



УДК 577.114.5.088.53:579.841.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

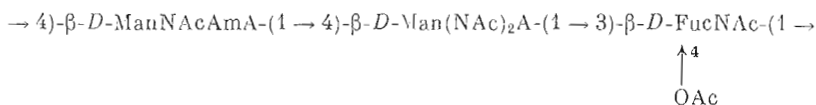
16.* СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* O25 (ВОКАЧ)

*Книрель Ю. А., Виноградов Е. В., Парамонов Н. А., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С. *, Машилова Г. М. **

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

** Институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова Минздрава СССР, Москва*

При мягком кислотном гидролизе липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa* O25 (классификация Вокача) получен О-специфический полисахарид, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих 3-ацетамидино-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-*D*-маннуроновую кислоту (ManNAcAmA), 2,3-диацетамидо-2,3-дидезокси-*D*-маннуроновую кислоту (Man(NAc)₂A), *N*-ацетил *D*-фукозамин (FucNAc) и О-ацетильную группу. На основании результатов О-деацетилирования полисахарида при действии водного триэтиламина с одновременным гидролизом ацетамидиновой группы в ацетамидную, а также данных ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектров установлена следующая структура повторяющегося звена этого полисахарида:



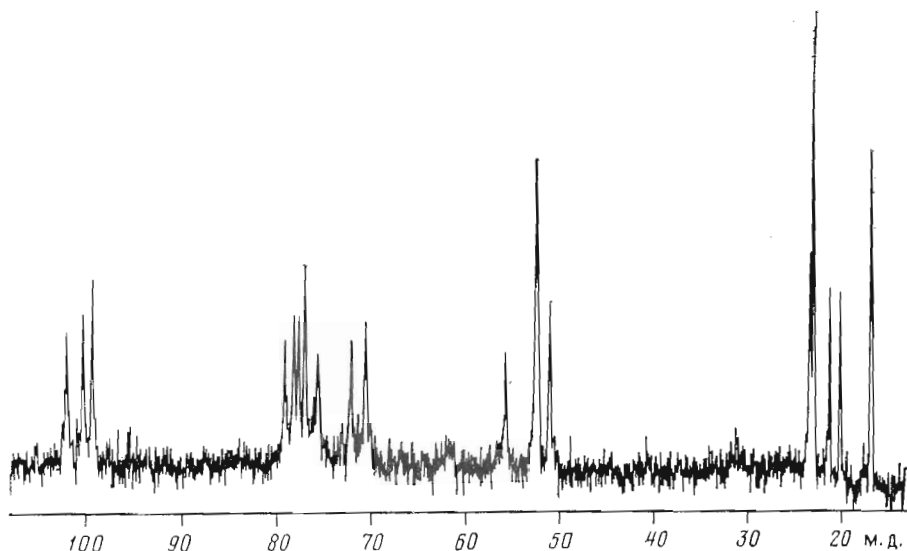
Полисахарид *P. aeruginosa* O25 имеет такой же углеводный скелет, что и изученный ранее полисахарид *P. aeruginosa* O3a,b (классификация Лани), и отличается от него только присутствием О-ацетильной группы в положении 4 *N*-ацетилфукозамина.

Наиболее полными из существующих в настоящее время серологических классификаций условно-патогенного микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* являются классификационные схемы Лани [2] и Лани — Бергана [3] с добавлением, сделанным в работе [4]. В соответствии со схемой Лани сложная O3-серогруппа включает пять серотипов; в классификации Лани — Бергана им соответствуют пять серотипов O2-серогруппы. Согласно данным [4], эта O-серогруппа должна быть расширена за счет включения в нее в качестве шестого O-серотипа *P. aeruginosa* O25 (классификация Вокача [5]).

В ходе систематического химического и иммунохимического изучения О-антигенов мы установили строение О-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов четырех серотипов *P. aeruginosa* O3-серогруппы (Лани), подтвердив обоснованность их объединения в одну О-серогруппу и в то же время выделения каждого из них в самостоятельный О-серотип [6—8]. В настоящей работе приведены данные по установлению структуры О-специфического полисахарида *P. aeruginosa* O25 (Вокач).

Липополисахарид был выделен экстракцией сухих бактериальных клеток 45% водным фенолом с последующим осаждением пукленовых кислот цетавлоном [9]. О-Специфический полисахарид был получен мягким кислотным гидролизом липополисахарида 1% уксусной кислотой с последующей гель-фильтрацией углеводной фракции на сефадексе G-50.

* Сообщение 15 см. [1].



^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. aeruginosa* O25 (Вокач)

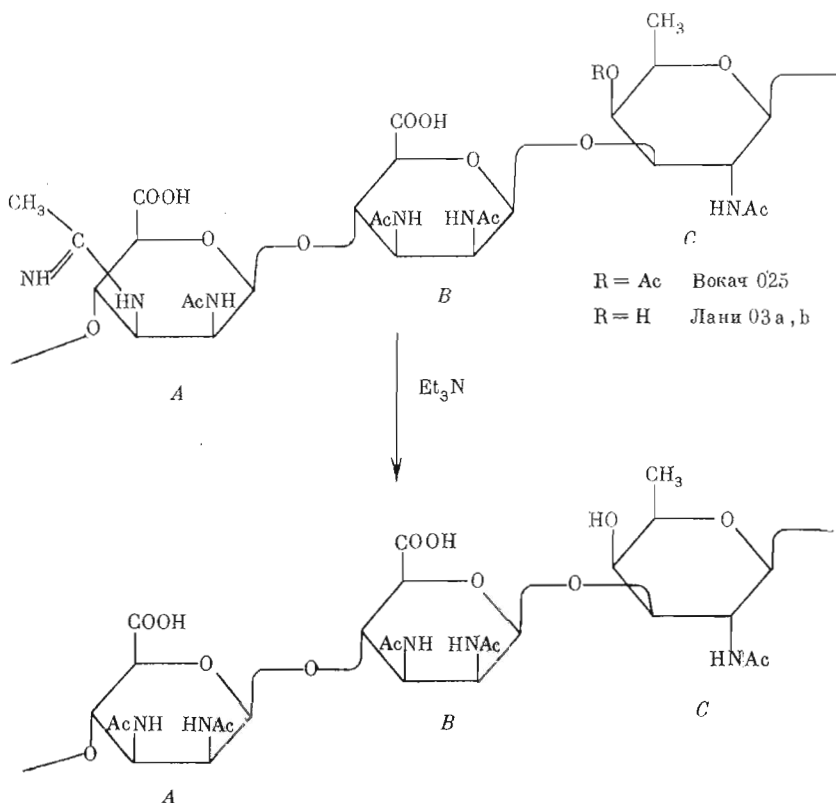
^1H -ЯМР-спектр полисахарида содержал сигнал метильной группы одного 6-дезоксисахара при 1,14 м.д. (дублет, $J_{5,6}$ 6,5 Гц), шесть сигналов в области резонанса О- и N-ацетильных и ацетамидиновых групп ($\delta_{\text{с}}$ 1,93–2,21, 6 CH_3 , синглеты; ср. данные [6–8]), группу перекрывающихся сигналов в области 3,85–4,55 м.д. и три сигнала единичной интенсивности при 4,72, 4,85 и 5,18 м.д. (уширенные синглеты).

^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (таблица, рисунок) показывал, что он имеет регулярную структуру и построен из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два характерных для полисахаридов этой серогруппы [6–8] производных диаминоуроновых кислот, в том числе ацетамидиновое производное, а также N-ацетилфукозамин. Действительно, спектр содержал сигнал С6 N-ацетилфукозамина при 16,9 м.д., сигналы четырех N-ацетильных групп ($\delta_{\text{с}}$ 23,4, 4 CH_3), ацетамидиновой группы ($\delta_{\text{с}}$ 20,2, CH_3 , 167,0, $\text{N}-\text{C}=\text{N}$), пять сигналов атомов углерода, свя-

занных с азотом, при 51,1–55,8 м.д., семь сигналов атомов углерода, связанных с кислородом, в области 70,5–79,1 м.д. и три сигнала аномерных углеродных атомов при 99,3, 100,3 и 102,0 м.д. Кроме того, в спектре присутствовал сигнал О-ацетильной группы ($\delta_{\text{с}}$ 21,5, CH_3), а также сигналы карбониллов О- и N-ацетильных и карбоксильных групп в области 172–175 м.д.

При обработке полисахарида разбавленным водным триэтиламином происходило О-деацетилирование и одновременное превращение ацетамидиновой группы в ацетамидную (схема). В результате был получен модифицированный полисахарид. ^{13}C -ЯМР-спектр которого полностью совпал со спектром обработанного аналогичным образом О-специфического полисахарида *P. aeruginosa* O3a,b (Лани) [6] (таблица). Сравнение спектров интактных полисахаридов Лани O3a,b и Вокач O25 показало, что единственное различие между ними состоит в присутствии в последнем О-ацетильной группы. Так как в полисахариде Лани O3a,b имеется только одна свободная гидроксильная группа (НО-4 N-ацетилфукозамина), по-видимому, она и несет О-ацетильную группу.

Это предположение было также строго доказано методом ЯМР-спектроскопии. ^{13}C -ЯМР-спектроскопия широко используется для локализации О-ацетильных групп (например, [10]), однако ее применение предполагает надежное отнесение сигналов в спектре. В настоящей работе с этой целью был использован селективный гетероядерный $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ двойной резонанс. В слабополярной области ^1H -ЯМР-спектра полисахарида Вокач



025 наряду с сигналами аномерных протонов при 4,72 и 4,85 м.д. *, присутствующими также в спектре полисахарида Лани 03a,b [6], имелся сигнал с химическим сдвигом 5,18 м.д. Этот сигнал может принадлежать только протону при несущем ацетоксигруппу атоме углерода, положение резонанса которого смещено в слабое поле вследствие сильного дезэкранирующего эффекта этой группы. При селективном облучении этого протона в ^{13}C -ЯМР-спектре наблюдалось появление единственного синглетного сигнала при 72,1 м.д., который, следовательно, и принадлежит атому углерода, несущему ацетоксигруппу. В этой области спектра в соответствии с проведенной ранее [6] расшифровкой для полисахарида Лани 03a,b (таблица) находятся только сигналы C4 и C5 N-ацетилфукосамина, и, таким образом, O-ацетильная группа локализована в положении 4 этого моносахарида. Различия в ^{13}C -ЯМР-спектрах полисахаридов Лани 03a,b и Вокач 025 соответствуют сделанному выводу. Так, в спектре полисахарида Вокач 025 сигнал C4 N-ацетилфукосамина смещен на 1,8 м.д. в слабое поле, а сигналы C3 и C5 этого моносахарида — на 2,5 и 1 м.д. в сильное поле соответственно по сравнению с их положением в спектре полисахарида Лани 03a,b, что является следствием эффектов ацетилирования по O4 [11].

Использованный здесь метод локализации O-ацетильной группы может быть применен и для других полисахаридов, так как сигналы протонов при атомах углерода, несущих ацетоксигруппу, обычно лежат в ^1H -ЯМР-спектре в значительно более слабом поле, чем сигналы остальных неаномерных протонов, и их положение может быть легко определено без полной расшифровки спектра путем сравнения спектров интактного и O-деацетилированного полисахаридов.

Таким образом, O-специфический полисахарид *P. aeruginosa* 025 (Вокач) имеет структуру, приведенную на схеме. По нашим данным, этот полисахарид представляет собой первый пример природного полисахари-

* Сигнал третьего аномерного протона не виден в спектре из-за его перекрывания с сигналом H₂O.

Химические сдвиги в ¹³C-ЯМР-спектрах

Полисахарид	δ, м. д.					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	Звено А					
Вокач О25	99,3	51,1	55,8	75,6	77,6	
Лани О3а,в [6]	100,3	50,9	55,7	75,2	77,5	
Обработанный Et ₃ N *	100,9	51,7	53,0	75,3	76,6	
	Звено В					
Вокач О25	100,3	52,4	52,6	77,0	78,2	
Лани О3а,в [6]	100,9	52,3	52,8	76,6	78,1	
Обработанный Et ₃ N *	100,9	52,0	52,8	75,7	77,0	
	Звено С					
Вокач О25	102,0	52,4	79,1	72,1	70,5	16,9
Лани О3а,в [6]	102,3	51,5	81,6	70,3	71,5	16,9
Обработанный Et ₃ N *	102,3	51,7	81,5	70,6	71,5	16,9

* Спектры идентичны для полисахаридов Лани О3а,в [6] и Вокач О25 (данная работа).

да, не содержащего в повторяющемся звене ни одной свободной гидроксильной группы.

Близкое родство О-антигенов *P. aeruginosa* О25 (Вокач) и О3а,в (Лани), выявленное в результате их структурного анализа, подтверждалось также серологическими тестами. В тесте иммунопреципитации по Оухтерлони липополисахариды Вокач О25 и Лани О3а,в реагировали с анти-О3а,в-сывороткой, однако их идентичность была неполной. В реакции пассивной гемагглютинации оба липополисахарида были примерно в равной степени активны с анти-О3а,в-сывороткой. Напротив, в реакции торможения пассивной гемагглютинации выявились различия в их специфичности. В тест-системе липополисахарид О3а,в/анти-О3а,в-сыворотка минимальная ингибирующая доза для гомологичного липополисахарида О3а,в составила 1,5–2,5 мкг, а гетерологичного липополисахарида Вокач О25 – 500 мкг. Это антигенное различие, очевидно, обусловлено присутствием в полисахаридной цепи липополисахарида Вокач О25 О-ацетильной группы, отсутствующей в липополисахариде Лани О3а,в.

Таким образом, в результате настоящего исследования получило обоснование на уровне структур О-антигенов включение *P. aeruginosa* О25 (Вокач) в О3- (Лани [2]) или О2-серогруппу (Лани – Берган [3]) в качестве самостоятельного О-серотипа.

Экспериментальная часть

ЯМР-спектры сняты на приборе АМ-300 (Bruker) в D₂O при 70° С с использованием в качестве внутреннего стандарта ацетона (δ_H 2,23) или метанола (δ_C 50,15). Оптическое вращение определяли на автоматическом поляриметре Perkin – Elmer, модель 141, в воде при 20° С. Гель-фильтрацию выполняли на колонке (55×3,7 см) с сефадексом G-50 в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5; элюционная кривая построена с использованием анализатора углеводов Technicon (США). Серологические тесты проведены как описано ранее [7, 10].

Выделение липополисахарида и О-специфического полисахарида. Бактериальная культура *P. aeruginosa* О25 (Вокач) была получена из ВНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Выращивание клеток проводилось как описано ранее [12]. Липополисахарид выделяли по методу Вестфала [9] с выходом ~4% от веса сухих клеток.

Липополисахарид (500 мг) нагревали с 1% CH₃CO₂H (70 мл, 100° С, 3 ч), осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант концентрировали до объема 5 мл, гель-фильтрацией на сефадексе G-50 выделили 120 мг О-специфического полисахарида ([α]_D –26,7° (с 1)) и олигосахаридную фракцию (150 мг), которая в дальнейшем не исследовалась.

Обработка полисахарида триэтиламинол. Полисахарид (80 мг) растворили в 5 мл воды, добавили 0,2 мл перегнанного триэтиламина, нагревали 3 ч при 70° С, упарили до 40° С в вакууме, остаток растворили в 5 мл воды, обработали 5 мл катионита КУ-2 (Н⁺-форма), встряхивая периодически в течение 15 мин, фильтрат лиофилизировали, получили 70 мг модифицированного полисахарида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашулин В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова Н. Я., Гвоздяк Р. И., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 9. с. 1253—1262.
2. Lányi B. Acta microbiol. Acad. sci. hung., 1966/1967, v. 13, p. 295—318.
3. Lányi B., Bergan T. Meth. Microbiol., 1978, v. 10, p. 93—168.
4. Акарова Н. С., Смирнова Н. Е. Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 1982, № 7. с. 87—91.
5. Wokatsch R. Zbl. Bakt., I. Abt., Orig., 1964, B. 192, S. 468.
6. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 128, № 1, p. 81—90.
7. Knirel Y. 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.
8. Книрель Ю. А., Парамонов Н. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 7, с. 995—997.
9. Вестфаль О., Яни К. В кн.: Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967, с. 325—332.
10. 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.
11. Cagnaire D., Mancier D., Vincendon M. Org. Magn. Reson., 1978, v. 11, № 7, p. 344—349.
12. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kocharova N. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1980, v. 106, № 2, p. 643—651.

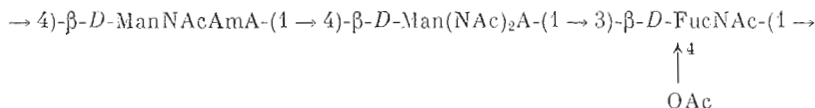
Поступила в редакцию
9.1.1986.

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 16. STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* O25 (WOKATSCH) LIPOPOLYSACCHARIDE

KNIREL Yu. A., VINOGRADOV E. V., PARAMONOV N. A., SHASHKOV A. S., 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*

O-Specific polysaccharide built up of trisaccharide repeating units containing 3-acetamidino-2-acetamido-2,3-dideoxy-*D*-mannuronic acid (ManNAcAmA), 2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-*D*-mannuronic acid (Man(NAc)₂A), *N*-acetyl-*D*-fucosamine (FucNAc), and O-acetyl group was obtained on mild acid hydrolysis of *P. aeruginosa* O25 (Wokatsch classification) lipopolysaccharide. Basing on de-O-acetylation of polysaccharide with aqueous triethylamine accompanied by hydrolysis of acetamidino group to acetamido group, as well as on the ¹H and ¹³C NMR data, the following structure of the repeating unit of the polysaccharide was established:



P. aeruginosa O25 polysaccharide has the same carbohydrate skeleton as that of *P. aeruginosa* O3a,b (Lányi classification) and differs from the latter only by the presence of the O-acetyl group at position 4 of *N*-acetyl fucosamine.