



УДК 577.114.5.088.53:579.841.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

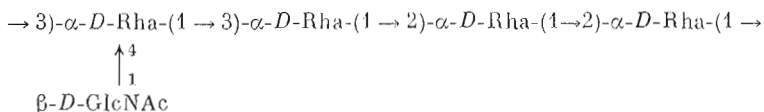
15.* СТРУКТУРА ПОВТОРЯЮЩЕГОСЯ ЗВЕНА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS WIERINGAE* И НЕКОТОРЫХ ПАТОВАРОВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Кшнрель Ю. А., Здоровенко Г. М.., Дашунин В. М.,
Яковлева Л. М.*., Шапков А. С., Захарова Н. Я.*,
Гвоздяк Р. И.*., Кочетков Н. К.*

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

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

О-Специфическая полисахаридная цепь липополисахарида *Pseudomonas wieringae* представляет собой линейный D-рамнан, к которому в качестве боковых ответвлений присоединены остатки N-ацетил-D-глюкозамина. Избирательный распад полисахарида по Смуту был проведен с сохранением этого терминального моносахарида. В результате окисления половины остатков рамнозы после мягкого кислотного гидролиза разбавленной уксусной кислотой и боргидридного восстановления был получен олигосахарид, содержащий два остатка рамнозы, N-ацетилглюкозамин и глицерин. Его строение было установлено бездеструктивным путем методом ¹H-ЯМР-спектроскопии с применением эффекта Оверхаузера. На основании структуры олигосахаридного фрагмента, данных метилирования и анализа ¹³C-ЯМР-спектров установлена следующая структура повторяющегося звена полисахарида:



По данным ¹³C-ЯМР-спектров, такую же структуру имеют О-специфические полисахариды *P. syringae*, патовары *glycinea* Л-25, *holci* 1055a, *pisi* 7157 и *atrofaciens* 2846, относящиеся к той же серогруппе IV, что и *P. wieringae*.

Грамотрицательная бактерия *Pseudomonas wieringae* (Elliot) Savulesku (1947) с неясным в настоящее время таксономическим положением [2] является возбудителем сосудисто-паренхиматозного заболевания свеклы [3]. Согласно классификационной схеме фитопатогенных псевдомонад, построенной на основе свойств их термостабильных антигенов (липополисахаридов), *P. wieringae* входит в серогруппу IV [4]. К этой же серогруппе относится ряд видов (*P. atrofaciens*, *P. holci*, *P. glycinea*, *P. pisi* и др.), проявляющих высокую степень родства с видом *P. wieringae*, по в отличие от него вошедших в ранге патоваров в виде *P. syringae* [5]. Различными авторами при серогруппировании установлена значительная неоднородность фитопатогенных псевдомонад и отсутствие прямой корреляции между серологической специфичностью и специализацией по растению-хозяину [4, 6].

Липополисахариды играют важную роль в процессах узнавания и взаимодействия возбудитель — растение [7]. Их структурные и иммунохимические исследования необходимы для выяснения взаимосвязи между вирулентностью и О-антигенной специфичностью микроорганизмов, а также химических основ их специализации по отношению к растению-хозяину

* Сообщение 14 см. [1].

и их серогруппирования. Кроме того, структура липополисахарида является одним из важных хемотаксономических критериев у грамотрицательных бактерий.

Имеющиеся в настоящее время сведения о составе и строении О-антигенов фитопатогенных псевдомонад довольно ограничены. Исследование моносахаридного состава липополисахаридов *P. syringae*, патовары *syringae*, *pisi* [8], *glycinea* [9], *morsprunorum* [10], и *P. solanacearum* [11] показало, что их основным компонентом является рамноза. Дополнительно у *P. syringae*, патовары *syringae* и *glycinea*, обнаружена фукоза [8] и N-ацетилглюкозамин [9] соответственно. О-Специфическая цепь липополисахарида *P. syringae*, патовар *morsprunorum*, представляет собой линейный D-рамнан, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев [10]. О-Специфический полисахарид *P. solanacearum* построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, включающих три остатка L-рамнозы и один остаток N-ацетилглюкозамина [11].

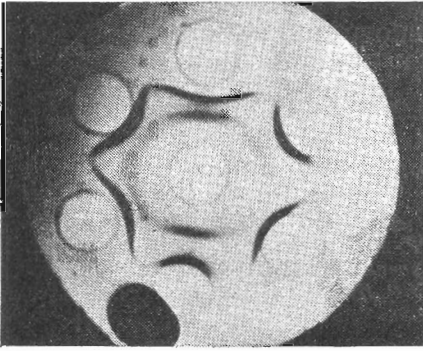


Рис. 1. Двойная диффузия в агаре по Оухтерлони. В центре — О-антисыворотка к *P. wieringae* 7923, в боковых лунках — препараты липополисахарида *P. wieringae* 7923 (вверху) и различных патоваров *P. syringae* серогруппы IV

риальных клеток экстракцией раствором NaCl, как описано в работе [12].

Липополисахарид *P. wieringae* характеризовался высокой О-специфической активностью в реакции пассивной гемагглютинации (титр 1 : 2560—1 : 5120) и кольцепреципитации (титр 1 : 500 000); он давал не менее двух четких линий агарпреципитации в тесте Оухтерлони и три линии при иммуноэлектрофорезе. Препараты патоваров *P. syringae* также были высокоактивны в указанных реакциях (титры 1 : 1280—1 : 2560 в реакции пассивной гемагглютинации и 1 : 100 000—1 : 500 000 в реакции кольцепреципитации). В тесте Оухтерлони выявлена высокая степень серологического родства *P. wieringae* и исследуемых патоваров *P. syringae* (рис. 1).

При нагревании с 1% уксусной кислотой липополисахариды расщеплялись, и гель-фильтрацией углеводной части на сефадексе G-50 были выделены соответствующие О-специфические полисахариды, элюирующиеся непосредственно вслед за холостым объемом колонки.

Полисахарид *P. wieringae* обладал О-специфической активностью, однако она была более низкой, чем у исходного липополисахарида, о чем свидетельствовали данные по торможению реакции пассивной гемагглютинации (минимальная ингибирующая доза составляла менее 0,12 мкг/мл для липополисахарида и 61,5 мкг/мл для полисахарида). Кроме того, после обработки уксусной кислотой наблюдалось исчезновение одной из двух выявляемых в тесте Оухтерлони линий преципитации. С чем связано исчезновение этой линии, в настоящей работе не выяснялось.

В ¹H-ЯМР-спектре О-специфического полисахарида *P. wieringae* присутствовали сигналы четырех метильных групп 6-дезоксисахаров в области 1,15—1,35 м.д. (суперпозиция четырех дублетов), ацетамидной группы при 1,97 м.д. (синглет), пяти аномерных протонов при 5,09; 5,00; 4,97 (двойной интенсивности, все уширенные синглеты) и 4,50 м.д. (дублет, J_{1,2} 8 Гц), а также группа сигналов остальных протонов в области 3,2—4,2 м.д.

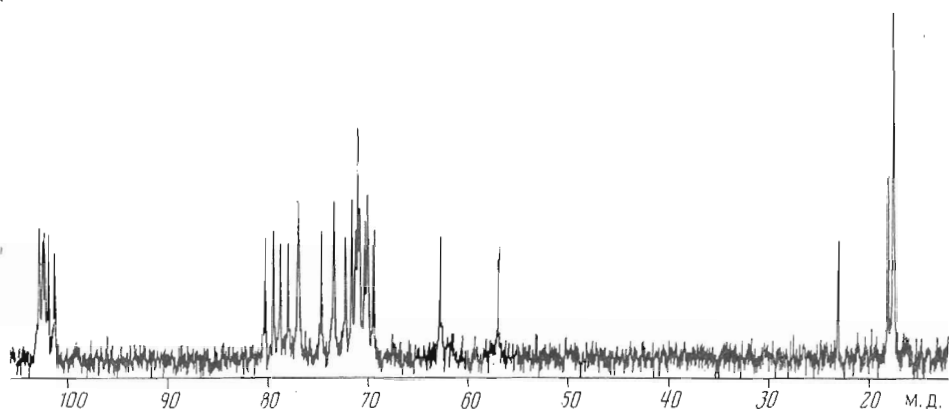


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. wieringae*

^{13}C -ЯМР-спектр этого полисахарида (рис. 2) содержал сигналы четырех метильных групп 6-дезоксисахаров при 17,9 (тройной интенсивности) и 18,4 м.д., одной гидроксиметильной группы при 63,0 м.д., одной ацетамидной группы (CH_3 при 23,4 м.д., CO при 175,8 м.д. *), пяти аномерных углеродных атомов при 103,0; 102,7; 102,5; 102,1 и 101,6 м.д., одного углеродного атома, связанного с азотом, при 57,3 м.д. и 19 вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 69–81 м.д.

При полном кислотном гидролизе полисахарида образовались рамноза и глюкозамин, которые были идентифицированы с помощью хроматографии на бумаге, углеводного и аминокислотного анализаторов. Анализ методом ГЖХ после дезаминирования гидролизата и превращения сахаров в ацетаты полиолов [13] показал, что моносахариды присутствуют в соотношении $\sim 4:1$ соответственно. Таким образом, на основании спектральных данных и кислотного гидролиза полисахарид построен из повторяющихся пентасахаридных звеньев, включающих четыре остатка рамнозы и один остаток *N*-ацетилглюкозамина.

Из ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, были определены константы спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C,H}}$ для аномерных атомов. Относительно небольшая константа $^1J_{\text{C,H}}$ 163,4 Гц для сигнала при 103,0 м.д. указывала на то, что он принадлежит β -связанному моносахариду, а относительно большие константы $^1J_{\text{C,H}}$ 172–174 Гц для остальных аномерных сигналов свидетельствовали об α -конфигурации соответствующих моносахаридов [14]. Химический сдвиг 57,3 м.д. сигнала $\text{C}2$ *N*-ацетилглюкозамина доказывал, что β -конфигурацию имеет именно этот моносахарид, так как в случае его α -конфигурации атом $\text{C}2$ резонировал бы в значительно более сильном поле (от 55 м.д. и выше [15]). В пользу β -конфигурации *N*-ацетилглюкозамина свидетельствовала также большая константа спин-спинового взаимодействия $J_{1,2}$ 8 Гц для сигнала $\text{H}1$ этого моносахарида в ^1H -ЯМР-спектре полисахарида. Таким образом, все четыре остатка рамнозы присоединены α -гликозидными связями.

Полисахарид метилировали метилйодидом в присутствии метилсульфинилметанида по методу [16]. Часть метилированного полисахарида была подвергнута формолизу и гидролизу, образовавшиеся метилированные сахара были превращены в ацетаты полиолов и проанализированы методом ГЖХ-масс-спектрометрии. В результате с использованием данных [17] были идентифицированы 3,4-ди-*O*-метилрамноза, 2,4-ди-*O*-метилрамноза и 2-*O*-метилрамноза в соотношении $\sim 2:1:1$. Другая часть метилированного полисахарида была подвергнута метанолизу и ацетилированию; анализ методом ГЖХ-масс-спектрометрии привел к идентификации метил-2-(*N*-метил)ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-*O*-метил- α,β -глюкопиранозиды, масс-спектр которого был идентичен приведенному в работе [18].

* Область сигналов карбонильных атомов углерода на рисунке не приведена.

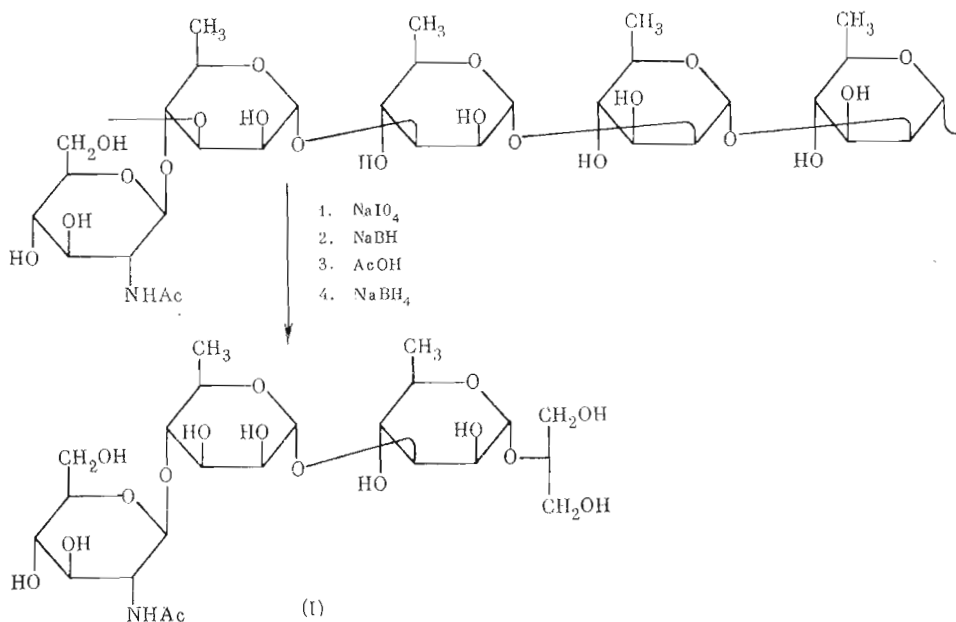
Таким образом, полисахарид является разветвленным, терминальным сахар боковой цепи — это N-ацетилглюкозамин, в узле разветвления находится остаток рамнозы, замещенный в положение 3 и 4, два других остатка рамнозы замещены в положение 2 и четвертый остаток рамнозы — в положение 3.

Для избирательного расщепления полисахарида с целью получения необходимых для дальнейшего анализа олигосахаридных фрагментов был применен распад по Смитсу [19]. Однако периодатное окисление всех имеющих vicинальные диольные группировки моносахаридов (трех из пяти) привело бы к олигосахариду (или олигосахаридам), содержащим слишком мало информации о последовательности моносахаридных остатков в повторяющемся звене. В связи с этим мы воспользовались показанной нами ранее возможностью проводить окисление замещенных в положение 2 остатков рамнозы, не затрагивая остатки N-ацетилглюкозамина с незамещенными гидроксильными группами при C3 и C4 [20]. При окислении полисахарида 0,05 M периодатом натрия (10% избыток по отношению к расчетному количеству для окисления двух диольных группировок) N-ацетилглюкозамин практически не затрагивался, и после мягкого кислотного гидролиза окисленного и восстановленного боргидридом натрия полисахарида с последующим повторным боргидридным восстановлением был получен олигосахарид (I). Использование для мягкого кислотного гидролиза обычно применявшейся 0,5 M соляной кислоты (20 или 37° C [19—21]) приводило к смеси олигосахаридов, которые, по-видимому, различались структурой агликона (данные ¹³C-ЯМР-спектра) и не могли быть разделены гель-фильтрацией на фразтогеле TSK HW 40(S). При проведении гидролиза 1% уксусной кислотой (100° C) олигосахарид (I) был получен в качестве единственного олигомерного продукта.

В ¹H-ЯМР-спектре (I) присутствовали сигналы двух метильных групп 6-дезоксисахаров при 1,31 и 1,30 м.д. (2 д, $J_{5,6}$ 6 Гц), одной ацетамидной группы при 2,10 м.д. (с), трех аномерных протонов при 5,07; 4,98 (2 д, $J_{1,2}$ 1,7 Гц) и 4,64 м.д. (д, $J_{1,2}$ 8 Гц), а также сигналы остальных протонов в области 3,4—4,2 м.д. ¹³C-ЯМР-спектр олигосахарид (I) содержал сигналы двух метильных групп 6-дезоксисахаров при 17,8 и 17,6 м.д., ацетамидной группы (CH₃ при 23,4, СО при 175,7 м.д.), трех гидроксиметильных групп при 62,6; 61,9 и 61,5 м.д., трех аномерных углеродных атомов при 103,0 (двойной интенсивности) и 100,4 м.д., одного атома углерода, связанного с азотом, при 56,9 м.д., а также 12 вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 68—85 м.д. Таким образом, в состав олигосахарид (I) входят два остатка рамнозы и по одному остатку N-ацетилглюкозамина и глицерина.

Строение олигосахарид (I) было установлено бездеструктивным путем методом ¹H-ЯМР-спектроскопии с использованием ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [22]. ¹H-ЯМР-спектр был частично расшифрован с использованием селективного двойного гомоядерного резонанса (табл. 1). Предоблучение H1 остатка N-ацетилглюкозамина при 4,64 м.д. привело к значительному увеличению (~10%) сигнала H4 одного из остатков рамнозы при 3,56 м.д., что доказывает наличие 1-4-связи между этими моносахаридами. В пользу этого вывода свидетельствовал также проявившийся в этом же эксперименте небольшой ЯЭО (~2%) на атоме H6 остатка рамнозы, резонирующем при 1,30 м.д. Предоблучение H1 замещенного в положение 4 остатка рамнозы при 5,07 м.д. вызвало значительное увеличение (~8%) сигнала H3 второго остатка рамнозы при 3,90 м.д., что доказывало его замещение в положение 3. И наконец, предоблучение H1 замещенного в положение 3 остатка рамнозы при 4,98 м.д. привело к ЯЭО (~10%) на H2 остатка глицерина при 3,80 м.д. Таким образом, олигосахарид (I) является линейным и имеет структуру, приведенную на схеме.

На основании структуры олигосахарид (I) может быть однозначно установлена структура повторяющегося звена полисахарида. Действительно, 1-4-связь между N-ацетилглюкозамином и рамнозой в олигосахариде (I) доказывает, что в полисахариде аминсахар присоединяется непосредственно к дизамещенному остатку рамнозы и, следовательно, боковая



цепь включает только один моносахарид. Все остатки рамнозы находятся, таким образом, в линейной цепи, причем, как вытекает из строения олигосахаридов (I), дизамененный остаток рамнозы присоединен к остатку рамнозы, замещенному в положение 3. Отсюда следует, что два замещенных в положение 2 остатка рамнозы расположены рядом друг с другом и полисахарид имеет структуру, приведенную на схеме.

Данные ^{13}C -ЯМР-спектров олигосахаридов (I) и полисахарида (табл. 2) хорошо согласовывались с предложенными для них структурами. Отнесение сигналов в спектре олигосахаридов было проведено при сравнении с данными для модельных соединений: метил-2-ацетиамидо-2-дезоксиглюкопиранозид (II) [15], метил-4-О-(β -L-рамнопиранозил)- α -L-рамнопиранозид (III) [23] и 2-О-[3-О-(α -D-рамнопиранозил)- α -D-рамнопиранозил]глицерина (IV) [21]. Отнесение сигналов в спектре полисахарида было выполнено при сравнении со спектром олигосахаридов (I) с учетом дополнительного замещения в положение 3 связанного с N-ацетил-

Таблица 1

Данные ^1H -ЯМР-спектра олигосахаридов (I)

Остаток	Протон	Химический сдвиг, δ , м. д.	Наблюдаемая мультиплетность	КССВ, Гц
DGlcNAc β 1-	H1	4,64	д	$J_{1,2}$ 8
	H2	3,78	дд	$J_{2,3}$ 9,5
	H6	3,97	дд	$J_{5,6,2}, J_{6,6,12}$
	CH ₃ CO	2,10	с	
-4DRha α 1-	H1	5,07	д	$J_{1,2}$ 1,7
	H2	4,15	дд	$J_{2,3}$ 3,3
	H3	3,96	дд	$J_{3,4}$ 9
	H4	3,56	т	$J_{4,5}$ 9
	H5	3,92 *	дк	$J_{5,6}$ 6
	H6	1,30	д	
-3DRha α 1-	H1	4,98	д	$J_{1,2}$ 1,7
	H2	4,08	дд	$J_{2,3}$ 3,2
	H3	3,89	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H5	3,88 *	дк	$J_{5,6}$ 6
	H6	1,31	д	
-2Gro	H2	3,80	м	

* Отнесение может быть обратным.

Данные ¹³C-ЯМР-спектров (химические сдвиги в м. д.)

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Полисахарид <i>P. wietingiae</i> ^a	DGlcNAcβ1-	103,0	57,3	74,9	71,1	77,1 ^{3*}	63,0
	-3,4DRhaα1-	102,5*	71,9 ^{3*}	77,2*	80,5	69,4	18,4
	-3DRhaα1-	102,7*	71,5 ^{3*}	79,0	72,5	70,0 ^{3*}	17,9
	-2DRhaα1-	102,1 ^{2*}	79,7	71,3 ^{3*}	73,7	70,1 ^{3*}	17,9
	-2DRhaα1-	101,6 ^{2*}	78,2	71,3 ^{3*}	73,7	70,2 ^{3*}	17,9
	DGlcNAcβ1-	103,0	56,9	74,8	71,1 ^{2*}	77,1	61,5
Олигосахарид (I) ^b	-4DRhaα1-	103,0	71,4 ^{2*}	70,2*	84,4	68,5	17,8
	-3DRhaα1-	100,4	70,9 ^{2*}	79,4	72,6	70,3*	17,6
	-2Gro	62,6	79,4	61,9			
	-3DRhaα1-	103,0	71,2	79,1 ^{2*}	72,7*	79,4 ^{3*}	17,8 ^{2*}
	-3DRhaα1-	103,0	71,2	79,1 ^{2*}	72,8*	70,4 ^{3*}	17,8 ^{2*}
	-2DRhaα1-	101,9	79,2 ^{4*}	71,2	73,7	70,6 ^{3*}	17,9 ^{2*}
DGlcNAcβ-OMe (II) [15] LRhaα1-4LRhaα-OMe (III) [23] DRhaα1-3DRhaα1-2Gro (IV) [21]	DGlcNAcβ1-	103,1	56,8	75,2	71,2	77,0	62,0
	-4LRhaα1-	102,0	74,9	70,5	83,9	68,1	17,8
	-DRhaα1-	103,4	71,5	71,5	73,4	70,3	17,8
	-3DRhaα1-	100,6	74,5	79,6	72,7	70,3	17,8
	-2Gro	62,7	79,6	61,9			
	Полисахарид <i>P. syringae</i> , патовар <i>montprunorum</i> [10] ^a						

^a Химические сдвиги $\underline{\text{C}}_1\text{C}_2\text{O}$ 23,4, $\underline{\text{C}}_1\text{C}_3\text{O}$ 175,8 м. д.

^b Химические сдвиги $\underline{\text{C}}_1\text{C}_2\text{O}$ 23,4, $\underline{\text{C}}_1\text{C}_3\text{O}$ 175,7 м. д.

в Химические сдвиги приведены с аддитивной поправкой +0,85 м. д. и округлены до десятых долей миллионных долей. Необходимость поправки вызвана тем, что в работе [10] химический сдвиг использованного в качестве внутреннего стандарта метана не был принят равным +49,3 м. д. от тетраметилсилана.

^{3*}-^{4*} Отнесение может быть обратным.

глюкозаминном остатке рамнозы, а также со спектром O-специфического полисахарида *P. syringae*, патовар *morsprunorum* [10], имеющего следующую структуру:



Обращает на себя внимание смещение к 80,5 м.д. сигнала C4 связанного с N-ацетилглюкозаминном остатке рамнозы в спектре полисахарида, изученного в настоящей работе, по сравнению с его положением при 84,4 м.д. в спектре олигосахарида (I). Большая (по модулю) величина этого смещения (-3,9 м.д.), вызванного β -эффектом дополнительного замещения в полисахариде этого остатка рамнозы в положение 3, характерна для вицинально дизамещенных пиранозными остатками моносахаридов [24]. Для остатка рамнозы, монозамещенного в положение 3, β -эффект не превышает по модулю -1,6 м.д. [25, 26].

Оставались невыясненными абсолютные конфигурации моносахаридов. Этот вопрос был решен безструктурным путем с использованием закономерностей в эффектах гликозилирования в ^{13}C -ЯМР-спектрах [25, 26] и расчета оптического вращения по правилу Кляйна [27]. В ^{13}C -ЯМР-спектре олигосахарида (I) β -эффект гликозилирования на C3 остатка рамнозы, вызванный ее гликозилированием N-ацетилглюкозаминном в положение 4, составляет -1,2 (или -1,3) м.д. (определен при сравнении с данными для незамещенного остатка рамнозы в олигосахариде (IV) [21], см. табл. 2). При β -конфигурации гликозидной связи между N-ацетилглюкозаминном и рамнозой такая величина β -эффекта свидетельствует об их одинаковой абсолютной конфигурации, тогда как в случае различной конфигурации этот эффект имел бы положительное или небольшое отрицательное значение (до -0,2 м.д. [25]). Далее, в том же спектре β -эффект на C2 второго остатка рамнозы, вызванный ее замещением первым остатком рамнозы в положение 3, составляет -0,1 м.д. При α -конфигурации гликозидной связи это снова указывает на одинаковую конфигурацию остатков рамнозы, так как в противном случае β -эффект должен был быть по модулю не менее -2 м.д. [25, 26]. И наконец, в спектре полисахарида α -эффекты на C1 остатков рамнозы, гликозилирующих оба замещенных в положения 2 остатка рамнозы, составляют не менее +6,6 м.д. (определены при сравнении с положением сигнала C1 при 95,0 м.д. в спектре α -L-рамнопиранозы [28]). С учетом β -эффекта (-1 м.д.) на C1 от собственного замещения гликозилирующей рамнозы в положение 2 α -эффекты на C1 составляют не менее 7,5 м.д. Это характерно для одинаковой конфигурации моносахаридов, так как известно, что при различной абсолютной конфигурации α -1 \rightarrow 2-связанных пиранозных остатков с *манно*-конфигурацией α -эффект на C1 значительно меньше (~5 м.д.) [29]. Таким образом, все моносахаридные компоненты липополисахарида имеют одинаковые (все D или все L) абсолютные конфигурации.

Выбор между этими двумя возможностями в пользу D-конфигураций был сделан на основании расчета оптического вращения олигосахарида (I) и полисахарида по правилу Кляйна [27] (табл. 3). Расчет был проведен также в предположении о различной конфигурации остатков рамнозы и N-ацетилглюкозамина и привел к значительно большему расхождению с экспериментальными величинами, чем при D-конфигурации всех моносахаридов.

^{13}C -ЯМР-спектры O-специфических полисахаридов *P. syringae*, патовары *glycinea* Л-25, *holci* 1055a, *pisii* 7157 и *atrofaciens* 2846, были идентичны спектру полисахарида *P. wieringae*, и все эти полисахариды имели близкие между собой величины оптического вращения. Эти данные показывают, что все они имеют одинаковую структуру повторяющегося звена. Таким образом, отнесение *P. wieringae* и изученных патоваров *P. syringae* к одной и той же O-серогруппе IV получило теперь обоснование на уровне строения O-специфических цепей липополисахаридов.

Установленная на молекулярном уровне идентичность O-специфических цепей антигенов *P. wieringae* и ряда патоваров *P. syringae*, способ-

Расчет оптического вращения по правилу Кляйна

Соединение	$[\alpha]_D$, град	Молекулярная масса	$[M]_D$, град
LRha α -OMe [30]	-67,2	178	-119,6
DGlcNAc β -OMe [31]	-43	235	-101,1
Олигосахарид (I) рассчитано для			
DRha	+31,3	441	+138,1
DGlcN			
LRha	-31,3	441	-138,1
LGlcN			
DRha	+77,2	441	+340,3
LGlcN			
LRha	-77,2	441	-340,3
DGlcN			
Экспериментальное значение	+25,5		
Полисахарид рассчитано для			
DRha	+47,9	787	+377,3
DGlcN			
LRha	-47,9	787	-377,3
LGlcN			
DRha	+73,6	787	+579,5
LGlcN			
LRha	-73,6	787	-579,5
DGlcN			
Экспериментальное значение	+56		

ность *P. wieringae* при искусственном заражении поражать кроме свеклы и другие растения (пшеницу, лук, фасоль, сирень и др. [12]), их сходство по способу фиксирования в наружной мембране липополисахаридов, легко вымываемых 0,85% раствором NaCl, в сочетании со штаммовой однородностью *P. wieringae* [32] дают основания для предложения включить его в ранге патовара в вид *P. syringae*.

В состав липополисахаридов изученных штаммов входит редко встречающийся моносахарид *D*-рамноза. Продуцентами всех остальных известных природных источников *D*-рамнозы — липополисахаридов *P. syringae*, патовар *morsprunorum* [10], *P. cepacia* 3181 [21] и *Xantomonas campestris* [33] являются представители семейства псевдомонад. Было высказано предположение, что присутствие этого моносахарида в качестве компонента клеточной поверхности может быть характерным для фитопатогенных микроорганизмов и иметь значение для вызываемых ими болезней растений [10]. Однако для решения этого вопроса, на наш взгляд, потребуются значительно более широкое комплексное изучение липополисахаридов бактерий этого семейства.

Экспериментальная часть

¹H-ЯМР-спектры снимали на приборе WM-250 (Bruker) в D₂O при 90°С для полисахарида и 30°С для олигосахаридов (I). Эксперименты по ЯЭО выполняли по методике [23] разностным способом при задержке релаксации 4 с и времени построения ЯЭО 0,5 с. ¹³C-ЯМР-спектры получали на приборе AM-300 (Bruker) в D₂O при 60°С для полисахаридов и 30°С для олигосахаридов (I). В качестве внутренних стандартов использовали ацетон (δ_H 2,23) и метанол (δ_C 50,15). Оптическое вращение определяли на приборе ЕПО-1 (СССР) в воде при 20°С. Растворы лиофилизировали или упаривали в вакууме.

Восходящую хроматографию на бумаге FN-11 выполняли в системе бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) при обнаружении веществ щелочным нитратом серебра или нитридом. Гель-фильтрацию осуществляли на колонке (70×3,5 см) с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере, pH 5,5, и на колонке (80×1,7 см) с сорбентом Fractogel TSK HW 40(S) (Merck, ФРГ) в воде. Элюционные кривые строили с помощью анализатора углеводов Technicon (США) или дифференциального рефрактометра Клауег (ФРГ). Ионнообменную хроматографию моносахаридов с использованием анализатора углеводов Technicon и аминокислотного анализатора BC-200 выполняли как описано ранее [24]. ГЖХ проводили на приборе Pye-Unicam 104, мо-

дель 64 (Англия) на колонке (90×0,4 см) с ECNSS-M на газхроме Q (100–200 меш) (колонка А) или с OV-1 на диатомите CQ (100–200 меш) (колонка В), газ-носитель – азот. ГЖХ-масс-спектрометрию проводили на приборе Varian MAT Spot III на колонке (150×0,3 см) с SE-30 на сорбенте Chromosorb W (100–120 меш), газ-носитель – гелий.

Выращивание бактерий, получение сывороток и серологические исследования проводили как описано [12]. Липополисахариды выделяли экстракцией раствором NaCl [12] с последующей очисткой диализом и ультрацентрифугированием. Выходы липополисахаридов составляли 2–5%.

Выделение полисахаридов. Липополисахариды (по 200–300 мг каждого) нагревали с 1% уксусной кислотой (50 мл, 100° С, 2–3 ч), осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизovali, гель-фильтрацией на сефадексе G-50 выделили О-специфические полисахариды *P. wieringae* ($[\alpha]_D +56^\circ$), патовары *P. syringae*: *glycinea* П-25 ($[\alpha]_D +64^\circ$), *holci* 1055a ($[\alpha]_D +67^\circ$), *pisi* 7157 ($[\alpha]_D +64^\circ$) *atrofaciens* 2846 ($[\alpha]_D +60^\circ$ (с 1)). Выходы полисахаридов составляли 20–25% от веса липополисахаридов. Кроме того, были выделены олигосахаридные фракции (70–100 мг в каждом случае), которые в настоящей работе не исследовались.

Дальнейшее исследование состава и структуры было проведено на полисахариде *P. wieringae*.

Кислотный гидролиз полисахарида (1 мг) проводили 2 М соляной кислотой (1 мл, 100° С, 3 ч), гидролизат обрабатывали и анализировали как обычно (например, [34]). Часть гидролизата обрабатывали азотистой кислотой и исследовали методом ГЖХ на колонке А как описано в работе [13].

Метилирование полисахарида проводили по методу [16], избыток метилнодда удаляли в токе азота, смесь разбавляли водой, диализовали 2 сут против дистиллированной воды, лиофилизovali. Часть метилированного полисахарида подвергали формолизу, гидролизу, превращали в ацетаты полиолов как описано в работе [21] и исследовали методом ГЖХ на колонке А. Другую часть подвергали метанолизу, ацетилировали как описано [35] и исследовали методом ГЖХ на колонке В.

Распад по Смигу. Полисахарид (25 мг) обрабатывали в темноте 0,05 М перподатом натрия (1,7 мл, 2 сут, 20° С), добавляли 50 мг боргидрида натрия, выдерживали 2 ч, диализовали 2 сут против дистиллированной воды, лиофилизovali, продукт (18 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (5 мл, 100° С, 2 ч), лиофилизovali, восстанавливали боргидридом натрия (10 мг) в воде (2 мл, 20° С, 1 ч), гель-фильтрацией на фрактогеле TSK HW 40(S) выделили 3,3 мг олигосахарида (I) ($[\alpha]_D +25,5^\circ$ (с 0,003)).

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Шапков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. Биооргани. химия, 1985, т. 11, № 9, с. 1265–1269.
2. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th Ed. Baltimore: Williams, 1974. 1268 p.
3. Elliot C. Ph. D. Manual of bacterial plant pathogens. Waltham: Chronica, Botanica and Co., 1951. 186 p.
4. Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д. Микробиол. журн., 1979, т. 41, № 4, с. 330–339.
5. Palleroni N. In: Bergey's manual of systematic bacteriology/Ed. Holt J. G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 141–199.
6. Otta J. D., English H. Phytopathology, 1971, v. 61, p. 443–452.
7. Whalley M. N., Sequeira L. Recent Adv. Phytochem., 1981, v. 15, p. 213–240.
8. Andersen A. J. Appl. Environ. Microbiol., 1984, v. 48, № 1, p. 31–35.
9. Barton-Willis P. A., Wang M. C., Holliday M. J., Long M. R., Keen N. T. Physiol. Plant Pathol., 1984, v. 25, № 3, p. 387–398.
10. Smith A. R. W., Zamze S. E., Munro S. M., Carter K. J., Pignet R. C. Eur. J. Biochem., 1985, v. 149, № 1, p. 73–78.
11. Akiyama Y., Eda S., Kato K., Tanaka H. Carbohydr. Res., 1984, v. 133, № 2, p. 289–296.
12. Здоровенко Г. М., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И., Захарова И. Я., Кошечкина Л. П. Микробиол. журн., 1982, т. 44, № 2, с. 65–70.
13. Дмитриев Б. А., Бакиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1974, № 10, с. 2335–2338.
14. Bock K., Pedersen C. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1974, № 3, p. 293–297.
15. Шапков А. С., Евстигнеев А. Ю., Деревицкая В. А. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 11, с. 1495–1506.

16. Конрад Г. Е. В кн.: Методы исследования углеводов./Ред. Хорлиш А. Я. М.: Мир, 1975, с. 276-278.
17. Bjoerdal H., Lindberg B., Svennson S. Carbohydr. Res., 1967, v. 5, № 4, p. 433-440.
18. Stoffyn A., Stoffyn P., Orr J. C. Carbohydr. Res., 1972, v. 23, p. 251-260.
19. Гольдшмит Н. Д., Хэй Г. В., Льюис Б. А., Смит Ф. В кн.: Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967, с. 471-478.
20. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Wilkinson S. G., Tahara Y., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova S. G. Eur. J. Biochem., 1986, v. 155, № 3, p. 659-669.
21. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1851-1859.
22. Keller R. M., Wüthrich K. Biol. Magn. Reson., 1981, v. 3, p. 4-52.
23. Бакинковский Л. В., Балаи Н. Ф., Шашков А. С., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 464-466.
24. Lemieux R. U., Back K., Delbaer L. T. D., Koto S., Rao V. S. Can. J. Chem., 1980, v. 58, № 6, p. 631-653.
25. Шашков А. С., Усов А. И., Книрель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1364-1371.
26. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. Carbohydr. Res., 1984, v. 133, № 2, p. 173-185.
27. Klyne W. Biochem. J., 1950, v. 46, № 4, p. xli - xlii.
28. Corin P. A. J., Mazurek M. Can. J. Chem., 1975, v. 53, № 8, p. 1212-1223.
29. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1985, v. 150, № 3, p. 541-550.
30. Fisher E., Bergmann M., Rabe A. Ber., 1920, v. 53, № 11, p. 2362-2388.
31. Kuhn R., Baer H. H. Chem. Ber., 1953, v. 86, № 6, p. 724-730.
32. Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д. Микробиол. журн., 1979, т. 41, № 3, с. 222-228.
33. Hickman J., Ashwell G. J. Biol. Chem., 1966, v. 241, № 6, p. 1424-1428.
34. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. Eur. J. Biochem., 1976, v. 66, № 3, p. 559-566.
35. Львов В. Л., Тохтамышева Н. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 1, с. 60-73.

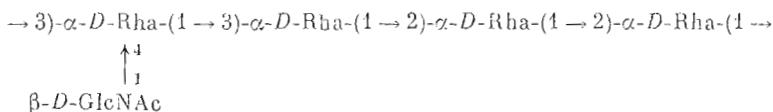
Поступила в редакцию
9.1.1986

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 15. STRUCTURE OF THE REPEATING UNIT OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF *PSEUDOMONAS WIERINGAE* LIPOPOLYSACCHARIDE

KNIREL Yu. A., ZDOROVENKO G. M. *, DASHUNIN V. M., YAKOVLEVA L. M. *,
SHASHKOV A. S., ZAKHAROVA I. Ya. *, GVOZDYAK R. I. *, KOCHETKOV N. K.

*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 chain of *Pseudomonas wieringae* lipopolysaccharide is a linear *D*-rhamnan with *N*-acetyl-*D*-glucosamine residues attached as side chains. Selective Smith degradation of the polysaccharide resulted in oxidation of two rhamnose residues, the terminal *N*-acetylglucosamine remaining intact. On mild hydrolysis with dilute acetic acid and subsequent borohydride reduction, an oligosaccharide was obtained that contained two rhamnose residues, one residue of *N*-acetylglucosamine and glycerol. The structure of the oligosaccharide was determined by nondestructive way using ¹H NMR spectroscopy and nuclear Overhauser effect. Basing upon the structure of the oligosaccharide fragment, methylation analysis and ¹³C NMR data, the following structure of the repeating unit of the polysaccharide was established:



O-Specific chains of the lipopolysaccharides from *Pseudomonas syringae* pvs *glycinea* L-25, *holci* 1055a, *pisi* 7157 and *atrofaciens* 2846, related to the same serogroup IV as *P. wieringae*, possess the same structure as evidenced by ¹³C NMR analysis.