



УДК 577.444.5:579.841.14

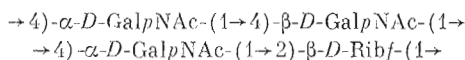
АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ
35 *. УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИСАХАРИДНЫХ
ЦЕПЕЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *PSEUDOMONAS CERACIA*
ИМВ 4176 И ИМВ 4202 (СЕРОТИП 3)

Гнирель Ю. А., Танатар Н. В.*, Солдаткина М. А.*,
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 4176, получены два полисахарида, один из которых оказался гомополимером N-ацетил-D-галактозамина, а второй был построен из равных количеств N-ацетил-D-галактозамина и D-рибозы. При частичном гидролизе раствором щавелевой кислоты гетерополисахарид избирательно деполлимеризовался, и гомополисахарид был выделен в индивидуальном состоянии. На основании анализа методами метилирования и ¹³C-ЯМР-спектроскопии установлено, что оба полисахарида построены из дисахаридных повторяющихся звеньев, имеющих следующие структуры:



Гетерополисахарид из *P. ceracia*, штамм 4176, идентичен по структуре повторяющегося звена O-специфическому полисахариду *P. ceracia*, штамм ИМВ 4202 (серотип 3), *Pseudomonas aeruginosa* O12 и *Serratia marcescens* O14.

Настоящая работа является продолжением химического и иммунохимического исследования O-антигенов *Pseudomonas ceracia* [1] и посвящена изучению структуры полисахаридных цепей липополисахаридов (ЛПС) *P. ceracia* штаммов ИМВ 4176 и ИМВ 4202.

ЛПС был выделен из сухих бактериальных клеток по методу Вестфалля и очищен ультрацентрифугированием [2]. Он обладал специфической серологической активностью (титры в реакции кольцепреципитации и пассивной гемагглютинации составляли 1:200 000 и 1:128 соответственно) и давал две линии преципитации с гомологичной O-антисывороткой в тесте Оухтерлони. Кроме того, этот ЛПС реагировал с O-антисыворотками к *P. ceracia*, штамм ИМВ 4202 (серотип 3 по классификации [3]), и *P. aeruginosa* O12 (классификация [4]); в свою очередь, ЛПС этих штаммов реагировали с O-антисывороткой к *P. ceracia* ИМВ 4176 (табл. 1).

Путем гидролиза ЛПС штамма 4176 разбавленной уксусной кислотой с последующей гель-хроматографией на сефадексе G-50 была получена полисахаридная фракция, выходящая непосредственно вслед за свободным объемом колонки. Полисахаридная фракция была активна в реакции двойной иммунодиффузии в агаре, давая одну линию преципитации с гомологичной O-антисывороткой.

В ¹H-ЯМР-спектре полисахарида (рис. 1) присутствовали сигналы трех ацетамидных групп при 2,06; 2,00 и 1,98 м.д. и четырех аномерных протонов при 5,20 (уширенный синглет), 5,10 (дублет, $J_{1,2}$ 3,5 Гц), 4,92 (дублет, $J_{1,2}$ 2,5 Гц) и 4,71 м.д. (дублет, $J_{1,2}$ 8 Гц). ¹³C-ЯМР-спектр полисахарида (рис. 2) содержал сигналы трех ацетамидных групп (СН₃ при 23,4; 23,3 и 23,3 м.д., СО при 176,3; 175,6 и 175,2 м.д.), трех углерод-

* Сообщение 34 см. [1].

Данные перекрестных реакций пассивной гемагглютинации ЛПС

ЛПС (антиген)	Обратные титры антител с антисывороткой к		
	<i>P. ceracia</i> 4202	<i>P. ceracia</i> 4176	<i>P. aeruginosa</i> 012
<i>P. ceracia</i> 4202	256 *	128	512
<i>P. ceracia</i> 4176	128	128	256
<i>P. aeruginosa</i> 012	256	64	512

* Выделены титры гомологичных реакций.

ных атомов, связанных с азотом, при 54,0; 51,6 и 51,3 м.д.; четырех аномерных атомов углерода при 108,0; 103,9; 99,1 и 96,9 м.д., четырех гидроксиметильных групп при 64,0; 62,5; 61,7 и 61,7 м.д., а также сигналы 12 углеродных атомов в области 68–84 м.д. Из этих данных следовало, что полисахарид имеет регулярный характер и включает четыре химически неэквивалентных моносахаридных остатка, три из которых являются остатками N-ацетилгексозаминов, а четвертый, судя по общему числу сигналов в ^{13}C -ЯМР-спектре, представляет собой пентозу.

При гидролизе полисахаридной фракции 2 М соляной кислотой образовались галактозамин (62%) и рибоза (19%), идентифицированные с помощью аминокислотного и углеводного анализаторов соответственно, а также хроматографией на бумаге и ГЖХ в виде ацетатов полиолов (после дезаминирования гидролизата [5]). Оба моносахарида были выделены из гидролизата с помощью препаративной хроматографии на бумаге, и на основании удельного оптического вращения была установлена их D-конфигурация.

Для определения типов замещения моносахаридов полисахаридная фракция была подвергнута анализу методом метилирования. В результате исследования частично метилированных сахаров, полученных при расщеплении метилированного продукта, методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов были идентифицированы 3,5-ди-O-метилрибоза и 2-N-метил-3,6-ди-O-метилгалактозамин. Из этих данных следовало, что остаток рибозы находится в полимере в фуранозной форме и замещен в положение 2, а все остатки галактозамина замещены в положение 4.

Далее полисахаридная фракция была подвергнута частичному гидролизу 0,05 М щавелевой кислотой с целью избирательного расщепления рибофуранозидных связей и, как ожидалось, получения тетрасахарида, представляющего собой химическое повторяющееся звено полимера. Однако в результате был получен полисахарид (I), выходящий непосредственно вслед за свободным объемом колонки при геле-хроматографии на сефадексе G-15. ^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (I) содержал сигналы двух ацетамидных групп (CH_3 при 23,5 и 23,2 м.д., CO при 176,3 и 175,2 м.д.), двух атомов углерода, связанных с азотом, при 54,0 и 51,6 м.д., двух аномерных атомов углерода при 103,9 и 99,1 м.д., двух гидроксиметильных групп при 61,8 м.д. (двойной интенсивности) и шесть сигналов в области 68–78 м.д. При гидролизе полисахарида (I) 2 М соляной кислотой в качестве единственного моносахарида образовался галактозамин, идентифицированный как описано выше. Таким образом, полисахарид (I) представляет собой гомополимер N-ацетил-D-галактозамина, построенный из дисахаридных повторяющихся звеньев.

Конфигурации гликозидных связей были установлены на основании констант спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$, определенных из спятого без подавления C,H-взаимодействий ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида (I). Относительно большая величина $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 172,9 Гц для сигнала C1 при 99,1 м.д. и относительно маленькая величина $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 160,9 Гц для сигнала C1 при 103,9 м.д. свидетельствовали, что один из остатков N-ацетилга-

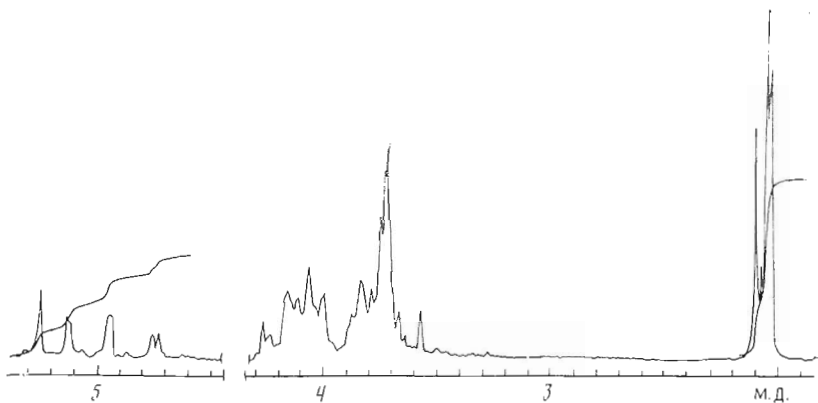


Рис. 1. Спектр ^1H -ЯМР полисахаридной фракции из штамма 4176

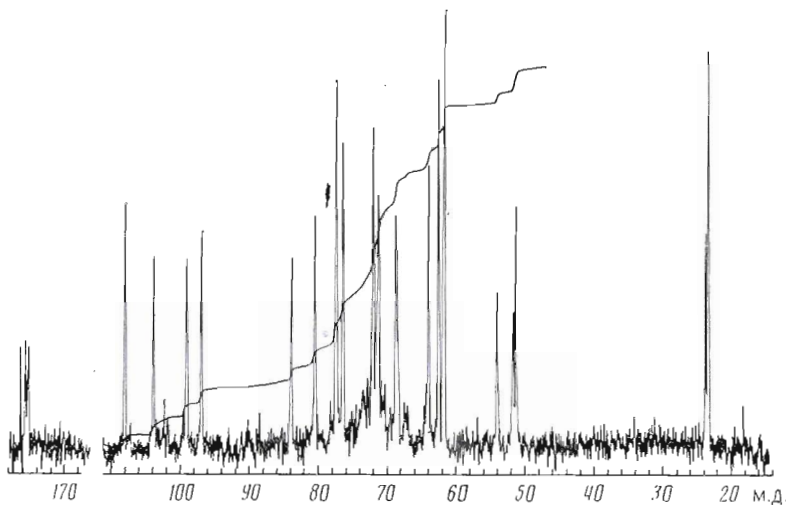
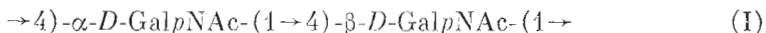


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР полисахаридной фракции из штамма 4176

лактозамина присоединен α -гликозидной, а второй — β -гликозидной связью [6].

Таким образом, с учетом данных метилирования полисахаридной фракции, показавших, что все остатки N-ацетилгалактозамина замещены в положение 4, полисахарид (I) имеет следующую структуру:



Эта структура была подтверждена результатами полной расшифровки ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида (I), выполненной путем сравнения с данными для метил-2-ацетиамидо-2-дезоксигалактопиранозидов (табл. 2).

По данным метилирования полисахаридной фракции, все входящие в ее состав моносахаридные остатки находились в линейной цепи, и, следовательно, образование при ее частичном гидролизе полисахарида (I) указывало на то, что полисахаридная фракция представляет собой смесь двух регулярных полисахаридов. Этот вывод подтверждался сопоставлением ^{13}C -ЯМР-спектров полисахаридной фракции и полисахарида (I), показавшим, что первый спектр содержит второй без каких-либо заметных изменений (разница химических сдвигов соответствующих сигналов не превышала 0,1 м.д.).

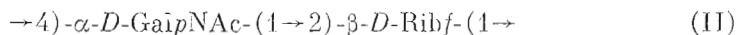
Для выяснения структуры второго компонента полисахаридной фракции — полисахарида (II) в ^{13}C -ЯМР-спектре суммарного препарата путем исключения всех сигналов полисахарида (I) были выделены сигналы,

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

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Полисахарид (I)						
-4GalpNAc α -	99,9	51,6	68,6	77,5	71,5	61,8
-4GalpNAc β -	103,9	54,0	72,1	76,5	76,5	61,8
Полисахарид (II)						
-4GalpNAc α -	96,9	51,3	68,6	77,5	71,5	62,5
-2Rib β -	108,0	80,5	72,1	83,8	64,0	
Метил-4-О-метил-2-ацетамидо-2-дезоксид- <i>D</i> -галактопиранозид [7]						
-4GalpNAc α	99,3	51,5	69,5	80,2	72,4	62,0
-4GalpNAc β	103,6	54,1	72,9	79,5	76,5	61,8

относящиеся к полисахариду (II) (табл. 2). Сигнал C1 при 108,0 м.д. в этой выделенной серии сигналов может относиться только к остатку рибофуранозы, причем его положение в относительно слабом поле доказывает β -конфигурацию этого остатка [8]. Для второго сигнала C1 при 96,9 м.д. была определена константа спин-спинового взаимодействия $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$ 172 Гц, и, следовательно, остаток *N*-ацетилгалактозамына в полисахариде (II) имеет α -конфигурацию [6].

Таким образом, с учетом данных метилирования полисахаридной фракции полисахарид (II) построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, имеющих следующую структуру:



Анализ второго исследованного в настоящей работе *O*-специфического полисахарида *P. seracia*, штамм ИМВ 4202, методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии показал, что он представляет собой регулярный полимер, построенный из повторяющихся звеньев структуры (II). Кроме того, такое же строение характерно для *O*-специфических полисахаридов *P. aeruginosa* O12 [9] и *Serratia marcescens* O14 [10]. Идентичностью структур *O*-специфических полисахаридов *P. seracia* 4202, *P. aeruginosa* O12 и полисахарида (II) объясняются перекрестные серологические реакции ЛПС этих штаммов и *P. seracia* ИМВ 4176 (табл. 1).

Таким образом, *O*-антиген *P. seracia* ИМВ 4176 представлен двумя различными по структуре полисахаридами, один из которых — полисахарид (II) обнаружен в качестве единственного *O*-специфического полисахарида у *P. seracia* ИМВ 4202 (серотип 3) и некоторых других микроорганизмов, а второй — полисахарид (I), по нашим данным, идентифицирован впервые. Наличие у липополисахарида двух различных полисахаридных цепей отмечалось нами для *P. seracia* ИМВ 598/2 [1], а также ряда других штаммов *P. seracia* (данные будут опубликованы позднее) и является, по-видимому, довольно широко распространенным для этого вида.

Тот факт, что полисахариды (I) и (II) выделены из осадка, полученного при ультрацентрифугировании сырого препарата липополисахарида, и что соотношение между количествами этих полисахаридов, приблизительно одинаковое в препаратах липополисахарида, полученных из осадка и супернатанта, доказывает, что оба полисахарида связаны с липидным компонентом. Для выяснения ряда других вопросов, связанных с обнаружением двух различных по структуре *O*-специфических полисахаридных цепей у липополисахарида одного штамма (присоединяются они к одному или разным остаткам липида А, какова их функциональная роль, как протекает их биосинтез), требуются дополнительные исследования.

Авторы выражают благодарность д-ру хим. наук А. С. Шашкову (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР) за съемку ЯМР-спектров.

Экспериментальная часть

¹³C-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) при 60° С с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола (δ 50,15 м.д.) в D₂O. ¹H-ЯМР-спектры сняты в тех же условиях с использованием в качестве внутреннего стандарта ацетона (δ, 2,23 м.д.). ГЖХ-масс-спектрометрия выполнена как описано в работе [11]. Оптическое вращение определяли на приборе Perkin – Elmer, модель 141 (США) в воде при 20° С.

Гель-хроматография проведена на колонках с гелями Sephadex G-50 (3,7×70 см) и Sephadex G-15 (1,6×75 см) в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5; выходные кривые построены с помощью углеводного анализатора Technicon (США). Анализ моносахаридов с использованием углеводного анализатора Technicon и анализатора аминокислот BC-200 (ФРГ) проведен как описано ранее [12]. Восходящая хроматография на бумаге FN-11 выполнена в системе этилацетат – вода – уксусная кислота – пиридин (5:3:1:5); сахара обнаруживали на бумаге щелочным раствором нитрата серебра.

Анализ метилированием был проведен по методу [13], как описано в работе [14]. Получение О-антисывороток и серологические тесты выполнены как описано [15].

Выделение липополисахаридов и полисахаридов. Бактериальный штамм *P. serracia* ИМВ 4176 (=ССМ 2815) получен из Коллекции микроорганизмов ЧССР. Штамм *P. serracia* ИМВ 4202 (=СІР 8237) был любезно предоставлен д-ром Монтейлем из Коллекции Института Пастера (Франция); штамм *P. aeruginosa* O12 получен из Института стандартизации и контроля биологических медицинских препаратов им. И. А. Тарасевича.

Выделение липополисахаридов экстракцией водным фенолом и их очистка ультрацентрифугированием проводились по методу [2]. Липополисахарид штамма ИМВ 4176 (300 мг) расщепляли 1% уксусной кислотой как описано ранее [15], гель-хроматографией на сефадексе G-50 получили полисахаридную фракцию (100 мг), $[\alpha]_D +117,8^\circ$ (с 1), и олигосахаридную фракцию (60 мг); последняя в дальнейшем не исследовалась. О-Специфический полисахарид штамма ИМВ 4202 был получен аналогично.

Моносахаридный состав. В аналитическом варианте полисахаридную фракцию (2 мг) гидролизovali 2 М HCl (1мл, 4 ч, 100° С), гидролизат упаривали, остаток многократно упаривали с водой, анализировали с помощью хроматографии на бумаге, углеводного и аминокислотного анализатора; часть гидролизата дезаминировали и исследовали ГЖХ в виде ацетатов нитролов [5]. В препаративном варианте гидролизат полисахаридной фракции (15 мг) разделяли с помощью препаративной хроматографии на бумаге, выделяли 2 мг D-галактозамин, превращенного в гидрохлорид упариванием с 0,1 М HCl ($[\alpha]_D +67,5^\circ$ (с 0,15), [16]: $[\alpha]_D +91,5^\circ$ (вода)), и 2,2 мг D-рибозы ($[\alpha]_D -20,4^\circ$ (с 0,2), [17]: $[\alpha]_D -23,7^\circ$ (вода)).

Частичный гидролиз. Полисахаридную фракцию (50 мг) гидролизovali 0,05 М раствором щавелевой кислоты (2 мл, 8 ч, 100° С), гидролизат охлаждали, гель-хроматографией на сефадексе G-15 выделили полисахарид (I) (15 мг), $[\alpha]_D +108,3^\circ$ (с 0,7).

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Солдаткина М. А., Шашков А. С., Танатар П. В., Парамонов Н. А., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1678–1683.
2. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов // Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 325–327.
3. Heidt A., Mowteil H., Richard C. // J. Clin. Microbiol. 1983. V. 18. № 3. P. 738–740.
4. Langi B. // Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 1966/1967. V. 13. P. 295–318.
5. 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.
6. Bock K., Pedersen C. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
7. Дерезицкая В. А., Шашков А. С., Новикова О. С., Евстигнеев А. Ю. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 3. С. 410–421.
8. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 27–65.
9. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 9. С. 1265–1269.
10. Brigden C. J., Wilkinson S. G. // Carbohydr. Res. 1983. V. 115. № 2. P. 183–190.
11. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашунин В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Гвоздык Р. И., Кочетков Н. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1253–1262.
12. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 66. № 3. P. 559–566.
13. Коппрад Г. Е. // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлиц А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276–278.
14. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1851–1859.

15. Книрель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Танатар Н. В., Захарова И. Я. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 536-538.
16. Kuhn R., Bister W., Dafeldecker W. // Justus Liebigs Ann. Chem. 1958. V. 617. № 1-3. P. 115-128.
17. Stanek J., Černý M., Kocourek J., Páček J. // The monosaccharides. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 1963. P. 97.

Поступила в редакцию
29.VI.1988

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 35. STRUCTURAL
DETERMINATION OF POLYSACCHARIDE CHAINS
OF THE *PSEUDOMONAS CEPACIA* IMV 4176 AND IMV
4202 (SEROTYPE 3) LIPOPOLYSACCHARIDES

KNIREL Y. A., TANATAR N. V.*, SOLDATKINA M. 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 mild acid degradation of the *Pseudomonas cepacia* strain IMV 4176 lipopolysaccharide, two polysaccharides were obtained, one of which is a homopolymer of N-acetyl-D-galactosamine and the other is composed of equal amounts of N-acetyl-D-galactosamine and D-ribose. Partial hydrolysis with aqueous oxalic acid caused depolymerization of the heteropolysaccharide, and the homopolysaccharide was isolated in the individual state. On the basis of methylation and ^{13}C NMR analysis, it was concluded that both polysaccharides are built up of disaccharide repeating units having the following structures: $\rightarrow 4$ - α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow and $\rightarrow 4$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Ribf-(1 \rightarrow). The heteropolysaccharide from *P. cepacia* strain 4176 is identical by the structure of the repeating unit to the O-specific polysaccharide of *P. cepacia* strain IMV 4202 (serotype 3), *Pseudomonas aeruginosa* O12 and *Serratia marcescens* O14.