              | 4,29              | 3,94        | 3,96        | 4,12 |              |
| →3)-β-D-GalpNAc                                 | 96,4              | 53,9              | <b>79,9</b> | 69,3        | 76,3 |              |
| <b>Aβ</b>                                       | 4,71              | 3,96              | 3,77        | 4,08        | 3,70 |              |

**Таблица П7 (продолжение).** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  полисахаридов и олигосахаридов из *E. albertii* O5.

|  |                    |      |      |             |      |             |
|--|--------------------|------|------|-------------|------|-------------|
| $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$    | 110,4 <sup>c</sup> | 82,7 | 78,2 | 84,2        | 70,8 | <b>72,5</b> |
| <b>B</b>   | 5,13 <sup>c</sup>  | 4,08 | 4,06 | 4,05        | 4,00 | 3,76,4,01   |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Galp6Ac-(1 $\rightarrow$ | 104,6              | 72,2 | 73,3 | <b>78,5</b> | 73,6 | 63,5        |
| <b>C<sub>Ac</sub></b>                                  | 4,51               | 3,58 | 3,72 | 4,01        | 3,96 | 4,11, 4,37  |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$    | 104,7              | 72,2 | 73,3 | <b>78,2</b> | 76,7 | 61,3        |
| <b>C</b>   | 4,50               | 3,59 | 3,72 | 3,98        | 3,74 | 3,70, 3,75  |
| $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$                   | 100,1 <sup>d</sup> | 55,4 | 71,8 | 71,0        | 73,3 | 61,5        |
| <b>D</b>   | 4,89 <sup>d</sup>  | 3,92 | 3,78 | 3,54        | 4,17 | 3,80        |
| Трисахарид <b>9a</b>                                   |                    |      |      |             |      |             |
| $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Galp                     | 97,8               | 73,2 | 74,0 | 70,3        | 75,2 | <b>70,1</b> |
| <b>B<math>\beta</math></b>                             | 4,58               | 3,50 | 3,64 | 3,94        | 3,89 | 3,94, 4,13  |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Galp6Ac-(1 $\rightarrow$ | 104,6              | 72,2 | 73,3 | <b>78,5</b> | 73,6 | 63,5        |
| <b>C<sub>Ac</sub></b>                                  | 4,51               | 3,58 | 3,72 | 4,01        | 3,96 | 4,11, 4,37  |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$    | 104,7              | 72,2 | 73,3 | <b>78,2</b> | 76,7 | 61,3        |
| <b>C</b>   | 4,50               | 3,59 | 3,72 | 3,98        | 3,74 | 3,70, 3,75  |
| $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$                   | 100,1 <sup>d</sup> | 55,4 | 71,8 | 71,0        | 73,3 | 61,5        |
| <b>D</b>   | 4,89 <sup>d</sup>  | 3,92 | 3,78 | 3,54        | 4,17 | 3,80        |
| Трисахарид <b>9b</b> (из ДПС)                          |                    |      |      |             |      |             |
| $\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Galp                    | 93,6               | 69,5 | 70,3 | 70,7        | 70,7 | <b>70,7</b> |
| <b>B<math>\alpha</math></b>                            | 5,29               | 3,82 | 3,87 | 4,03        | 4,28 | 3,86, 4,09  |
| $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Galp                     | 97,7               | 73,1 | 73,9 | 70,1        | 75,1 | <b>70,5</b> |
| <b>B<math>\beta</math></b>                             | 4,61               | 3,51 | 3,66 | 3,97        | 3,91 | 3,90, 4,09  |
| $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$    | 104,5              | 72,1 | 73,4 | <b>78,2</b> | 76,6 | 61,4        |
| <b>C</b>   | 4,51               | 3,57 | 3,72 | 3,98        | 3,76 | 3,71, 3,75  |
| $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$                   | 99,7               | 55,2 | 71,8 | 70,9        | 73,2 | 61,3        |
| <b>D</b>   | 4,89               | 3,93 | 3,79 | 3,55        | 4,19 | 3,79, 3,83  |
| Тетрасахарид <b>14</b>                                 |                    |      |      |             |      |             |
| $\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Galp                    | 93,6               | 69,5 | 70,3 | 70,7        | 70,7 | <b>70,7</b> |
| <b>B<math>\alpha</math></b>                            | 5,29               | 3,82 | 3,87 | 4,03        | 4,28 | 3,86, 4,09  |

**Таблица П7 (продолжение).** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  полисахаридов и олигосахаридов из *E. albertii* O5.

|   |       |      |      |             |      |             |
|---|-------|------|------|-------------|------|-------------|
| $\rightarrow 6)$ - $\beta$ -D-Galp                      | 97,7  | 73,1 | 73,9 | 70,1        | 75,1 | <b>70,5</b> |
| <b>В<math>\beta</math></b>                              | 4,60  | 3,51 | 3,66 | 3,97        | 3,91 | 3,90, 4,09  |
| $\rightarrow 4)$ - $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$     | 104,5 | 72,0 | 73,4 | <b>78,1</b> | 76,6 | 61,4        |
| <b>С</b>  | 4,52  | 3,57 | 3,72 | 3,98        | 3,76 | 3,71, 3,75  |
| $\rightarrow 4)$ - $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ | 99,2  | 54,7 | 70,4 | <b>80,2</b> | 71,7 | 60,7        |
| <b>Д</b>  | 4,88  | 3,93 | 3,94 | 3,71        | 4,23 | 3,68, 3,77  |
| $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$                     | 102,9 | 53,9 | 72,0 | 68,9        | 76,6 | 62,2        |
| <b>А</b>  | 4,55  | 4,94 | 3,77 | 3,95        | 3,74 | 3,78, 3,80  |

Приведены данные для преобладающей формы трисахарида **9a** с остатком  $\beta$ -D-Galp (**В $\beta$** ) на восстанавливающем конце.

Химические сдвиги N-ацетильных групп:  $\delta_{\text{H}}$  2,02-2,10;  $\delta_{\text{C}}$  23,1-23,5 (Me) и 175,4-176,0 (CO);  
O-ацетильных групп:  $\delta_{\text{H}}$  2,11-2,12;  $\delta_{\text{C}}$  21,3-21,5 (Me) и 174,7-174,9 (CO).

<sup>a</sup>В случае присоединения к **С<sub>Ac</sub>**;  $\delta_{\text{C}}$  99,2 и  $\delta_{\text{H}}$  4,88 в случае присоединения к **С**.

<sup>b</sup> В случае присоединения к **С<sub>Ac</sub>**;  $\delta_{\text{C}}$  54,7 в случае присоединения к **С**.

<sup>c</sup>В случае присоединения к **А $\alpha$** ;  $\delta_{\text{C}}$  110,3 и  $\delta_{\text{H}}$  5,08 в случае присоединения к **А $\beta$** .

<sup>d</sup>В случае присоединения к **С<sub>Ac</sub>**;  $\delta_{\text{C}}$  99,8 и  $\delta_{\text{H}}$  4,90 в случае присоединения к **С**.



**Таблица П8.** Данные масс-спектров высокого разрешения с ионизацией электрораспылением и регистрацией отрицательных ионов олигосахаридов из *E. albertii* O5.

| Олигосахар  | Моносахаридный состав                                  | Молекулярная масса, Да | Пик иона $[M-H]^-$ при $m/z$     |              |
|-------------|--|------------------------|----------------------------------|--------------|
|             |  |                        | экспериментальный                | рассчитанный |
| Фракция III |  |                        |                                  |              |
| 8           | Hex <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub>                 | 748,2750               | 747,2671                         | 747,2677     |
|             | Hex <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>2</sub> Ac <sub>1</sub> | 790,2855               | 789,2768                         | 789,2782     |
| 9a          | Hex <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>1</sub>                 | 545,1956               | 544,1880                         | 544,1883     |
|             | Hex <sub>2</sub> (HexNAc) <sub>1</sub> Ac <sub>1</sub> | 587,2062               | 586,1984                         | 586,1989     |
| Фракция II  |  |                        |                                  |              |
| 10          | Hex <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>4</sub>                 | 1478,5394              | 1477,5322                        | 1477,5321    |
|             | Hex <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>4</sub> Ac <sub>1</sub> | 1520,5499              | 1519,5436                        | 1519,5426    |
|             | Hex <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>4</sub> Ac <sub>2</sub> | 1562,5605              | 1561,5530                        | 1561,5532    |
| 11          | Hex <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>3</sub>                 | 1275,4600              | 1274,4526                        | 1274,4527    |
|             | Hex <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> Ac <sub>1</sub> | 1317,4706              | 1316,4624                        | 1316,4632    |
|             | Hex <sub>4</sub> (HexNAc) <sub>3</sub> Ac <sub>2</sub> | 1359,4811              | 1358,4738                        | 1358,4738    |
|             |  |                        | Пик иона $[M-2H]^{2-}$ при $m/z$ |              |
|             |  |                        | экспериментальный                | рассчитанный |
| Фракция I   |  |                        |                                  |              |
| 12          | Hex <sub>6</sub> (HexNAc) <sub>6</sub> Ac <sub>1</sub> | 2250,8143              | 1124,4013                        | 1124,3999    |
|             | Hex <sub>6</sub> (HexNAc) <sub>6</sub> Ac <sub>2</sub> | 2292,8249              | 1145,4082                        | 1145,4052    |
|             | Hex <sub>6</sub> (HexNAc) <sub>6</sub> Ac <sub>3</sub> | 2334,8355              | 1166,4112                        | 1166,4104    |
| 13          | Hex <sub>6</sub> (HexNAc) <sub>5</sub> Ac <sub>1</sub> | 2047,7350              | 1022,8638                        | 1022,8602    |
|             | Hex <sub>6</sub> (HexNAc) <sub>5</sub> Ac <sub>2</sub> | 2089,7455              | 1043,8676                        | 1043,8655    |
|             | Hex <sub>6</sub> (HexNAc) <sub>5</sub> Ac <sub>3</sub> | 2131,7561              | 1064,8742                        | 1064,8708    |

Hex и HexNAc обозначают гексозу и N-ацетилгексозамин, соответственно.

**Таблица П9.** Данные масс-спектров высокого разрешения с ионизацией электрораспылением олигосахаридов, полученных из О-полисахарида *E. coli* O54 сольволизом CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H.

| Олигосахарид           | Молекулярная масса, Да | Пик иона [M+Na] <sup>+</sup> / [M-H] <sup>-</sup> при <i>m/z</i> |                       |
|------------------------|------------------------|--|-----------------------|
|                        |                        | экспериментальный  | рассчитанный          |
| Фракция III            |                        |  |                       |
| Hex-HexNAc-HexA-       | 837.2750               | 860.2708/  | 860.2642/             |
| 6dHexPen <b>1</b>      |                        | 836.2678   | 836.2777              |
| Фракция IV             |                        |  |                       |
| Hex-HexNAc <b>2</b>    | 383.1428               | 406.1337   | 406.1320              |
| HexA-6dHexPen <b>3</b> | 472.1428               | 495.1331/<br>471.1365  | 495.1320/<br>471.1355 |

Pen, Hex, 6dHex, HexA и HexNAc обозначают пентозу, гексозу, 6-дезоксигексозу, гексуроновую кислоту и N-ацетил-гексозамин соответственно.

**Таблица П10.** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  полисахарида и пентасахарида из *E. coli* O54.

| Моносахаридный остаток      | C-1         | C-2         | C-3          | C-4         | C-5                 | C-6                 |
|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|---------------------|---------------------|
|                             | <i>H-1</i>  | <i>H-2</i>  | <i>H-3</i>   | <i>H-4</i>  | <i>H-5 (5a. 5b)</i> | <i>H-6 (6a. 6b)</i> |
| <b>О-полисахарид</b>        |             |             |              |             |                     |                     |
| →4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1→  | 99.3        | 69.4        | 70.4         | <b>80.0</b> | 72.1                | 174.5               |
| <b>E</b>                    | <i>5.05</i> | <i>3.72</i> | <i>4.05</i>  | <i>4.42</i> | <i>4.88</i>         |                     |
| →2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1→   | 99.7        | 77.7        | <b>70.6</b>  | 73.2        | 70.7                | 17.8                |
| <b>D</b>                    | <i>5.07</i> | <i>4.07</i> | <i>3.89</i>  | <i>3.47</i> | <i>3.77</i>         | <i>1.30</i>         |
| →2)- $\beta$ -D-Ribf-(1→    | 108.1       | 82.2        | 71.3         | <b>83.9</b> | 63.8                |                     |
| <b>C</b>                    | <i>5.44</i> | <i>4.22</i> | <i>34.24</i> | <i>4.01</i> | <i>3.66, 3.83</i>   |                     |
| →4)- $\beta$ -D-Galp-(1→    | 104.7       | <b>72.1</b> | 74.1         | 76.8        | 76.0                | 62.5                |
| <b>B</b>                    | <i>4.44</i> | <i>3.50</i> | <i>3.74</i>  | <i>3.99</i> | <i>3.71</i>         | <i>3.73, 3.73</i>   |
| →3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→ | 103.1       | <b>56.1</b> | 83.6         | 69.9        | 76.3                | 62.3                |
| <b>A</b>                    | <i>4.70</i> | <i>3.80</i> | <i>3.78</i>  | <i>3.52</i> | <i>3.38</i>         | <i>3.73, 3.86</i>   |
| <b>Пентасахарид</b>         |             |             |              |             |                     |                     |
| $\beta$ -D-Galp-(1→         | 104.7       | <b>72.0</b> | 73.7         | 69.8        | 76.5                | 62.3                |
| <b>B</b>                    | <i>4.45</i> | <i>3.53</i> | <i>3.65</i>  | <i>3.92</i> | <i>3.71</i>         | <i>3.76, 3.88</i>   |
| →3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→ | 103.2       | <b>56.2</b> | 83.5         | 70.1        | 76.4                | 62.5                |
| <b>A</b>                    | <i>4.68</i> | <i>3.85</i> | <i>3.79</i>  | <i>3.50</i> | <i>3.39</i>         | <i>3.71, 3.86</i>   |
| →4)- $\alpha$ -D-GalpA-(1→  | 98.8        | 69.6        | 70.9         | 80.7        | 73.0                | 176.6               |
| <b>E</b>                    | <i>5.07</i> | <i>3.79</i> | <i>4.06</i>  | <i>4.38</i> | <i>4.65</i>         |                     |
| →2)- $\alpha$ -L-Rhap-(1→   | 96.9        | 77.2        | <b>70.7</b>  | 72.9        | 70.7                | 17.7                |
| <b>D</b>                    | <i>5.08</i> | <i>4.06</i> | <i>3.91</i>  | <i>3.50</i> | <i>3.92</i>         | <i>1.29</i>         |
| →2)- $\beta$ -D-Ribp        |             |             |              |             |                     |                     |
| <b>C</b>                    | 93.7        | 77.2        | 67.8         | <b>68.1</b> | 64.1                |                     |
|                             | <i>4.98</i> | <i>3.58</i> | <i>4.29</i>  | <i>3.86</i> | <i>3.71, 3.84</i>   |                     |

Химические сдвиги  $^1\text{H}$  ЯМР выделены курсивом.

Химические сдвиги для N-ацетильной группы:  $\delta_{\text{H}}$  2,03 2,05,  $\delta_{\text{C}}$  23,7 (Me) и 176,1–176,2 (CO).

**Таблица П11.** Химические сдвиги ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ , м.д.) О-специфического полисахарида (ОПС), дефосфорилированного полисахарида (МПС), олигосахарида (ОС) и маннана из *E. albertii* О9.

| Моносахаридный остаток   | C-1<br><i>H-1 (H-1a,1b)</i> | C-2<br><i>H-2</i>   | C-3<br><i>H-3 (H-3a,3b)</i> | C-4<br><i>H-4</i>   | C-5<br><i>H-5</i>   | C-6<br><i>H-6a,6b</i>     |
|--|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|
| <b>ОПС</b>   |                             |                     |                             |                     |                     |                           |
| $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-GlcpNAc-<br>(1 $\rightarrow^a$ <b>A</b>       | 99.8<br><i>4.97</i>         | 54.2<br><i>4.10</i> | 81.3<br><i>3.99</i>         | 69.4<br><i>3.58</i> | 73.2<br><i>4.04</i> | 61.8<br><i>3.81, 3.86</i> |
| $\rightarrow 2$ )- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$<br><b>B</b>              | 101.2<br><i>4.76</i>        | 77.7<br><i>3.93</i> | 74.8<br><i>3.79</i>         | 67.9<br><i>3.63</i> | 77.8<br><i>3.45</i> | 62.1<br><i>3.81, 3.91</i> |
| $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$<br><b>C</b>             | 100.3<br><i>5.24</i>        | 79.0<br><i>4.24</i> | 70.0<br><i>3.95</i>         | 67.9<br><i>3.73</i> | 73.8<br><i>4.03</i> | 62.1<br><i>3.77, 3.91</i> |
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Galp-4- <i>P</i> -(1 $\rightarrow$<br><b>D</b> | 103.7<br><i>4.48</i>        | 70.5<br><i>3.70</i> | 81.5<br><i>3.72</i>         | 73.5<br><i>4.60</i> | 75.7<br><i>3.73</i> | 61.9<br><i>3.81, 3.81</i> |
| Gro-2- <i>P</i> -  | 62.7<br><i>3.76, 3.82</i>   | 78.2<br><i>4.29</i> | 62.7<br><i>3.76, 3.82</i>   |                     |                     |                           |
| <b>МПС</b>   |                             |                     |                             |                     |                     |                           |
|  | <i>5.04</i>                 | <i>4.09</i>         | <i>4.02</i>                 | <i>3.59</i>         | <i>4.00</i>         | <i>3.84, 3.84</i>         |
| $\rightarrow 2$ )- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$<br><b>B</b>              | 101.3<br><i>4.78</i>        | 77.4<br><i>4.03</i> | 75.0<br><i>3.74</i>         | 67.9<br><i>3.65</i> | 78.2<br><i>3.41</i> | 62.4<br><i>3.76, 3.93</i> |
| $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$<br><b>C</b>             | 100.5<br><i>5.27</i>        | 78.6<br><i>4.27</i> | 70.9<br><i>3.97</i>         | 67.9<br><i>3.77</i> | 73.8<br><i>4.02</i> | 62.2<br><i>3.82, 3.93</i> |
|  | <i>4.44</i>                 | <i>3.68</i>         | <i>3.74</i>                 | <i>4.10</i>         | <i>3.66</i>         | <i>3.81, 3.86</i>         |
| <b>ОС</b>  |                             |                     |                             |                     |                     |                           |
| $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Galp-4- <i>P</i> -(1 $\rightarrow$<br><b>D</b> | 104.4<br><i>4.65</i>        | 71.0<br><i>3.70</i> | 82.0<br><i>3.71</i>         | 73.7<br><i>4.59</i> | 75.9<br><i>3.72</i> | 61.9<br><i>3.81, 3.81</i> |
| $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow^b$<br><b>A</b>                           | 100.0<br><i>4.99</i>        | 55.0<br><i>4.00</i> | 72.7<br><i>3.85</i>         | 71.2<br><i>3.54</i> | 73.6<br><i>4.03</i> | 61.8<br><i>3.81, 3.86</i> |
| $\rightarrow 2$ )-Gro-al <sup>c</sup><br><b>C'</b>                           | 90.2<br><i>5.07</i>         | 80.8<br><i>3.99</i> | 62.8<br><i>3.64, 3.73</i>   |                     |                     |                           |
| Gro-2- <i>P</i> -  | 62.7                        | 78.1                | 62.7                        |                     |                     |                           |

|                  | 3.76, 3.82 | 4.29 | 3.76, 3.82 |      |      |            |
|------------------|------------|------|------------|------|------|------------|
| Маннан           |            |      |            |      |      |            |
| →2)-α-D-Манp-(1→ | 102.1      | 78.4 | 71.1       | 68.3 | 74.7 | 62.7       |
| <b>A</b>         | 5.34       | 4.28 | 3.86       | 3.71 | 3.72 | 3.77, 3.80 |
| →2)-α-D-Манp-(1→ | 99.7       | 79.9 | 71.5       | 67.5 | 74.8 | 61.9       |
| <b>B</b>         | 4.79       | 4.11 | 4.00       | 3.69 | 3.75 | 3.78, 3.82 |
| →3)-β-D-Манp-(1→ | 101.4      | 72.0 | 81.6       | 68.3 | 77.6 | 62.3       |
| <b>C</b>         | 5.14       | 4.16 | 3.72       | 3.70 | 3.41 | 3.75, 3.90 |

<sup>a</sup>Химические сдвиги NAc: <sup>a</sup>δ<sub>C</sub> 23.3 (CH<sub>3</sub>) и 175.6 (CO), δ<sub>H</sub> 2.11; <sup>b</sup>δ<sub>C</sub> 23.5 (CH<sub>3</sub>), δ<sub>H</sub> 2.09.

<sup>c</sup>Глицериновый альдегид в гидратированной форме.