



УДК 577.114.5:579.841.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

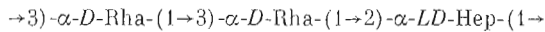
25*. СТРУКТУРА O-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS CERACIA* ИМВ 673/2,
СОДЕРЖАЩЕЙ L-ГЛИЦЕРО-D-МАННО-ГЕПТОЗУ

Книрель Ю. А., Танатар Н. В.*, Солдаткина М. А.*,
Шапков А. С., 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 ceracia*, штамм ИМВ 673/2, получен O-специфический полисахарид, содержащий D-рамнозу и L-глицеро-D-манно-гептозу в соотношении 2 : 1; последний моносахарид впервые идентифицирован в O-специфической полисахаридной цепи липополисахарида. На основании данных метилирования и анализа методом ¹³C-ЯМР-спектроскопии найдено, что полисахарид является линейным и построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, имеющих следующую структуру:



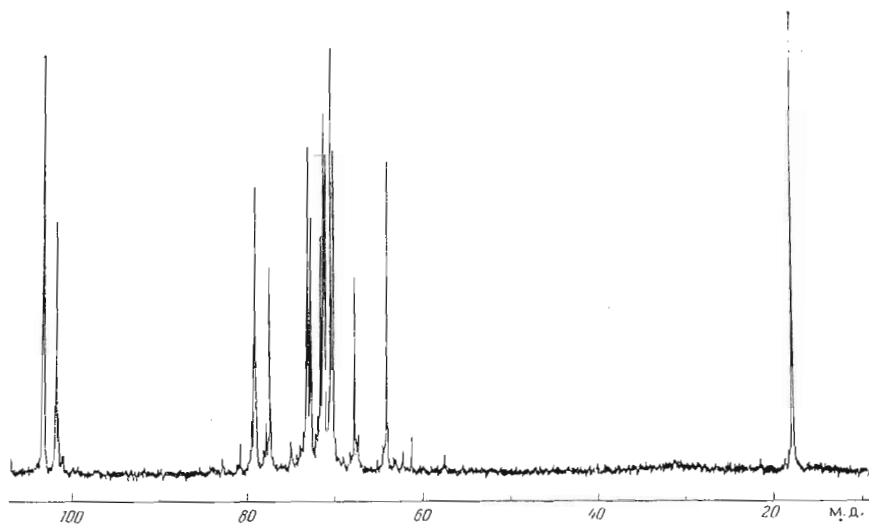
Микроорганизм *Pseudomonas ceracia* впервые был описан как фитопатогенный вид, однако в последние годы он часто встречается в клиниках, особенно у больных с ослабленной иммунной защитой. Множественная резистентность к антибиотикам и способность выживать в условиях минимального питания и в присутствии инсектицидов создают определенные трудности в борьбе с этим микроорганизмом. В связи с этим актуальным является всестороннее изучение антигенов *P. ceracia*, играющих важную роль в процессах взаимодействия бактерии и организма хозяина.

Настоящая работа продолжает изучение O-антигенных липополисахаридов *P. ceracia* [2, 3] и посвящена установлению строения O-специфической полисахаридной цепи липополисахарида *P. ceracia*, штамм ИМВ 673/2.

Липополисахарид был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией водным фенолом [4] и очищен ультрацентрифугированием. Он обладал серологической активностью в реакции кольцепреципитации (титр O-антисыворотки 1 : 200 000) и давал одну полосу преципитации в реакции двойной иммунодиффузии в агаровом геле. При мягкой кислотной деградации липополисахарида был получен O-специфический полисахарид, выделенный гелем-хроматографией на сефадексе G-50. По серологической активности и специфичности он был аналогичен исходному липополисахариду.

¹³C-ЯМР-спектр полисахарида (рисунок) содержал сигналы метильных групп двух остатков 6-дезоксисахаров при 17,9 м.д., одной гидроксиметильной группы при 64,1 м.д., трех аномерных атомов углерода при 101,8—103,3 м.д. и 13 атомов углерода, связанных с кислородом, в области 67,8—79,3 м.д. Из этих данных следует, что полисахарид является регулярным и построен из трисахаридных повторяющихся звеньев; два из трех компонентов повторяющегося звена — 6-дезоксисахара, а третий моносахарид, судя по общему числу сигналов в спектре и положению сигнала гидроксиметильной группы [5], — гептоза.

* Сообщение 24 см. [1]. Сокращения: LD-Hep — L-глицеро-D-манно-гептоза; DD-Hep — D-глицеро-D-манно-гептоза.



^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. seracia* ИМВ 673/2

В гидролизате полисахарида с помощью углеводного анализатора были обнаружены два моносахарида в соотношении $\sim 2:1$. Присутствующий в большем количестве сахар был идентифицирован как рамноза. При быстром периодатном окислении полисахарида по методу [6] с последующим восстановлением боргидридом натрия наблюдалось почти полное исчезновение из гидролизата содержащегося в меньшем количестве моносахарида и появление в нем маннозы. Этот результат подтверждал присутствие в составе полисахарида гептозы, которая вследствие окисления вицинальной диольной группировки при С6—С7 превратилась в гексозу, а идентификация этой гексозы как маннозы доказывала манно-конфигурацию фрагмента С2—С5 гептозы. По времени удерживания при анализе с помощью углеводного анализатора эта гептоза совпадала с заведомым образцом *D*-глицеро-*L*-манно-гептозы ($T_{\text{Rha}} 2,15$) и отличалась от образца *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы ($T_{\text{Rha}} 1,85$).

Гептоза была выделена из гидролизата полисахарида с помощью ионообменной хроматографии на аплоните в боратном буфере. Ее ^{13}C -ЯМР-спектр был идентичен спектру *D*-глицеро-*L*-манно-гептозы и существенно отличался от спектра *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы (табл. 1), что окончательно доказывало относительную конфигурацию высшего сахара. Положительное удельное оптическое вращение выделенной гептозы, $[\alpha]_D +4,8^\circ$ (с 0,15), свидетельствовало в пользу *L*-глицеро-*D*-манно-конфигурации, хотя по абсолютной величине оно было несколько меньше по сравнению с лит. данными для *D*-глицеро-*L*-манно-энантиомера, $[\alpha]_D -14^\circ$ (вода) [8]. Абсолютная конфигурация гептозы была независимо подтверждена анализом эффектов гликозилирования в ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида и расчетом его удельного оптического вращения по правилу Кляйна (см. ниже); при этом одновременно была установлена *D*-конфигурация входящей в полисахарид рамнозы.

Далее полисахарид был подвергнут анализу методом метилирования, и частично метилированные моносахариды были идентифицированы методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов. В результате были обнаружены 1,3,5-три-*O*-ацетил-2,4-ди-*O*-метилрамнит и 1,2,5-три-*O*-ацетил-3,4,6,7-тетра-*O*-метилгептит, идентифицированные с использованием данных [9] и [10] соответственно. Таким образом, полисахарид является линейным, все моносахариды находятся в пиранозной форме, оба остатка рамнозы замещены в положение 3, а остаток гептозы замещен в положение 2.

Для установления конфигурации гликозидных связей были определены константы спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C,H}}$ в ^{13}C -ЯМР-спектре, снятом без подавления С,Н-взаимодействий. Для каждого из трех аномерных атомов углерода они составляли ~ 172 Гц, и, следовательно, про-

Химические сдвиги в ^{13}C -ЯМР-спектрах (δ , м. д.)

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	
Полисахарид <i>P. serasia</i> ИМВ 673/2 *								
-3Rha α (A)	103,3	71,4	77,6	73,3	70,6	17,9		
-3Rha α (B)	103,3	71,2	79,2	72,9	70,6	17,9		
-2Hep α (C)	101,8	79,3	71,7	67,8	73,3	70,3	64,1	
Полисахарид <i>P. serasi</i> 467 [7] *								
-3Rha α	103,1	71,2	79,0	72,8	70,4	17,8		
-3Rha α	103,1	71,2	79,0	72,6	70,4	17,8		
-2Rha α	101,9	79,2	71,1	73,6	70,6	17,8		
<i>DL</i> -Hep **	α	95,6	72,0	71,9	67,7	72,5	70,3	64,4
	β	95,2	72,5	74,6	67,4	76,1	70,2	64,2
<i>DD</i> -Hep	α	95,4	71,9 ***	72,0 ***	69,2	73,9	73,5	63,5
	β	95,3	72,4	74,7	69,0	77,6	73,3	63,3
<i>LD</i> -Hep	α	95,5	72,0	71,9	67,7	72,5	70,3	64,4
	β	95,2	72,5	74,6	67,4	76,1	70,2	64,2

* Отнесение сигналов, разница между химическими сдвигами которых не превышает 0,5 м. д., может быть обратным.

** Отнесение сигналов проведено с использованием селективного гетеролдерного $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ двойного резонанса. Химические сдвиги ^{13}C , приведенные в работе [5], отличаются от полученных нами данных вследствие использования при съемке спектров различных внутренних стандартов и, по-видимому, ошибочного отнесения в работе [5] сигналов α -аномера.

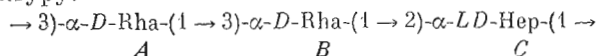
*** Отнесение может быть обратным.

тоны H1 всех трех моносахаридных остатков имеют экваториальную ориентацию [11]. Для рамнозы это отвечает α -конфигурации ее гликозидной связи, в то время как для гептозы по правилам [12] это соответствует β -конфигурации, а по правилам [13] — α -конфигурации. Вслед за авторами обзора [14] мы будем придерживаться второго обозначения, что позволяет сохранить соответствие между гептозой и родоначальной гексозой (в данном случае маннозой), и, таким образом, гликозидная связь гептозы имеет α -конфигурацию. Так как оба остатка рамнозы замещены в положение 3 и имеют одинаковую аномерную конфигурацию, в полисахариде возможна только одна последовательность моносахаридов.

Анализ ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида позволил также определить абсолютные конфигурации моносахаридов. Действительно, три моносахаридных остатка, составляющие повторяющееся звено, участвуют в образовании двух α 1,3-связанных дисахаридных фрагментов. Тогда положение их сигналов C1 в более слабом поле (101,5 м. д.) указывает на одинаковую абсолютную конфигурацию пиранозных циклов всех трех моносахаридов, так как при различных абсолютных конфигурациях в α 1,3-связанных дисахаридах с манно-конфигурацией пиранозного цикла гликозилируемого сахара сигнал C1 гликозилирующего моносахарида резонирует в более сильном поле, чем 98 м. д. [15].

Выбор между двумя альтернативными структурами полисахарида, в которых все сахара относятся либо к *D*-, либо к *L*-ряду, был сделан на основании расчета удельного оптического вращения полисахарида по правилу Кляйна [16]. Как видно из табл. 2, расчет привел к величине, хорошо совпадающей с экспериментально определенной величиной, в предположении о *D*-конфигурации остатков рамнозы и *L*-глицеро-*D*-манно-конфигурации гептозы, в то время как для противоположной конфигурации моносахаридов рассчитанная и экспериментальная величины значительно расходились.

Таким образом, полученные данные показывают, что повторяющееся звено О-специфического полисахарида *P. serasia* ИМВ 673/2 имеет следующую структуру:



Удельное оптическое вращение полисахарида *P. cerasia* ИМВ 673/2
(расчет по правилу Кляйна [16])

Соединение	$[\alpha]_D$, град	M_r	$[M]_D$, град
Метил- α - <i>L</i> -рамнопиранозид [17]	-67,2	178	-119,6
Метил- <i>D</i> -глицеро- α - <i>L</i> -манно-гептопиранозид [18]	-70,2	224	-155,2
Полисахарид			
рассчитано для			
2 <i>D</i> -Rha, <i>LD</i> -Her	+81,5	484	+394,4
2 <i>L</i> -Rha, <i>DL</i> -Her	-81,5	484	-394,4
экспериментальное значение	+83,1		

Эта структура подтверждалась результатами расшифровки ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида (табл. 2), которая была проведена при сравнении со спектром *L*-глицеро-*D*-манно-гептозы с учетом замещения в полимере в положение 2 и со спектром *O*-специфического полисахарида *P. cerasi* 467 [7], построенного из остатков α -*D*-рамнопиранозы, замещенных в положение 2 или 3.

Отметим довольно необычный моносахаридный состав изученного полисахарида. Один из его компонентов, *D*-рамноза, долгое время относился к числу редко встречающихся в природе моносахаридов. В последнее время, однако, его все чаще находят в липополисахаридах грамотрицательных бактерий, главным образом фитопатогенных видов *Pseudomonas* [2, 7, 19–21]. К псевдомонадам относится и еще один известный продуцент содержащего *D*-рамнозу липополисахарида — *Xanthomonas campestris* [22], а *Alcaligenes faecalis*, вид с неопределенным таксономическим положением, у которого полисахаридная цепь *O*-антигена представлена *D*-ксило-*D*-рамнаном, имеет некоторые общие с псевдомонадами признаки [23]. В то же время некоторые другие представители этого семейства продуцируют липополисахариды, содержащие *L*-рамнозу [3, 21, 24].

Второй компонент исследованного полисахарида, *L*-глицеро-*D*-манно-гептоза, обнаружен в составе кобра липополисахаридов большинства грамотрицательных бактерий [14, 24], однако в *O*-специфической полисахаридной цепи липополисахарида этот моносахарид, по нашим данным, обнаружен впервые.

Авторы благодарят А. Я. Черняка за предоставление образцов *D*-глицеро-*L*-манно-гептозы и *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы.

Экспериментальная часть

^{13}C -ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в D_2O при 60° С для полисахарида и 30° С для моносахаридов с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола (δ_c 50,15 м.д.). Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при 20° С. Гель-фильтрацию проводили на колонке (3,7×70 см) с гелем Sephadex G-50 в пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5. Анализ с помощью углеводного анализатора Technicon (США) выполняли как описано ранее [25]. ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрию осуществляли как в работе [20]. Серологические тесты проводили согласно [3]; для получения *O*-антисыворотки кроликов иммунизировали по схеме [26].

Бактериальную культуру выращивали поверхностным способом на мясо-пептонном агаре при 30° С в течение 24 ч, клетки смывали физиологическим раствором и осаждали центрифугированием при 5000 *g*. Липополисахарид выделяли по методу [4] и расщепляли как описано [2]. Полисахарид метилировали по методу [27], частично метилированные ацетаты полиолов получали как в работе [2].

Гидролиз полисахарида проводили в 2 М HCl (100° С, 3 ч), гидролизат упаривали, остаток упаривали трижды с водой. В аналитическом варианте анализировали с помощью углеводного анализатора; в препаративном варианте гидролизат 30 мг полисахарида хроматографировали на колонке (0,6×15 см) с анионом Durrum DA×4 (США) в 0,5 М натрий-боратном буфере, рН 9,0, анализируя фракции с помощью анализатора углеводов; фракции, содержащие гептозу, объединяли, обрабатывали катионом КУ-2 (H^+ -форма), упаривали, остаток трижды упаривали с метанолом, обрабатывали анионом AG-1×8 (CH_3COO^- -форма), получили *L*-глицеро-*D*-манно-гептозу (6 мг), $[\alpha]_D +4,8^\circ$ (*c* 0,15).

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Липкин Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Холодкова Е. В. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1399-1404.
2. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев В. А., Кочетков Н. К., Касячук Н. В., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1851-1859.
3. Книрель Ю. А., Танатар Н. В., Захарова И. Я., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 536-538.
4. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 325-327.
5. Angayl S. J., Tran T. Q. // Aust. J. Chem. 1983. V. 36. № 5. P. 937-946.
6. Foster A. B., Davis D. A., Crumpton M. J. // Nature. 1958. V. 181. P. 412-413.
7. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Мамян С. С., Яковлева Л. М., Соляник Л. П., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 82-91.
8. Staněk J., Černý M., Kocourek J., Pacák J. // The monosaccharides/Eds Ernest I., Hebký J. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1963. P. 100.
9. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönnngren J. // J. Chem. Commun. Stockholm Univ. 1976. № 8. P. 4-75.
10. Radziejewska-Lebrecht J., Shaw D. H., Borowiak D., Fromme I., Mayer N. // J. Chromatogr. 1979. V. 179. № 1. P. 113-122.
11. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293-297.
12. Eur. J. Biochem. 1971. V. 21. № 4. P. 455-477.
13. J. Org. Chem. 1963. V. 28. № 2. P. 281-291.
14. Kenne L., Lindberg B. // The polysaccharides. V. 2/Ed. Aspinnall G. O. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 287-363.
15. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. 173-185.
16. Klyne W. // Biochem. J. 1950. V. 46. № 4. P. xli-xlii.
17. Fisher E., Bergman M., Rabe A. // Ber. 1920. B. 53. S. 2362-2388.
18. Hann R. M., Merrill A. T., Hudson C. S. // J. Amer. Chem. Soc. 1935. V. 57. № 11. P. 2100-2103.
19. Smith A. R. W., Zamze S. E., Munro S. M., Carter K. L., Hignett R. C. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. № 1. P. 73-78.
20. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашунин В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Гвоздик Р. И., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1253-1262.
21. Zdrovenko G. M., Yakovleva L. M., Gubanov N. Y., Solyanik L. P., Zakharova I. Y., Gvozdyak R. I., Knirel Y. A., Dashunin V. M. // Abstr. Pap. 3rd Bratislava Symp. Saccharides. Bratislava, 1986. P. 46-46a.
22. Hickman J., Ashwell J. // J. Biol. Chem. 1966. V. 241. № 6. P. 1424-1428.
23. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1230-1239.
24. Книрель Ю. А. // Прогресс химии углеводов/Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 54-76.
25. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 66. № 3. P. 559-566.
26. Monteil H., Richard C., Heidi A. // Med. Maladies infectieuses. 1981. V. 11. № 10. P. 544-547.
27. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276-278.

Поступила в редакцию
17.III.1987

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 25. STRUCTURE
OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF
THE *PSEUDOMONAS CEPACIA* IMV 673/2 LIPOPOLYSACCHARIDE,
CONTAINING L-GLYCERO-D-MANNO-HEPTOSE

KNIREL Y. A., TANATAR N. V.*, SOLDATKINA M. A.*, SHASHKOV A. S.,
ZAKHAROVA I. Y.*

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

O-Specific polysaccharide, consisting of *D*-rhamnose and *L*-glycero-*D*-manno-heptose (*LD*-Hep) in a 2 : 1 ratio, was obtained on the mild acid degradation of the *Pseudomonas cepacia* IMV 673/2 lipopolysaccharide; monosaccharide *LD*-Hep has not previously been found in O-specific chains of lipopolysaccharides. On the basis of methylation and ¹³C-NMR data, it was concluded that the polysaccharide is composed of trisaccharide repeating units having the following structure:

