



УДК 577.114.5+579.841.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

13*. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS CERASIA*, ШТАММ ИМВ 4137Енирель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К.,
Танатар Н. В.*, Захарова И. Я.*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва;* Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
Академии наук УССР, Киев

При мягкой кислотной деградации липополисахарида *Pseudomonas cerasia*, штамм ИМВ 4137, был получен серологически активный О-специфический полисахарид, содержащий в своем составе *L*-рамнопиранозу и *D*-галактопиранозу. По данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров и анализа методом метилирования, полисахарид построен из повторяющихся звеньев, имеющих структуру $\rightarrow 2$ - α -*L*-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -*D*-Galp-(1 \rightarrow).

Бактерии *Pseudomonas cerasia* являются фитопатогенным видом, широко распространенным в природе (почва, вода, растения). В последнее время штаммы этого вида были выделены также в ряде клиник — на хирургических инструментах и в организме больных [2]. Как правило, *P. cerasia* поражает людей, перенесших тяжелые заболевания или с ослабленным иммунитетом, причем многие штаммы устойчивы к большинству современных антибактериальных препаратов.

В связи с важной ролью О-антигенов в процессах взаимодействия макро- и микроорганизмов представляет интерес изучение этих структурных компонентов клеточной оболочки *P. cerasia* и в особенности их О-специфических полисахаридных цепей. Ранее нами была установлена структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида *P. cerasia*, штамм ИМВ 3181 [3]. Настоящая работа посвящена изучению строения полисахаридной цепи липополисахарида *P. cerasia*, штамм 4137.

Липополисахарид был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом с последующим удалением нуклеиновых кислот осаждением в виде солей с цетавлоном [4]. Реакциями иммунопреципитации и иммунодиффузии в агаре Дифко было установлено, что липополисахарид серологически активен (титр антител О-антисыворотки достигал 1 : 100 000), специфичен и дает две линии преципитации в агаре.

При деградации липополисахарида 1% уксусной кислотой был отщеплен липидный компонент и гель-фильтрацией углеводной фракции на сефадексе G-50 получен высокомолекулярный полисахарид. По серологической активности и специфичности он аналогичен исходному липополисахариду.

В ^1H -ЯМР-спектре полисахарида присутствовали два сигнала аномерных протонов (5,15 м.д., уширенный синглет, и 5,03 м.д., дублет, $J_{1,2}$ 3,5 Гц), сигнал метильной группы 6-дезоксисахара (1,26 м.д., дублет, $J_{5,6}$ 6 Гц) и сигналы 10 протонов в области 3,4–4,3 м.д. ^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида содержал сигналы двух аномерных атомов углерода (100,6 и 98,9 м.д.), сигналы C-6 6-дезоксисахара (17,8 м.д.) и углеродного атома CH_2OH -группы при 62,0 м.д., а также сигналы восьми атомов углерода вторичных спиртовых групп в области 68–79 м.д. Из этих данных следовало, что полисахарид является регулярным и построен из повторяющихся ди-

* Сообщение 12 см. [4].

сахаридных звеньев, включающих в себя по одному остатку гексозы и 6-дезоксигексозы.

При гидролизе полисахарида 1 М соляной кислотой образовались галактоза и рамноза, которые были идентифицированы методами хроматографии на бумаге и газожидкостной хроматографии в виде полных ацетатов полиолов. Оба моносахарида были выделены из гидролизата в индивидуальном виде с помощью препаративной хроматографии на бумаге. Сравнение величин оптического вращения сахаров, полученных из гидролизата полисахарида (для рамнозы — в виде метил- α -*L*-рамнопиранозида), с литературными данными показало, что галактоза имеет *D*-конфигурацию, а рамноза — *L*-конфигурацию.

Типы замещения моносахаридных остатков в полисахариде были определены методом метилирования [5]. Метилированный полисахарид был подвергнут формолизу, затем гидролизу, и полученные частично метилированные сахара были превращены в ацетаты полиолов. В результате анализа комбинированным методом газожидкостной хроматографии — масс-спектрометрии с использованием данных работы [6] идентифицированы производные 3,4-ди-*O*-метилрамнозы и 2,3,6-три-*O*-метилгалактозы. Следовательно, полисахарид является линейным, рамноза замещена в положение 2, а галактоза — в положение 4. Отсутствие в ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида характерных для альдофуранозидов сигналов C-1 в области 103–110 м.д. и C-4 в области 82–86 м.д. [7] показывало, что оба моносахарида имеют пиранозную форму.

Конфигурация гликозидных связей была установлена в результате определения констант спин-спинового взаимодействия аномерных атомов углерода с соответствующими аномерными протонами (J_{CH}) в спектре, снятом без подавления взаимодействия ^{13}C — ^1H . Относительно большие константы J_{CH} (171,1 и 169,2 Гц) свидетельствовали о том, что обе гексопиранозы присоединены α -гликозидными связями [8]. Этот вывод подтверждался также относительно слабopольным положением сигналов H-1 в ^1H -ЯМР-спектре полисахарида при 5,15 и 5,03 м.д. [9].

Приведенные данные показывают, что дисахаридное повторяющееся звено *O*-специфического полисахарида *P. seracia*, штамм ИМВ 4137, имеет следующую структуру: $\rightarrow 2$)- α -*L*-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -*D*-Galp-(1 \rightarrow .

Экспериментальная часть

Восходящая хроматография выполнена на бумаге FN-11 в системе этилацетат — вода — уксусная кислота — пиридин (5 : 3 : 1 : 5) с обнаружением сахаров щелочным раствором нитрата серебра. Гель-фильтрация проведена на колонке (3,7 \times 70 см) с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5. Газожидкостная хроматография осуществлена на приборе Pye-Unicam, серия 104, на колонке с 3% OV-1 на диатомите CQ (100–120 меш), хромато-масс-спектрометрия — на приборе Varian MAT Gnom 111 на той же фазе. ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 в D₂O при 60° С с использованием в качестве внутреннего стандарта ацетона (δ_{H} 2,23 м.д.) и метанола (δ_{C} 50,15 м.д.), химические сдвиги приведены от тетраметилсилана. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin — Elmer, модель 141, в воде при 20° С. Растворы лиофилизовали или упаривали в вакууме при 40° С.

Серологические тесты. Схема иммунизации кроликов и получение *O*-антисыворотки описаны ранее [10]. Титр антител *O*-антисывороток определяли при помощи реакции иммунопреципитации по общепринятой методике [11]. Реакция иммунодиффузии в 1% агаре Дифко проведена по Оухтерлони в модификации [12].

Выделение липополисахарида и полисахарида. Липополисахарид выделяли экстракцией сухих бактериальных клеток 45% водным фенолом с последующим осаждением нуклеиновых кислот цетавлоном и переосаждением из спирта [4]. Липополисахарид (800 мг) нагревали со 100 мл 1% уксусной кислоты (100° С, 1,5 ч), осадок липида отделяли центрифугированием при 20 000g, супернатант лиофилизвали, гель-фильтрацией на

сефадексе G-50 выделяли O-специфический полисахарид (200 мг) и олигосахаридную фракцию (120 мг). Оптическое вращение полисахарида $[\alpha]_D +48,3^\circ$ (с 1).

Моносахаридный состав определяли по стандартным методикам. В аналитическом варианте: после гидролиза полисахарида (1 М HCl, 100° С, 4 ч) — с помощью хроматографии на бумаге и после восстановления гидролизата NaBH₄ и ацетилирования — с помощью ГЖХ. В препаративном варианте: 20 мг полисахарида гидролизовали 2 М H₂SO₄ (100° С, 4 ч) и после стандартной обработки моносахариды выделяли с помощью хроматографии на бумаге. Получили 4,1 мг D-галактозы, $[\alpha]_D +55^\circ$ (с 0,4), ср. [13] $[\alpha]_D +78,6^\circ$ (вода), и 3,3 мг L-рамнозы, которая была превращена в метанол (1% хлористый водород в метаноле, кипячение 3 ч) в метил- α -L-рамнопиранозид, $[\alpha]_D -44^\circ$ (с 0,3), ср. [14] $[\alpha]_D -67,2^\circ$ (вода).

Анализ методом метилирования был проведен как описано нами ранее [3].

Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук А. С. Шашкову за съемку ЯМР-спектров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов В. Л., Тохтамышева Н. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 60—73.
2. Monteil H., Richard C., Heidi A. Med. Mal. Inf., 1981, v. 11, p. 544—547.
3. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1851—1859.
4. Вестфаль О., Яни К. В кн.: Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967, с. 325—332.
5. Конрад Г. Е. В кн.: Методы исследования углеводов. М.: Мир, 1975, с. 276—278.
6. Bjorndal H., Lindberg B., Svensson S. Carbohydr. Res., 1967, v. 5, p. 433—440.
7. Шашков А. С., Чижов О. С. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437—496.
8. Vock K., Pedersen C. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1974, p. 293—297.
9. Vebault G. M., Chou J. M., Dutton G. G. S., Funnel N., Steffen A. M. J. Bacteriol., 1973, v. 113, p. 1345—1347.
10. Коваленко Э. А., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. Микробиол. журн., 1979, т. 41, № 6, с. 603—606.
11. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наук. думка, 1982, с. 136—151.
12. Лебедев А. Д., Цилинский Я. Я. Журн. микробиол., 1958, т. 5, с. 25—32.
13. Fisher E., Bergmann M., Rabe A. Ber., 1920, p. 2362—2388.
14. Micheel F. Chemie der Zucker und Polysaccharide, Leipzig: Academische Verlagsgesellschaft, 1956, p. 429—431.

Поступила в редакцию
4.X.1984

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 13. STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF A LIPOPOLYSACCHARIDE FROM *PSEUDOMONAS CEPACIA* STRAIN IMV 4137

KNIREL Yu. A., DMITRIEV B. A., KOCHETKOV N. K., TANATAR N. V.*,
ZAKHAROVA I. Ya.*

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

On mild acid degradation of a lipopolysaccharide from *Pseudomonas cepacia* strain IMV 4137, a serologically active O-specific polysaccharide was obtained and shown to contain L-rhamnose and D-galactose. According to ¹H- and ¹³C-NMR data as well as methylation analysis, the polysaccharide is made up of disaccharide repeating units of the following structure: $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$.