



УДК 577.144.5.088.53:543.422.25+579.841.11

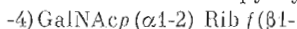
## АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

14\*. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ  
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* O12 (ЛАНИ)

*Бнирель Ю. А., Шапков А. С., Дмитриев В. А.,  
Кочетков Н. К., Станиславский Е. С. \*, Машилова Г. М. \**

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;  
\* НИИ вакцины и сывороток им. Н. Н. Мечникова, Министерство здравоохранения СССР,  
Москва*

При мягком кислотном гидролизе липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa* O12 (классификация Лани) получен О-специфический полисахарид, построенный из остатков D-рибозы и N-ацетил-D-галактозамина. Структура дисахарида



для повторяющегося звена этого полисахарида была установлена бездеструктивным путем в результате полной расшифровки его  $^1H$ - и  $^{13}C$ -ЯМР-спектров с использованием гомоядерного и селективного гетероядерного  $^{13}C\{^1H\}$ -двойного резонанса.

*Pseudomonas aeruginosa* — условно-патогенный микроб, вызывающий тяжелые инфекции при ослаблении иммунозащитной системы вследствие ожогов и хирургических операций. *P. aeruginosa* является сложным в серологическом отношении видом, внутри которого выделяют О-серогруппы, имеющие общие внутригрупповые О-факторы, а также обособленные О-серотины [2, 3]. Проводимое нами исследование О-антигенов *P. aeruginosa* ставит своей целью уточнение существующих серологических классификаций и создание единой классификационной схемы этого вида бактерий на основе структур О-специфических полисахаридов. В настоящем сообщении приведены результаты структурного исследования О-специфического полисахарида одного из обособленных серотипов *P. aeruginosa* O12 (классификация Лани [2]).

При экстракции сухих клеток *P. aeruginosa* O12, штамм 170022, по методу [4] был выделен липополисахарид, который был активен в реакции пассивной геммагглютинации (титр анти-O12-сыворотки 1:3200), а также в ингибировании пассивной геммагглютинации (минимальная ингибирующая доза 25 мкг). Липополисахарид давал одну четкую линию преципитации в агаре; минимальная преципитирующая доза 0,3 мкг. При нагревании липополисахарида с 1% уксусной кислотой с последующей гель-фильтрацией углеводной фракции на сефадексе G-50 был выделен О-специфический полисахарид.

Полисахарид имел  $[\alpha]_D^{+98,5^\circ}$  (с 1). В его  $^1H$ -ЯМР-спектре (рис. 1) присутствовали сигналы двух аномерных протонов (5,26 м.д., уширенный синглет, и 5,14 м.д., дублет,  $J_{1,2}$  2,5 Гц), сигнал ацетильной группы при 2,07 м.д. (синглет, 3H), а также группа сигналов в области 3,7–4,4 м.д. с общей интегральной интенсивностью, отвечающей 11 протонам.  $^{13}C$ -ЯМР-спектр полисахарида (рис. 2) содержал сигналы двух аномерных атомов углерода при 108,0 и 97,0 м.д., одной N-ацетильной группы (CH<sub>3</sub> при 23,1 м.д., CO при 175,6 м.д.), одного углеродного атома, связанного с азотом, при 51,3 м.д., двух первичноспиртовых групп при 64,0 и 62,5 м.д., а также шести вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 68–84 м.д. Таким образом, полисахарид является регулярным и построен из повторяющихся дисахаридных звеньев, содержащих одну гексозу и одну пентозу, причем один из этих моносахаридов — N-ацетилированный аминсахар.

\* Сообщение 13 см. [1].

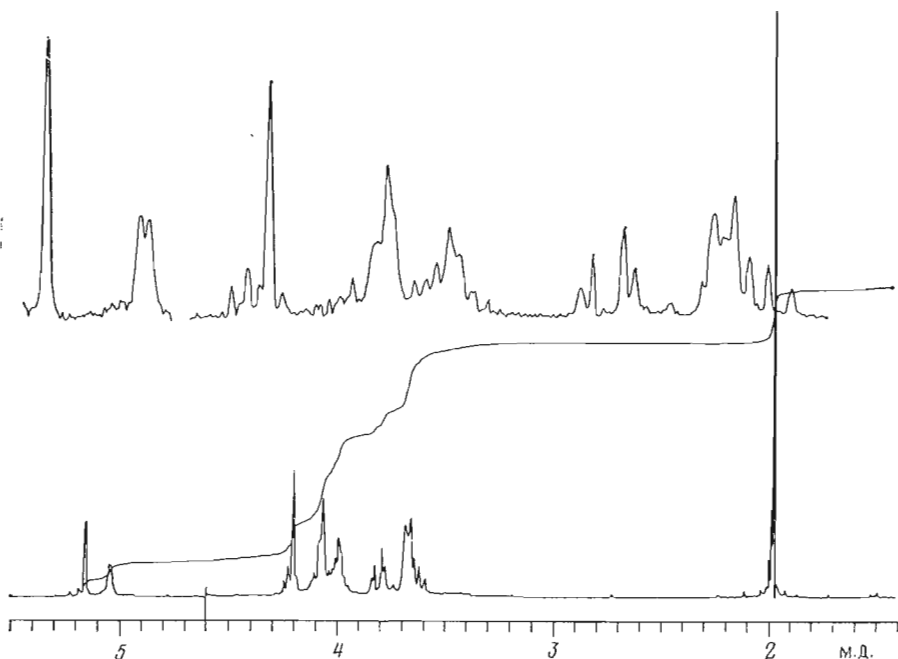


Рис. 1.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида *P. aeruginosa* O12

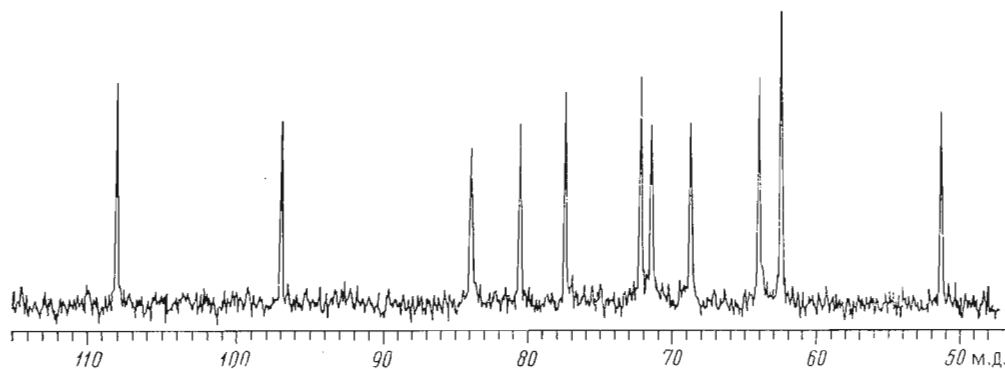


Рис. 2.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр O-специфического полисахарида *P. aeruginosa* O12 (область 50–110 м.д.)

При гидролизе полисахарида 2 М соляной кислотой с последующим дезаминированием [5] методом ГЖХ в виде полных ацетатов полиолов были идентифицированы рибоза и 2,5-ангидроталоза в соотношении  $\sim 1:1$ . Последняя, как известно, образуется в результате дезаминирования галактозамина [5], и, таким образом, повторяющееся звено полисахарида включает один остаток рибозы и один остаток N-ацетилгалактозамина. Рибоза и галактозамин были выделены из гидролизата полисахарида с помощью препаративной хроматографии на бумаге, и на основании величины оптического вращения была установлена D-конфигурация обоих моносахаридов.

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр полисахарида был расшифрован с помощью гомоядерного двойного резонанса (табл. 1) и затем с помощью селективного гетероядерного  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -двойного резонанса был расшифрован его  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр (табл. 2). Положение сигнала C-1 рибозы (звено B) при 108 м.д. в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре показывало, что этот остаток находится в фуранозной форме и имеет  $\beta$ -конфигурацию [6]. Этот вывод подтверждался сравнением констант спин-спинового взаимодействия vicинальных протонов остатка рибозы с данными для метил- $\alpha$ - и - $\beta$ -D-рибофуранозидов [7] (табл. 1). Химический сдвиг сигнала C-1 (97 м.д.) и величина константы спин-спи-

Параметры  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров

Соединение	Звено	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Константа спин-спинового взаимодействия, Гц
Полисахарид <i>P. aeruginosa</i> O12	А	H-1	5,14	$J_{1,2,2,6}$
		H-2	4,18	
		H-3	4,18	
		H-4	4,09	
		H-5	4,18	
	Б	H-6,6'	3,78	$^{1/2}(J_{5,6}+J_{5,6'})$ 6
		H-1	5,26	
		H-2	4,32	
		H-3	4,30	
		H-4	4,12	
Метил- $\alpha$ -D-рибофуранозид [7]	H-5	3,91	$J_{5,5'}$ 12	
	H-5'	3,73	$J_{4,5'}$ 7	
	H-1	4,98	$J_{1,2}$ 4,3	
	H-2	4,10	$J_{2,3}$ 6,3	
	H-3	4,03	$J_{3,4}$ 3,4	
Метил- $\beta$ -D-рибофуранозид [7]	H-4	4,09	$J_{3,4}$ 3,4	
	H-5	3,72	$J_{4,5}$ 3,4	
	H-5'	3,66	$J_{5,5'}$ 12,3	
	H-1	4,89	$J_{4,5'}$ 4,4	
	H-2	4,02	$J_{1,2}$ 0,8	
	H-3	4,14	$J_{2,3}$ 4,6	
	H-4	4,00	$J_{3,4}$ 7,0	
	H-5	3,78	$J_{4,5}$ 3,2	
	H-5'	3,59	$J_{5,5'}$ 12,4	
			$J_{4,5'}$ 6,4	

Таблица 2

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

Соединение	Звено	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Полисахарид <i>P. aeruginosa</i> O12	А	97,0	51,3	68,7	77,4	72,2	62,5
	Б	108,0	80,5	71,4	83,9	64,0	
Метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозид [9] *		99,4	51,1	69,1	69,7	71,8	62,3
Метил- $\beta$ -D-рибофуранозид [10]		109,0	75,3	71,9	83,9	63,9	61,9
Метил-4-О-метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозид [9] *		99,3	51,5	69,5	80,2	72,3	
Метил-2-О-изопропил- $\beta$ -D-рибофуранозид [10]		108,0	80,7	71,2	84,4	63,6	62,5
Полисахарид <i>E. coli</i> O20a, b : K84 : НЗ4 [12]	А	98,7	69,5	70,7	78,3	72,0	
	Б	108,1	80,7	71,5	84,3	63,8	

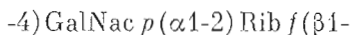
\* Химические сдвиги приведены с аддитивной поправкой +0,7 м. д., необходимость которой вызвана различиями в условиях съемки спектров в работе [9] и в настоящей работе.

нового взаимодействия аномерного атома углерода с аномерным протоном ( $^1J_{\text{CH}} 172,9$  Гц), определенная из спектра, снятого без подавления взаимодействий  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ , свидетельствовали о том, что остаток N-ацетилгалактозамина (звено А) находится в пиранозной форме [6] и присоединен  $\alpha$ -гликозидной связью [8]. Этому соответствовало положение сигнала С-2 этого остатка при 51,3 м.д. (сигнал С-2 N-ацетилгалактозамина с  $\beta$ -конфигурацией лежит в более слабом поле, чем 52,5 м.д. [9]), а также относительно небольшая константа  $J_{1,2}$  2,6 Гц в  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре полисахарида.

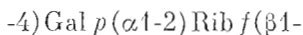
Сопоставление данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида с данными для метил- $\beta$ -D-рибофуранозид [10] и метил-2-ацетиамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозид [9] показало значительное слабопольное смещение С-2 остатка рибозы и С-4 остатка N-ацетилгалактозамина в спектре полисахарида по сравнению со спектрами соответствующих модельных соединений (на 6 и 7,7 м.д. соответственно). Направление и величина этого смещения характерны для  $\alpha$ -эффектов гликозилирования, и, следовательно,

остаток рибозы замещен в положение 2, а остаток N-ацетилгалактозамина — в положение 4. Этот вывод подтверждается хорошим совпадением данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра полисахарида с данными для соответствующим образом алкилированных модельных моносахаридов: метил-2-O-изопропил- $\beta$ -D-рибофуранозид [10] и метил-4-O-метил-2-ацетида-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозид [9] (табл. 2).

Таким образом, на основании данных бездеструктивного исследования физическими методами ( $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопией) повторяющееся звено O-специфического полисахарида *P. aeruginosa* O12 имеет структуру



Такое же повторяющееся звено и идентичный  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр имеет полисахаридная цепь липополисахарида *Serratia marcescens* O14 [11]. Ее структура была установлена с использованием метода метилирования. Родственное этому полисахариду строение имеет также O-специфический полисахарид *Escherichia coli* O20a,b:K84:H34 [12]. Его повторяющееся звено представляет собой дисахарид, построенный из остатков  $\beta$ -D-рибофуранозы и  $\alpha$ -D-галактопиранозы, соединенных тем же способом, что и в полисахариде *P. aeruginosa* O12:



Таким образом, повторяющееся звено полисахарида *P. aeruginosa* O12 является 2-ацетида-2-дезоксипроизводным повторяющегося звена полисахарида *E. coli* O20 a,b:K84:H34. Введение ацетидагруппы в положение 2 остатка галактозы вызывает в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида сильное изменение смещения сигнала C-2 этого остатка от 69,5 к 51,3 м.д., а также сигналов соседних атомов C-1, C-3, C-4 от 98,7; 70,7 и 78,3 к 97,0; 68,7 и 77,4 м.д. соответственно, тогда как положение остальных сигналов в спектре изменяется незначительно (табл. 2).

### Экспериментальная часть

Восходящая хроматография выполнена на бумаге FN-11 в системе этилацетат — вода — уксусная кислота — пиридин (5 : 3 : 1 : 5) с обнаружением сахаров щелочным раствором нитрата серебра. Гель-фильтрация проведена на колонке (3,7×55 см) с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5. ГЖХ проведена на приборе Pye Unicam, серия 104, на колонке с 3% SE-30, газ-носитель — азот, скорость 30 мл/мин.

Спектры ЯМР сняты на приборе WM-250 (Bruker) в  $\text{D}_2\text{O}$  при 60° C (для  $^1\text{H}$ ) или 40° C (для  $^{13}\text{C}$ ) с использованием в качестве внутреннего стандарта 2,2-диметил-5-спилапентап-5-сульфокислоты (для  $^1\text{H}$ ) или метанола (для  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta_{\text{с}}$  50,15). Оптическое вращение определяли на приборе Perkin — Elmer, модель 141, при 20° C в воде. Растворы упаривали в вакууме при 40° C или лиофилизировали. Серологические тесты проводили как описано в работах [13, 14].

**Выделение O-специфического полисахарида.** Бактериальная культура *P. aeruginosa* O12, штамм 170022, была любезно предоставлена д-ром Лани (Институт гигиены, Будапешт). Выращивание клеток проводилось как описано нами ранее [13]. Высушенные ацетоном клетки (30 г) экстрагировали 45% водным фенолом [4], водный слой отделяли, диализовали, нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном, липополисахарид — этанолом [4], диализовали. Выход липополисахарида 8%, считая на сухие клетки.

Липополисахарид (800 мг) нагревали с 1% уксусной кислотой (100 мл, 100° C, 1 ч), осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант концентрировали до объема 10 мл, гель-фильтрацией на сефадексе G-50 выделяли O-специфический полисахарид (250 мг) и олигосахаридную фракцию (280 мг); последняя в дальнейшем не исследовалась.

Моносахаридный состав. Полисахарид (2 мг) гидролизовали 2 М НСl (1 мл, 100° С, 2 ч), гидролизат упаривали, остаток дезаминировали и анализировали ГЖХ как описано в работе [5].

Полисахарид (30 мг) гидролизовали 2 М НСl (3 мл, 100° С, 3 ч), гидролизат упаривали, остаток многократно упаривали с водой, препаративной хроматографией на бумаге выделили *D*-рибозу (6 мг),  $[\alpha]_D -19,6^\circ$  (с 0,5), ср. [15]  $[\alpha]_D -23,7^\circ$  (вода), и *D*-галактозамин (5 мг), который упариванием с 0,1 М НСl и затем с водой превратили в хлоридрат,  $[\alpha]_D +81^\circ$  (с 0,5), ср. [16]  $+91,5^\circ$  (вода).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Танатар Н. В., Захарова И. Я. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 4, с. 536–538.
2. Lányi B. Acta microbiol. Acad. sci. hung., 1966/1967, v. 13, p. 295–318.
3. Lányi B., Bergan T. Methods in Microbiol., 1978, v. 10, p. 93–168.
4. Вестфаль О., Янн К. В кн.: Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967, с. 325–332.
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. Шашков А. С., Чижов О. С. Биоорган. химия, 1976, т. 2, № 4, с. 437–497.
7. Angyal S. J. Carbohydr. Res., 1979, v. 77, № 1, p. 37–50.
8. Bock K., Pedersen C. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1974, p. 293–297.
9. Дерезицкая В. А., Шашков А. С., Новикова О. С., Евстигнеев А. Ю. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 410–421.
10. Gorin P. A. J., Mazurek M. Carbohydr. Res., 1976, v. 48, № 2, p. 171–186.
11. Brigden C. J., Wilkinson S. G. Carbohydr. Res., 1983, v. 115, № 2, p. 183–190.
12. Васильев В. Н., Захарова И. Я., Шашков А. С. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 1, с. 120–125.
13. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kocharova N. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1980, v. 106, № 2, p. 643–651.
14. Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1983, v. 134, № 2, p. 289–297.
15. Stanek J., Cerný M., Kocourek J., Pacák J. The monosaccharides. Prague: Publish House of the Czechoslovak Academy of Science, 1963, p. 97.
16. Kuhn R., Bister W., Dajfeldecker W. Justus Liebig's Ann. Chem., 1958, v. 617, p. 115–128.

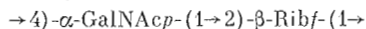
Поступила в редакцию  
18.III.1985

#### ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 14. STRUCTURE OF THE O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF A LIPOPOLYSACCHARIDE FROM *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* O12

KNIREL Yu. A., SHASHKOV A. S., DMITRIEV B. A.,  
KOCHETKOV N. K., STANISLAVSKY E. S. \*, MASHILOVA G. M. \*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; \*I. I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera,  
Ministry of Public Health of the USSR, Moscow*

The lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* O12 (Lányi classification) gave on mild acid hydrolysis an O-specific polysaccharide built of *D*-ribose and N-acetyl-*D*-galactosamine. The disaccharide structure



for the repeating unit of the polysaccharide was established by nondestructive way involving full interpretation of its  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR-spectra, using homonuclear and selective heteronuclear  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  double resonances.