



УДК 577.114.5:579.841.14

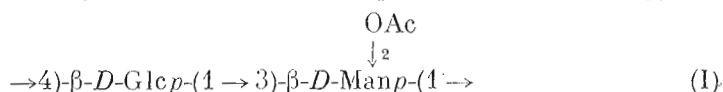
АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ 34 *. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *PSEUDOMONAS CERACIA* ИМВ 4207 (СЕРОТИП А) И ИМВ 598/2

*Кширель Ю. А., Солдаткина М. А. *, Шапиков А. С.,
Танатар Н. В. *, Парамонов Н. А., Захарова П. Я. **

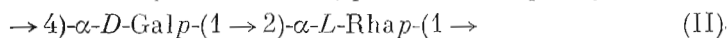
*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва;*

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

На основании бездеструктивного анализа методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и расчета удельного оптического вращения установлено, что О-специфический полисахарид *Pseudomonas ceracia*, штамм ИМВ 4207 (серотип А), имеет структуру (I):



У *P. ceracia*, штамм 598/2, серологически родственного серотипу А (классификация Накамуры) и серотипу 2 (классификация Хейдта), обнаружены два О-специфических полисахарида различной структуры в соотношении $\sim 2,5:1$. Полисахарид, присутствующий в меньшем количестве, имеет структуру (I), а доминирующий полисахарид — структуру (II), которая характерна для О-специфического полисахарида изученного ранее штамма *P. ceracia* ИМВ 4137, родственного серотипу 2:



Продолжая систематическое химическое и иммунохимическое изучение О-антигенов *Pseudomonas ceracia* [1], мы обратились к штамму ИМВ 4207, относящемуся к серотипу А (классификационная схема [2]), и штамму 598/2 и установили строение О-специфических полисахаридных цепей их липополисахаридов.

Липополисахариды были выделены из сухих бактериальных клеток по методу [3]. Они обладали специфической серологической активностью в реакциях с гомологичными О-антисыворотками (титры в реакции кольцепреципитации 1:100 000 и 1:200 000, в реакции пассивной гемагглютинации 1:256 и 1:512 для штаммов ИМВ 4207 и 598/2 соответственно) и давали по одной линии преципитации в агаре с гомологичной О-антисывороткой в тесте Оухтерлона. Кроме того, липополисахарид штамма ИМВ 598/2 в невысоких титрах агглютинировался О-антисывороткой к штамму ИМВ 4207 и в более высоких титрах — О-антисывороткой к штамму ИМВ 4137, относящемуся к серотипу 2 по классификационной схеме Хейдта [4] (титры в реакции пассивной гемагглютинации составляли 1:32 и 1:128 соответственно).

При деградации липополисахаридов разбавленной уксусной кислотой были получены О-специфические полисахариды, выделенные гелем-хроматографией на сефадексе G-50. По специфической серологической активности они были аналогичны исходным липополисахаридам.

Установление строения О-специфического полисахарида штамма ИМВ 4207

В ^1H -ЯМР-спектре полисахарида (рис. 1) присутствовал сигнал О-ацетильной группы при 2,15 м.д. и сигналы протонов двух моносахаридных

* Сообщение 33 см. [1].

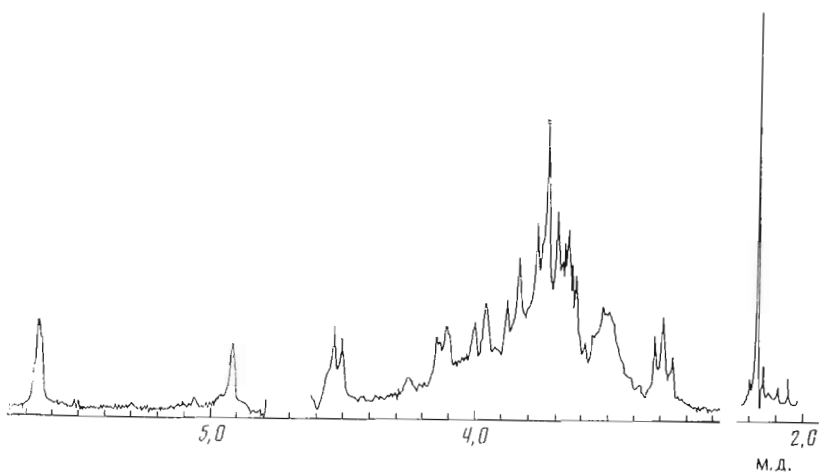


Рис. 1. ^1H -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. serasia* ИМВ 4207

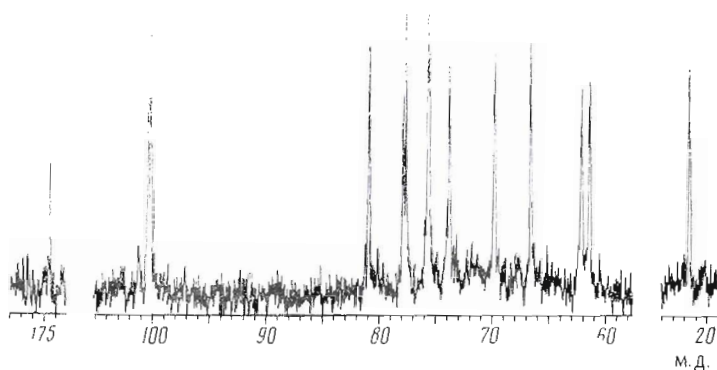


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. serasia* ИМВ 4207

остатков в области 3,2–5,6 м.д. Спектр был полностью расшифрован с использованием селективного гомоядерного двойного резонанса и ядерных эффектов Оверхаузера (табл. 1). На основании констант спи-спигового взаимодействия вицинальных протонов было найдено, что один из моносахаридных остатков является глюкозой, а второй — маннозой, причем оба остатка находятся в пиранозной форме [5]. Значительно более слабopольное положение сигнала H2 остатка маннозы при 5,65 м.д. по сравнению с его обычным положением вблизи 4 м.д. может быть объяснено только дезэкранирующим влиянием О-ацетильной группы, которая находится, таким образом, в положении 2 этого моносахарида.

^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (рис. 2) содержал сигналы одной О-ацетильной группы (CH_3 при 21,6 м.д., CO при 174,5 м.д.) и двух остатков гексоз (два сигнала аномерных углеродных атомов при 100,2 и 100,4 м.д., два сигнала гидроксиметильных групп при 61,4 и 62,1 м.д. и восемь сигналов остальных атомов углерода в области 66,7–80,9 м.д.). Спектр подтверждал, таким образом, что полисахарид является регулярным и построен из дисахаридных повторяющихся звеньев.

^{13}C -ЯМР-спектр был полностью расшифрован с использованием селективного гетероядерного $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ двойного резонанса (табл. 2). Положение сигналов C5 обоих моносахаридных остатков в относительно слабом поле (при 75,6 и 77,6 м.д.) свидетельствовало о том, что оба они присоединены β -гликозидными связями (сигналы C2 α -гексопиранозидов лежат в области 72–74 м.д.) [6]. Смещение в слабое поле к 77,9 и 80,9 м.д. сигнала C3 остатка β -маннопиранозы и C4 остатка β -глюкопиранозы по сравнению с их положением в спектрах незамещенных моносахаридов

Данные ¹H-ЯМР-спектра полисахарида штамма 4207

Протон	Химический сдвиг, м.д	Мультиплетность *	КССВ, Гц	Протон	Химический сдвиг, м.д	Мультиплетность *	КССВ, Гц
-4Glcβ-				-3Manβ-			
H1	4,52	д	$J_{1,2} \approx 8$	H1	4,92	ш	$J_{1,2} \leq 1$
H2	3,29	т	$J_{2,3} \sim 9$	H2	5,65	д	$J_{2,3} \sim 3$
H3	3,61	т	$J_{3,4} \sim 10$	H3	4,12	дд	$J_{3,4} \sim 9,5$
H4	3,65	т	$J_{4,5} \sim 10$	H4	3,73	т	$J_{3,5} \sim 10$
H5	3,46	м		H5	3,52	м	

* д — дублет, т — триплет, м — мультиплет, ш — уширенный синглет.

Таблица 2

Химические сдвиги в ¹³C-ЯМР-спектрах полисахаридов (м.д.)

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Штамм ИМВ 4207						
-4Glcβ-	100,4	73,9	75,7 *	80,9	75,6 *	61,4
-3Manβ-	100,2	69,9	77,9	66,7	77,6	62,2
Штамм ИМВ 4137 [11]						
-4Galα-	98,9	68,7	70,6	77,2	72,3	62,0
-2Rhaα--	100,6	78,5	70,9	73,3	70,3	17,8
Штамм ИМВ 598/2						
Основная серия						
-4Galα-	98,8	68,8	70,7	77,0	72,3	62,1
-2Rhaα-	100,7	78,6	70,9	73,2	70,3	17,9
Минорная серия						
-4Glcβ-	100,4	73,8	75,7 *	80,9	75,6 *	61,4
-3Manβ-	100,2	69,9	77,9	66,6	77,6	62,1

* Отнесение может быть обратным.

Таблица 3

Расчет удельного оптического вращения полисахарида штамма 4207

Соединение	$[\alpha]_D$, град	M_T	$[M]_D$, град
DGlcβ1-OMe [9]	-34	194	-66
DManβ1-OMe [9]	-49	194	-95
Полисахарид			
рассчитано для			
DGlc, DMan	-44	366	-161
LGlc, LMan	+44	366	+161
DGlc, LMan	+8	366	+29
LGlc, DMan	-8	366	-29
экспериментальная величина	-54		

при 74,3 и 70,9 м.д. соответственно [6] вызвано α-эффектами гликозилирования этих моносахаридов [7], и, следовательно, остаток маннозы замещен в положение 3 и остаток глюкозы — в положение 4.

Абсолютные конфигурации моносахаридов были установлены путем расчета удельного оптического вращения полисахарида по методу Кляйна [8] (табл. 3). Расчет привел к величине, хорошо согласующейся с экспериментальным значением, только при D-конфигурации глюкозы и маннозы.

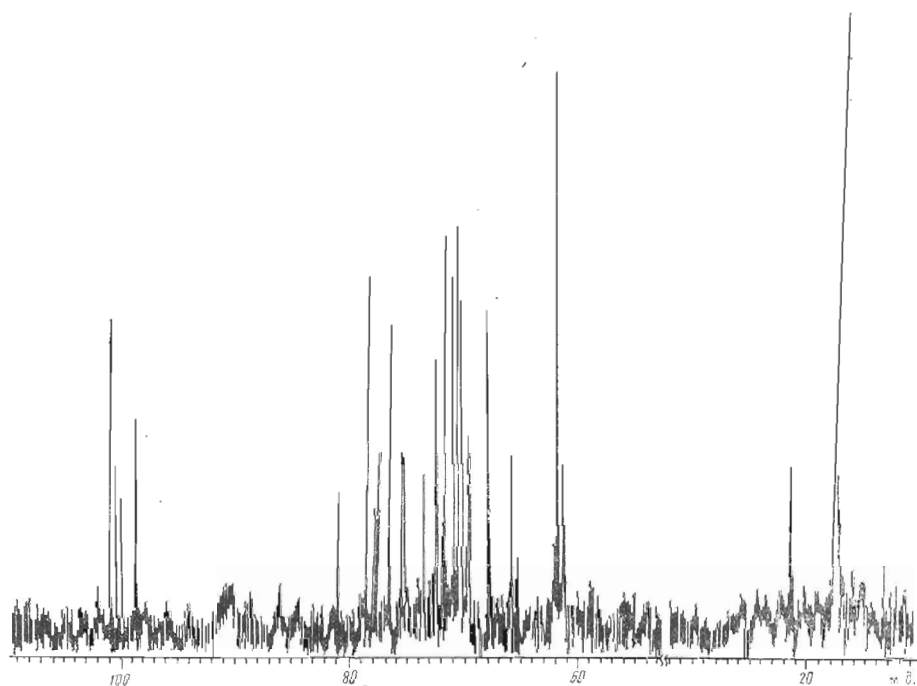
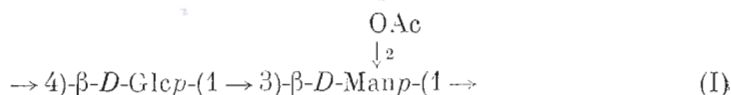


Рис. 3. ^{13}C -ЯМР-спектр полисахаридной фракции *P. serasia* ИМВ 598/2 (область резонанса СО-групп не показана)

Таким образом, согласно полученным данным, О-специфический полисахарид *P. serasia*, штамм ИМВ 4207, имеет структуру (I):



Состав этого полисахарида был подтвержден данными полного кислотного гидролиза, который привел к приблизительно равным количествам глюкозы и маннозы, идентифицированным методом ГЖХ в виде полных ацетатов полиолов.

Установление строения О-специфических полисахаридов штамма ИМВ 598/2

В ^{13}C -ЯМР-спектре полисахаридной фракции (рис. 3), полученной при деградации липополисахарида, присутствовали две серии сигналов с соотношением интегральных интенсивностей $\sim 2,5:1$. Каждая из серий отвечала полисахариду, построенному из дисахаридных повторяющихся звеньев, причем в повторяющемся звено основного полисахарида входило по одному остатку гексозы и 6-дезоксигексозы, а полисахарида, присутствующего в меньшем количестве, — два остатка гексоз и О-ацетильная группа (сигналы CH_3 при 21,6 м.д. и СО при 174,5 м.д.)

Сравнение этого спектра со спектром исследованного ранее [10, 11] О-специфического полисахарида *P. serasia*, штамм ИМВ 4137, показало, что основная серия сигналов в спектре исследуемой полисахаридной фракции составляет спектр полисахарида штамма ИМВ 4137 (табл. 2). Этот полисахарид имеет структуру (II). Минорная серия сигналов спектра полисахаридной фракции образовала спектр изученного в настоящей работе О-специфического полисахарида штамма ИМВ 4207.



Таким образом, штамм 598/2 характеризуется присутствием двух

О-специфических полисахаридов, один из которых имеет структуру (II), такую же, что и полисахарид штамма ИМВ 4137, а второй — структуру (I), характерную для полисахарида штамма ИМВ 4207; относительное содержание полисахаридов (II) и (I) в штамме ИМВ 598/2 составляет ~2,5:1. Этот вывод согласуется с данными по моносахаридному составу полисахаридной фракции, при кислотном гидролизе которой образовались глюкоза, манноза, галактоза и рамноза в соотношении 1,2:1,0:2,5:2,6 (данные получены с помощью анализатора углеводов).

Присутствие двух различных по структуре полисахаридных цепей у липополисахаридов грамотрицательных бактерий отмечается довольно редко. Однако у *P. serasia* это явление, по-видимому, достаточно распространено. Так, кроме штамма ИМВ 598/2 оно наблюдается для штамма 4176 [12] и ряда других штаммов (данные будут опубликованы позднее). В пользу того, что оба обнаруженных у штамма ИМВ 598/2 полисахарида действительно являются О-специфическими, косвенно свидетельствует тот факт, что каждый из них выступает в качестве единственной полисахаридной цепи липополисахаридов других штаммов *P. serasia* (ИМВ 4137 и 4207).

Одновременным присутствием О-специфических полисахаридов структуры (I) и (II) объясняется серологическое родство штамма ИМВ 598/2 со штаммами ИМВ 4137 и 4207, что также доказывает роль этих полимеров как специфических антигенов, связанных с термостабильным липополисахаридным антигеном.

Экспериментальная часть

Общие методы, выращивание бактериальных культур, выделение липополисахаридов и О-специфических полисахаридов, кислотный гидролиз см. [13].

Штамм *P. serasia* ИМВ 4207 (-Gifu 627=RH 2048) был любезно предоставлен д-ром Шигета (Япония); штамм ИМВ 598/2 был выделен из ризосферы папоротника сотрудниками Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Солдаткина М. А., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 10. С. 1413—1418.
2. Nakamura Y., Uyodo S., Chonan E., Shigeta S., Yabuuchi E. // J. Clin. Microbiol. 1986. V. 24. № 1. P. 152—154.
3. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов / Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 325—327.
4. Heidt A., Monteil H., Richard C. // J. Clin. Microbiol. 1983. V. 18. № 3. P. 738—740.
5. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293—297.
6. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 27—65.
7. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59—75.
8. Klyne W. // Biochem. J. 1950. V. 46. № 4. P. xli-xlii.
9. Stanek J., Černý M., Kocourek J., Páček J. The monosaccharides. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1963. P. 277.
10. Shashkov A. S., Knirel Y. A., Kasyanchuk N. V., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. C9—C14.
11. Книрель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Танатар И. В., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 536—538.
12. Книрель Ю. А., Танатар И. В., Солдаткина М. А., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1684—1689.
13. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Солдаткина М. А., Парамонов Н. А., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 9. С. 1208—1213.

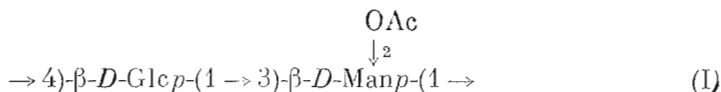
Поступила в редакцию
29.VI.1988

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 34. STRUCTURE
 [OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAINS
 OF LIPOPOLYSACCHARIDES FROM *PSEUDOMONAS CEPACIA*
 STRAINS IMV 4207 (SEROTYPE A) AND IMV 598/2

KNIREL Y. A., SOLDATKINA M. A. *, SHASHKOV A. S., TANATAR N. V. *,
 PARAMONOV N. A., 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 the basis of non-destructive analysis by means of ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and calculation of specific optical rotation, it was concluded that O-specific polysaccharide of *Pseudomonas cepacia* strain IMV 4207 (serotype A) has the structure (I):



Two structurally different polysaccharides were found in the ratio of $\sim 2.5:1$ in *P. cepacia* strain IMV 598/2 which is serologically related to serotype A in Nakamura classification and serotype 2 in Heidt classification. The minor polysaccharide has the structure (I) whereas the major one possesses the structure (II) which is characteristic of the formerly studied O-specific polysaccharide of *P. cepacia* strain IMV 4137 belonging to serotype 2:

