



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

TOM 19 * № 11 * 1993

УДК 577.114.5.088.53 ; 579.841.11

© 1993 г. А. С. Шашков, Н. А. Кочарова, Ю. А. Книрель,
Л. Д. Варбанец *, Н. В. Москаленко *, А. В. Здохлий *

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

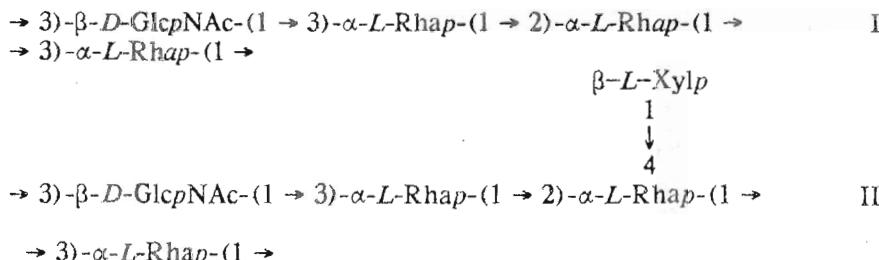
38*. СТРОЕНИЕ О-АНТИГЕНОВ *Pseudomonas solanacearum* ICMP 7942 И ICMP 8169

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;

* Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
Украинской академии наук, Киев

Ключевые слова: полисахариды О-специфические; спектроскопия ЯМР.

Структуры I и II установлены для О-антителов *Pseudomonas solanacearum* ICMP 7942 и ICMP 8169 соответственно методами ЯМР-спектроскопии, включая двумерную гомоядерную корреляционную спектроскопию (COSY), ЯЭО-спектроскопию во врачающейся системе координат (ROESY) и гетероядерную $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -мульти kvantовую корреляционную спектроскопию (HMQC). В полисахариде штамма ICMP 8169 замещение ксилозой нестехиометрическое, т. е. в нем присутствуют также повторяющиеся звенья полисахарида штамма ICMP 7942 (соотношение II : I ~ 3 : 1).



Проводимое нами исследование О-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов (О-антител) *Pseudomonas solanacearum* [2—4] ставит своей целью создание химической основы для отсутствующей до сих пор внутривидовой классификации этого важного фитопатогенного микроорганизма. В настоящей работе изучено строение двух структурно родственных О-антител: *P. solanacearum* ICMP 7942 и ICMP 8169.

О-Специфические полисахариды были получены расщеплением разбавленной уксусной кислотой липополисахаридов, выделенных экстракцией водным фенолом [5], с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-50.

¹H-NMR-спектр полисахарида из штамма ICMP 7942 (ПС-1, табл. 1) содержал четыре сигнала равной интенсивности в области аномерных протонов при 4,74—

*Сообщение 37 см. [1].

Таблица I

Данные ^1H -ЯМР-спектров * (δ , м.д., КССВ, Гц)

Моносахаридный остаток	H1			H2			H3			H4			H5			H6a			H6b		
	δ	$J_{1,2}$	δ	$J_{2,3}$	δ	$J_{3,4}$	δ	$J_{4,5}$	δ	$J_{5,6a}$	δ	$J_{6a,6b}$	δ	$J_{6a,6b}$	δ	$J_{5,6b}$	δ	$J_{5,6b}$			
ПС-1																					
→ 3)- β -D-GlcNAc-(1 → (A))	4,74	8,5		3,84	9,0	3,64	9,0	3,53	9,0	3,46	2,5	3,91	12,5	3,74							
→ 3)- α -L-Rhap-(1 → (B))	4,95	1,5	4,23	3,5	3,84	10,0	3,49	10,0	3,70	6,0	1,24										
→ 2)- α -L-Rhap-(1 → (C))	5,12	1,5	4,04	3,5	3,91	10,0	3,45	10,0	3,74	6,0	1,29										
→ 3)- α -L-Rhap-(1 → (D))	4,85	1,5	3,85	3,0	3,76	10,0	3,53	10,0	3,99	6,0	1,23										
ПС-2 ^{2*}																					
→ 3)- β -D-GlcNAc-(1 → (A))	4,76	8,5	3,81	9,0	3,65	9,0	3,50	9,0	3,44	2,5	3,92	12,5	3,75								
→ 3)- α -L-Rhap-(1 → (B))	4,85	1,5	4,23	3,5	3,84	10,0	3,49	10,0	3,70	6,0	1,24										
→ 2)- α -L-Rhap-(1 → (C))	5,22	1,5	4,01	3,5	3,86	10,0	3,41	10,0	3,76	6,0	1,31										
→ 3)- α -L-Rhap-(1 → (D))	4,87	<2	3,84	3,5	3,87	10,0	3,69	10,0	4,08	6,0	1,31										
⁴ ↑ β -L-Xylp-(1 → (E))	4,40	7,5	3,40	—	3,40	—	3,59	6,0 ^{3*}	3,95 ^{4*}	11,05 ^{5*}											

* Химический сдвиг сигнала N-акетильной группы 2,02 м.д.
 2) Приведены значения для пентасахаридных звеньев.

^{3*} $J_{4,5c}$.

^{4*} $\delta_{\text{H}5}$; нижняя строка — $\delta_{\text{H}5a}$,
^{5*} $J_{5c,5a}$; нижняя строка — $J_{4,5a}$.

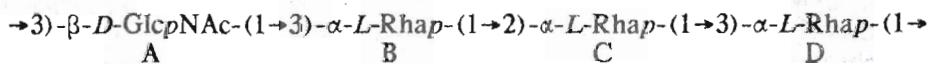
5,12 м. д., один сигнал N-ацетильной группы при 2,02 м. д. (с, 3Н), три сигнала метильных групп б-дезоксисахаров при 1,23—1,29 м. д. (все д, 3Н, $J_{5,6}$ 6 Гц), а также сигналы остальных протонов сахаров в области 3,45—4,23 м. д. В ^1H -ЯМР-спектре полисахарида из штамма ICMP 8169 (ПС-2, табл. 1) присутствовали две серии сигналов с соотношением интегральных интенсивностей ~3 : 1, одна из которых, минорная, образовала спектр ПС-1. Основная серия содержала пять сигналов аномерных протонов в области 4,40—5,22 м. д.; часть остальных сигналов этой серии, включая сигналы N-ацетильной группы и H6 б-дезоксисахаров, совпадала по химическим сдвигам с сигналами минорной серии, а другая часть отличалась от них более или менее значительно.

Эти данные показывают, что ПС-1 является регулярным и построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, а ПС-2 включает два типа звеньев: звенья одного типа имеют такую же структуру, что и звенья ПС-1, а звенья второго типа пентасахаридные и, как можно предположить, образованы путем присоединения дополнительного, пятого моносахаридного остатка к звеньям первого типа.

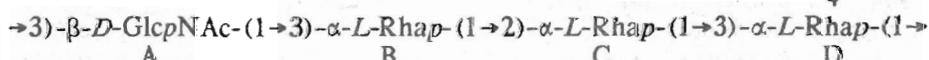
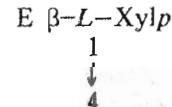
^1H -ЯМР-спектры обоих полисахаридов были расшифрованы с помощью двойного гомоядерного резонанса в разностном варианте [6] и двумерной гомоядерной корреляционной спектроскопии (COSY). Величины КССВ $^3J_{\text{H},\text{H}}$, приведенные в табл. 1, показывают, что в повторяющееся звено как ПС-1, так и ПС-2 входит один остаток глюкопиранозы (звено А) и три остатка рамнозы (звенья В—D); кроме того, ПС-2 содержит один остаток ксилозы (звено Е) [7]. Положение сигнала H2 остатка моносахарида с глюко-конфигурацией в относительно слабом поле при 3,81—3,84 м. д. свидетельствует о присутствии ацетамидной группы в положении 2 [8], и, таким образом, этот моносахарид является N-ацетилглюкозамином. Ксилоза и N-ацетилглюкозамин присоединены β -гликозидными связями, как это следует из КССВ ($J_{1,2}$ 7,5 и 8,5 Гц соответственно).

Конфигурации рамнозидных связей, положения замещения моносахаридных остатков и их последовательность определены методом двумерной ЯЭО-спектроскопии во вращающейся системе координат (ROESY). В соответствии с β -конфигурацией остатков ксилозы и N-ацетилглюкозамина в спектрах присутствовали пики, отвечающие их внутризвеневым корреляциям; H1/H3 и H1/H5. Напротив, для всех трех остатков рамнозы такие корреляционные пики отсутствовали, что свидетельствовало об α -конфигурации этих сахаров. В ROESY-спектре ПС-1 обнаружены корреляционные пики следующих транс-гликозидных протонов: H1 A/H3 B; H1 B/H2 C; H1 C/H3 D; H1 D/H3 A. В ROESY-спектре ПС-2 присутствовали те же корреляционные пики и дополнительно пик, коррелирующий H1 звена Е с H4 D.

Приведенные данные позволяют установить структуры I и II для ПС-1 и ПС-2 соответственно, причем в ПС-2 замещение ксилозой не является стехиометрическим: остаток этого моносахарида присутствует в среднем только в трех из каждого четырех повторяющихся звеньев.



I (ПС-1)



II (ПС-2)

Таблица 2

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

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
ПС-1						
→ 3)- β -D-GlcNAc-(1 → (A)	103,2 (103,2)	56,8 (56,8)	82,9 (82,9)	69,9 (69,9)	77,0 (77,0)	62,1 (62,1)
→ 3)- α -L-Rhap-(1 → (B)	102,9 (102,9)	71,0 (71,0)	81,1 (81,1)	72,2 (72,2)	70,6 (70,6)	17,9 (17,7)
→ 2)- α -L-Rhap-(1 → (C)	102,0 (102,0)	78,9 (78,9)	71,4 (71,4)	73,6 (73,6)	70,3 (70,3)	17,7 (17,9)
→ 3)- α -L-Rhap-(1 → (D)	102,4 (102,4)	71,9 (71,9)	78,8 (78,8)	72,8 (72,8)	70,3 (70,3)	18,0 (18,0)
ПС-2**						
→ 3)- β -D-GlcNAc-(1 → (A)	103,1 (103,3)	56,6 (56,6)	82,9 (82,9)	69,8 (69,8)	77,0 (77,0)	62,1 (62,1)
→ 3)- α -L-Rhap-(1 → (B)	103,3 (103,1)	71,0 (71,0)	81,2 (81,2)	72,4 (72,2)	70,3 (70,7)	18,0 (17,7)
→ 2)- α -L-Rhap-(1 → (C)	101,6 (101,6)	80,6 (80,6)	70,7 (71,2)	73,8 (73,8)	70,3 (70,3)	17,7 (18,0)
→ 3)- α -L-Rhap-(1 → (D)	102,2 4 ↑	72,2 (72,4)	76,4 (76,4)	80,8 (80,8)	69,8 (69,8)	18,2 (18,2)
β -L-Xylp-(1 → (E)	104,9 (104,9)	74,4 (74,7)	77,2 (77,2)	*** (70,3)	66,3 (66,3)	

* Химические сдвиги сигналов N-ацетильной группы 23,5 м. д. (Me) и 175,5 м. д. (CO). В скобках приведены данные работы [4].

** Приведены химические сдвиги для пентасахаридных звеньев.

*** Положение сигнала не найдено.

Структура I была установлена нами ранее для О-антитела другого штамма *P. solanacearum* ICMP 767, а структура II — для О-антитела групп штаммов *P. solanacearum* PDDCC 5712, ICMP 766, ICMP 7959 и ICMP 8066 [4]; в том числе была определена D-конфигурация N-ацетилглюкозамина и L-конфигурация ксилозы и рамнозы. Сравнение ^{13}C -ЯМР-спектров О-специфических полисахаридов этих и изученных в настоящей работе штаммов показало, что они соответственно идентичны друг другу.

В работе [4] ^{13}C -ЯМР-спектр для структуры I был расшифрован с использованием компьютерного расчета по методу [9], а спектр для структуры II — путем сравнения со спектром I и с данными для β -ксилопиранозы. Имея расшифрованные ^1H -ЯМР-спектры ПС-1 и ПС-2, интересно провести независимое отнесение их ^{13}C -ЯМР-спектров с использованием двумерно гетероядерной $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -корреляционной спектроскопии. С этой целью был использован мультиквантовый метод с детектированием сигналов протонов (HMQC). Результаты расшифровки приведены в табл. 2. Сравнение полученных данных с ранее проведенным отнесением показывает, что в работе [4] для структуры I расшифровка была сделана правильно, тогда как для структуры II обнаруживается ряд неточностей, не имеющих, однако, значения для установления строения повторяющегося звена. Эти неточности исправлены в настоящей работе (табл. 2).

Использование варианта метода HMQC без подавления спин-спиновых вза-

имодействий $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ позволило определить КССВ $^1J_{\text{Cl},\text{H}}$. Относительно большие величины этих КССВ для трех остатков рамнозы (170,5—172,8 Гц) подтверждали их α -конфигурацию, а меньшие величины КССВ для остатков ксилозы и N-ацетилглюкозамина (163,5 Гц) — β -конфигурацию этих моносахаридов [10].

Таким образом, правильность структур I и II подтверждена независимыми методами: анализом моносахаридного состава, метилированием и ^{13}C -ЯМР-спектроскопией с применением компьютерного расчета в работе [4] и одно- и двумерной ^1H -ЯМР-спектроскопией и гетероядерной $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -корреляционной спектроскопией в настоящей работе. Отметим, что нестехиометрическое замещение основной цепи моносахаридным остатком (ксилозой или рамнозой), образующим боковую цепь, наблюдается и у других О-антител P. solanacearum [2, 4], структурно родственных НС-1 и НС-2. Остается неизвестным, входят ли линейные тетрасахаридные и разветвленные пентасахаридные звенья в одну и ту же цепь или образуют две полисахаридные цепи с различной структурой.

Экспериментальная часть

Выращивание микроорганизмов, выделение липополисахаридов и О-специфических полисахаридов проводилось как описано ранее [2—4].

^1H -ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 в D_2O при 80° С. ^{13}C -ЯМР-спектры получены на приборе Bruker AM-300, снабженном дополнительным генератором BSV-3, в D_2O при 70° С. В качестве внутреннего стандарта использовали ацетон ($\delta_{\text{H}} 2,225$, $\delta_{\text{C}} 31,45$ м. д.). Для двумерной спектроскопии применяли стандартные методики Bruker. Время спин-локинга при съемке ROESY-спектра составляло 0,2 с.

Авторы благодарят куратора ICMP д-ра Дж. Янга (Новая Зеландия) за предоставление культуры P. solanacearum.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шашков А. С., Здоровенко Г. М., Даева Б. Д., Яковлева Л. М., Соляник Л. П., Гвоздяк Р. И., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К.//Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 1. С. 90—97.
2. Варбанец Л. Д., Кочарова Н. А., Книрель Ю. А., Мурас В. А., Москаленко Н. В., Броварская О. С.//Микробиол. журн. 1990. Т. 52. № 4. С. 27—33.
3. Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Varbanets L. D.//Carbohydr. Res. 1992. V. 228. № 2. P. 315—320.
4. Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Varbanets L. D., Moskalenko N. V., Brovarskaya O. S., Muras V. A.//Carbohydr. Res. 1993. In press.
5. Westphal O., Jann K.//Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83—91.
6. Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Pier G. B.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 23. P. 11291—11295.
7. Altona C., Haasloo C. A. G.//Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417—429.
8. Jansson P.-E., Kenne L., Widmalm G.//Carbohydr. Res. 1989. V. 188. P. 169—191.
9. Кочетков Н. К., Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Шашков А. С., Липкинд Г. М.//Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 116—125.
10. Bock K., Pedersen C.//J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293—297.

Поступила в редакцию
22.VI.1993

A. S. Shashkov, N. A. Kocharova, Yu. A. Knirel,
L. D. Varbanets *, N. V. Moskalenko *, A. V. Zdokhliy *

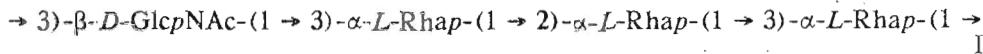
ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA.

38. THE STRUCTURES OF THE O-ANTIGENS OF
Pseudomonas solanacearum ICMP 7942 AND ICMP 8169

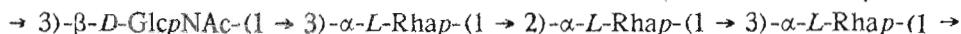
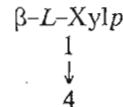
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;

* D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

The structures I and II were established for the O-antigens of *Pseudomonas solanacearum* ICMP 7942 and ICMP 8169, respectively, by means of NMR-spectroscopy, including 2D homonuclear shift-correlated spectroscopy (COSY), rotating-frame NOE spectroscopy (ROESY) and heteronuclear ¹³C, ¹H multiquantum correlation spectroscopy (HMQC). In the polysaccharide of the ICMP 8169 strain substitution of the main chain by the xylose residue is non-stoichiometric, i. e. this antigen contains also the repeating units of the polysaccharide of the ICMP 7942 strain (the ratio II : I is ~3 : 1).



I



II