



УДК 577.114.5.088.53:579.841.11:579.222.3'114

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

17.* СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ
ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSUDOMONAS AERUGINOSA*
X (МЕЙТЕРТ)

*Кширель Ю. А., Кочарова Н. А., Шапков А. С.,
Варбанец Л. Д.**, Бочетков Н. К., Станиславский Е. С.*,
Машилова Г. М.**

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

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

При мягком кислотном расщеплении липополисахарида *P. aeruginosa* X (классификация Мейтерта) с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-50 получен О-специфический полисахарид, содержащий *L*-рамнозу и 2-ацетамидо-2-дезоксидманнозу. На основании бездеструктивного анализа с помощью ^1H -, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и расчета по правилу Кляйла, а также анализа химическими методами (кислотный гидролиз, метилирование и распад по Смитчу) установлена следующая структура дисахаридного повторяющегося звена: $\rightarrow 4$ - α -*L*-Rha-(1 \rightarrow 3)- β -*D*-ManNAc-(1 \rightarrow

Одной из наиболее полных серологических классификаций условно-патогенного микроорганизма *P. aeruginosa*, вызывающего тяжелые гнойно-септические осложнения при ослаблении естественной иммунозащитной системы, является классификация Лани [2]. В 1978 г. на основе классификации Лани [2] и Хабса [3] с добавлением ряда недостающих серотипов из классификаций Сэндвика, Вердера — Эванса и Мейтерта [4—6] составлена так называемая осложненная классификационная схема этих бактерий [7]. В эту схему наряду с 13 сложными О-серогруппами, включающими от двух до шести О-серотипов каждая, входят четыре обособленных О-серотипа. В ходе химического исследования О-антигенов *P. aeruginosa* нами было установлено строение О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида одного из таких обособленных серотипов O12 (Лани) [8]. В настоящем сообщении приведены данные по структурному анализу О-специфического полисахарида обособленного серотипа X (Мейтерт), обозначенного в осложненной схеме [7] как серотип O14.

Липополисахарид был получен экстракцией сухих бактериальных клеток 45% водным фенолом по методике [9] с тем отличием, что водная и фенольная фазы не разделялись перед диализом. Препарат липополисахарида содержал 5% белка, т. е. несколько больше, чем обычно содержат препараты, выделенные после разделения фаз из водного слоя (0,5—1,5%). Примесь белка не мешает, однако, проведению структурного анализа полисахаридных цепей, так как при расщеплении липополисахарида 1% уксусной кислотой эта примесь отделяется вместе с осадком липида и полученный гель-фильтрацией углеводной фракции на сефадексе G-50 О-специфический полисахарид содержал только 0,5% белка.

В ^1H -ЯМР-спектре полисахарида (рис. 1) присутствовали сигналы метильной группы 6-дезоксисахара при 1,41 м. д. (д, $J_{5,6}$ 6,2 Гц), ацетамидной группы при 2,16 м. д. (синглет), двух аномерных протонов при 5,06 и 5,10 м. д. (уширенные синглеты), а также группы сигналов в области

* Сообщение 16 см. [1].

** Постоянное место работы: Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР, Киев.

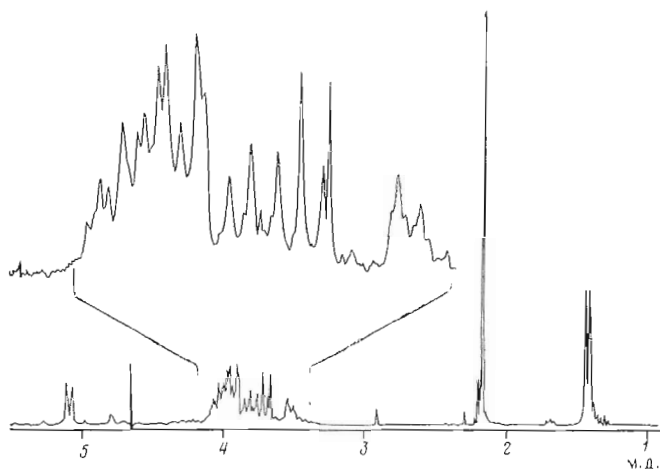


Рис. 1. ^1H -ЯМР-спектр полисахарида

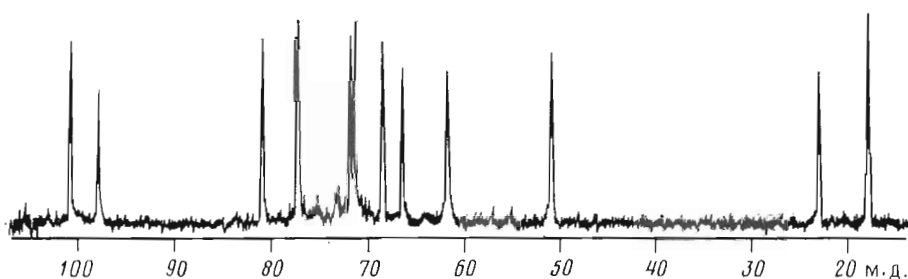


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида

3,52–4,78 м.д. ^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (рис. 2) также содержал сигналы метильной группы 6-дезоксахара при 18,0 м.д., ацетамидной группы при 23,0 м.д. (CH_3) и 176,0 м.д. (CO), двух аномерных углеродных атомов при 97,8 и 100,7 м.д., одного атома углерода, связанного с азотом, при 50,9 м.д., одной первично-спиртовой группы при 61,7 м.д. и семи вторичных углеродных атомов, связанных с кислородом, в области 66–81 м.д. Таким образом, полисахарид является регулярным и построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих гексозу и 6-дезоксигексозу, причем один из этих моносахаридов является *N*-ацетилпированным аминсахаром.

^1H -ЯМР-спектр полисахарида был полностью расшифрован с помощью селективного гомоядерного двойного резонанса (табл. 1). Большие константы спин-спинового взаимодействия ($J_{3,4}$ 9,5 и $J_{4,5}$ 9,5 Гц) и небольшие константы ($J_{2,3}$ 3,5–4 Гц) доказывали, что оба моносахаридных остатка находятся в пиранозной форме и имеют *манно*-конфигурацию [10]. Далее в ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида были отнесены все сигналы с использованием селективного гетероядерного $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ двойного резонанса (табл. 2). Положение сигнала С2 гексозы при 50,9 м.д. определяло положение ацетамидной группы. Таким образом, полисахарид построен из *N*-ацетилманнозамина и рамнозы. На основании констант спин-спинового взаимодействия, определенных из ^{13}C -ЯМР-спектра, снятого без подавления углерод-протонных взаимодействий, следовало, что гликозидная связь *N*-ацетилманнозамина имеет β -конфигурацию ($^1J_{\text{C}_1,\text{H}}$ 163,6 Гц для сигнала С1 при 100,7 м.д.), а рамнозидная связь — α -конфигурацию ($^1J_{\text{C}_1,\text{H}}$ 170,9 Гц для сигнала С1 при 97,8 м.д.) [11]. Слабопольное положение сигналов С4 рамнозы при 80,9 м.д. и С3 *N*-ацетилманнозамина при 77,2 м.д. по сравнению с их положением при 73,3 и 73,2 м.д. в спектрах соответствующих незамещенных моносахаридов [12, 13] вызвано α -эффектами гликозилирования

Данные ¹H-ЯМР-спектра полисахарида

Остаток	Протон	δ, м. д.	Наблю-даемая мультиплетность	КССВ, Гц	Остаток	Протон	δ, м. д.	Наблю-даемая мультиплетность	КССВ, Гц
ManNAc	H1	5,10	уш. с		Rha	H1	5,06	уш. с	
	H2	4,78	д	$J_{2,3} \sim 4$		H2	3,88	дд	$J_{1,2} 1,7$
	H3	3,93	дд	$J_{3,4} 9,5$		H3	3,97	дд	$J_{2,3} 3,5$
	H4	3,71	т	$J_{4,5} 9,5$		H4	3,79	т	$J_{3,4} 9,5$
	H5	3,52	дт	$J_{5,6} \sim 3$		H5	4,05	дк	$J_{4,5} 9,5$
	H6	3,92	дд	$J_{6,6'} \sim 13$		H6	1,41 (3H)	д	$J_{5,6} 6,2$
	H6'	3,94	дд	$J_{5,6'} \sim 3$					

Таблица 2

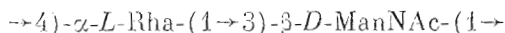
Химические сдвиги в ¹³C-ЯМР-спектрах (м. д.)

Соединение	Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Полисахарид	Rha	97,8	71,8	71,3	80,9	68,5	18,0
	ManNAc	100,7	50,9	77,2	66,4	77,3	61,7
Гликозид (1)	4-Дезоксэритрит	61,9	84,4	68,3	18,6		
	ManNAc	99,9	54,7	73,3	68,3	77,6	61,9
DManNAc (β) [13]		94,3	55,3	73,2	67,8	77,5	61,7

этих сахаров [14]. Следовательно, рамноза замещена в положение 4, а N-ацетилманнозамины — в положение 3.

Химический сдвиг 97,8 м. д. сигнала C1 рамнозы доказывал, что в α1→→3-связанном дисахаридном звене моносахариды с манно-конфигурацией имеют различные абсолютные конфигурации, так как при их одинаковой конфигурации C1 рамнозы резонировал бы при 103–104 м. д. [15]. С этим выводом согласуется также большая (по модулю) величина β-эффекта на C2 N-ацетилманнозамина (около -4 м. д.), вызванного его гликозилированием α-пиранозой в положение 3 [15]. Расчет оптического вращения полисахарида по правилу Кляйна [16] (табл. 3) позволил однозначно сделать выбор между двумя альтернативными комбинациями в пользу L-рамнозы и N-ацетил-D-маннозамина.

Таким образом, на основании бездеструктивного анализа физическими методами полисахарид имеет следующую структуру повторяющегося звена:



Эта структура была подтверждена результатами анализа полисахарида химическими методами.

Полисахарид был подвергнут полному кислотному гидролизу 2 M соляной кислотой, и в гидролизате с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов были идентифицированы рамноза (32%) и маннозамин (48%) соответственно. Кроме того, гидролизат дезаминировали азотистой кислотой, в результате маннозамин превратился в глюкозу [19]. Анализ полученных моносахаридов методом ГЖХ в виде полных ацетатов полиолов показал относительное содержание рамнозы и маннозамина 0,82:1. Таким образом, полисахарид содержит примерно равные количества этих двух моносахаридов.

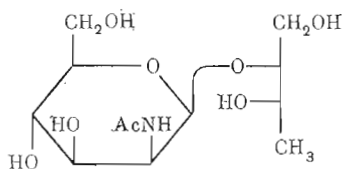
Для подтверждения абсолютной конфигурации оба моносахарида были выделены из гидролизата с помощью препаративной хроматографии на бумаге. Рамноза была превращена метанолизом в метилрамнозид, по величине оптического вращения которого ($[\alpha]_D - 29^\circ$) была установлена L-конфигурация этого моносахарида. Такая заниженная величина оптического вращения по сравнению с литературными данными для метил-α-L-рамнозипиранозидов ($[\alpha]_D - 67,2^\circ$ (вода) [17]) объясняется, очевидно, образова-

Расчет оптического вращения полисахарида по правилу Кляйна

Соединение	$[\alpha]_D$ (вода), град	M_r	$[M]_D$, град
<i>LRha</i> α-OMe [17]	-67,2	178	-119,6
<i>DManNAc</i> β-OMe [18]	-68,6	235	-159,8
Полисахарид рассчитано для			
<i>LRha</i>	-74,1	377	-279,4
<i>DManNAc</i>			
<i>DRha</i>	+74,1	377	+279,4
<i>LManNAc</i>			
экспериментальное	-73,6		

ем при метанолизе наряду с ожидаемым α-пиранозидом некоторого количества других аномерных форм. Действительно, в этих же условиях метанолиза заведомый образец *L*-рамнозы превращается в метилрамнозид, имеющий оптическое вращение $[\alpha]_D -32^\circ$. Образец гидрохлорида маннозамина, выделенный из гидролизата полисахарида, имел близкую к нулю величину оптического вращения (литературные данные для гидрохлорида *D*-маннозамина: $[\alpha]_D -5^\circ$ (вода) [20]). В связи с этим для определения абсолютной конфигурации этого моносахарида он был превращен в глюкозу путем дезаминирования гидролизата, и по результатам ее окисления *D*-глюкозооксидазой был сделан вывод о *D*-конфигурации маннозамина.

Типы замещения моносахаридов были определены методом метилирования в условиях Хакомори [24]. Часть метилированного полисахарида гидролизовали, полученные частично метилированные сахара анализировали в виде ацетатов полиолов методом ГИХ-масс-спектрометрии и в результате с использованием данных работы [22] идентифицировали 2,3-ди-*O*-метилрамнозу. Другую часть метилированного полисахарида подвергали метанолизу, ацетилированию и идентифицировали метил-2-(*N*-метил)ацетамидо-2-дезоксид-3-*O*-ацетил-4,6-ди-*O*-метилманнопиранозид, масс-спектр которого был практически идентичен спектру соответствующего производного глюкозамина [23]. Таким образом, рамноза замещена в положении 4, а *N*-ацетилманнозамин — в положение 3. Из этих же данных следовало, что *N*-ацетилманнозамин находится в пиранозидной форме.



Далее полисахарид был подвергнут распаду по Смиту, включающему периодатное окисление, восстановление боргидридом натрия и последующий мягкий кислотный гидролиз 1% уксусной кислотой. В результате, как и ожидалось в соответствии с типами замещения моносахаридов, был получен гликозид (I), выделенный гель-фильтрацией на смоле Fractogel TSK HW 40. Присутствие в его составе *N*-ацетилманнозамина и 4-дезоксид-эритрита следовало из данных ^{13}C -ЯМР-спектра (табл. 2), который был расшифрован при сравнении со спектром 2-ацетамидо-2-дезоксид-β-*D*-маннопиранозы [13]. Сравнение оптического вращения гликозида (I), $[\alpha]_D -52^\circ$, с данными для метил-2-ацетамидо-2-дезоксид-α- и β-*D*-маннопиранозидов, $[\alpha]_D +50$ и -68° (вода) соответственно [18], показало, что гликозидная связь *N*-ацетил-*D*-маннозамина в гликозиде (I), а следовательно, и в полисахариде имеет β-конфигурацию.

Таким образом, результаты химического анализа согласуются со структурой полисахарида, установленной бездеструктивным путем. О-Специфический полисахарид серотипа X (Мейтерт) является вторым обнаруженным у *P. aeruginosa* полисахаридом с дисахаридным повторяющимся звеном; ранее О-специфический полисахарид, построенный из чередующихся остатков β -D-рибофуранозы и 2-ацетиамидо-2-дезоксид- α -D-галактопиранозы, был найден у *P. aeruginosa* O12 (Лани) [8].

Экспериментальная часть

Восходящая хроматография выполнена на бумаге FN-11 в системе *n*-бутанол – пиридин – вода (6 : 4 : 3) при обнаружении сахаров щелочным нитратом серебра. Гель-фильтрация проведена на колонке (55×3,7 см) с сефадексом G-50 в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (А), и на колонке (80×1,5 см) Fractogel TSK HW 40 в воде (Б); элюционные кривые построены с использованием анализатора углеводов Technicon (США). Ионнообменная хроматография моносахаридов на анализаторе углеводов Technicon и аминокислотном анализаторе BC-200 (ФРГ) выполнена как описано ранее [23]. ГЖХ проведена на приборе Pye Unicam 104, модель 64 (Англия), на колонке (150×0,4 см) с 3% OV-1 на диатомите CQ (100–200 меш), газ-носитель – азот, скорость 30 мл/мин. ГЖХ-масс-спектрометрия выполнена на приборе Varian MAT Spom 111 (США) с использованием той же фазы.

ЯМР-спектры сняты на приборе AM-300 (Bruker, ФРГ) в D₂O при 60° С с использованием в качестве внутреннего стандарта ацетона (δ_{H} 2,23) или метанола (δ_{C} 50,15). Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin – Elmer, модель 141, в воде при 20° С. Растворы упаривали в вакууме при 40° С или лиофилизовали. Содержание белка определяли по методу [24].

Выделение липополисахарида и О-специфического полисахарида. Бактериальная культура *P. aeruginosa* X была любезно предоставлена д-ром Мейтертом (Институт им. Кантакузино, Бухарест). Выраживание клеток проводили как описано ранее [25]. Высушенные ацетоном клетки (30 г) экстрагировали 45% водным фенолом [9], экстракт без разделения водного и фенольного слоев диализовали против проточной воды, клетки отделяли центрифугированием, нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном, липополисахарид осаждали этанолом из водного раствора [9] и диализовали против дистиллированной воды. Выход препарата липополисахарида составил 4,2% от веса сухих клеток.

Липополисахарид (1 г) нагревали с 1% CH₃COOH (120 мл, 100° С, 1,5 ч), осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант концентрировали до объема ~10 мл, гель-фильтрацией на колонке А выделили О-специфический полисахарид (280 мг), $[\alpha]_{\text{D}} -73,6^{\circ}$ (с 1).

Моносахаридный состав. Полисахарид (3 мг) гидролизовали 2 М HCl (1 мл, 100° С, 4 ч), гидролизат упаривали. Нейтральные сахара и аминокислоты определяли в гидролизате с помощью анализатора углеводов и аминокислот соответственно. Часть гидролизата дезаминировали и анализировали ГЖХ как описано в работе [19].

Полисахарид (30 мг) гидролизовали 2 М HCl (5 мл, 100° С, 4 ч), гидролизат упаривали, остаток многократно упаривали с водой, препаративной хроматографией на бумаге выделили D-маннозамин (7 мг), который упариванием с 0,1 М HCl и затем с водой превратили в хлоридат, $[\alpha]_{\text{D}} \sim 0^{\circ}$ (с 0,4), ср. [20] -5° (вода), и L-рамнозу (3 мг), которую нагреванием с 1% раствором HCl в метаноле (1 мл, 2 ч) превратили в метил-L-рамнозид, $[\alpha]_{\text{D}} -29^{\circ}$ (с 0,17), ср. [17] $-67,2^{\circ}$ (вода).

Метилирование полисахарида проводили метилиодидом в присутствии метилсульфилметана по методу [21] и очищали диализом против дистиллированной воды. Расщепление метилированного полисахарида последовательным формолизом и гидролизом или метанолизом с последующим анализом частично метилированных сахаров проводили как описано в работе [19].

Распад по Смитту. О-Специфический полисахарид (100 мг) окисляли 0,2 М NaIO₄ (3 мл, 20° С, 20 ч в темноте), обработали NaBH₄ (100 мг, 2 ч), нейтрализовали концентрированной CH₃COOH и деионизировали гель-фильтрацией на колонке Б. Полученный окисленный полисахарид гидролизовали 1% CH₃COOH (1,5 мл, 100° С, 1,5 ч), гель-фильтрацией на колонке Б выделили 67 мг гликозида (I), $[\alpha]_{\text{D}} -52^{\circ}$ С (с 1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Виноградов Е. В., Парамонов Н. А., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 9, с. 1263–1267.
2. Lányi B. Acta microbiol. Acad. sci. hung., 1966/1967, v. 13, p. 295–318.
3. Habs I. Z. Hyg. Infectiouskr., 1967, B. 144, S. 218–228.
4. Sandvik O. Acta path. microbiol. scand., 1960, v. 48, p. 56–60.
5. Verder E., Evans J. J. Infect. Dis., 1961, v. 109, p. 183–193.
6. Meitert T. Arch. roum. path. exp. microbiol., 1964, v. 23, p. 679–688.
7. Lányi B., Bergan T. Meth. Microbiol., 1978, v. 10, p. 93–168.
8. Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев В. А., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. Биорган. химия, 1985, т. 11, № 9, с. 1265–1269.
9. Вестфаль О., Яни К. В кн.: Методы химии углеводов / Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967, с. 325–332.

10. *Allona C., Hasnoot C. A. G. Org. Magn. Reson.*, 1980, v. 13, N 6, p. 417-429.
11. *Bock K., Pedersen C. J. Chem. Soc. Perkin Trans 11*, 1974, p. 293-297.
12. *Gorin P. A. J., Mazurek M. Can. J. Chem.*, 1975, v. 53, № 8, p. 1212-1223.
13. *Bundle D. R., Jennings H. J., Smith I. C. P. Can. J. Chem.*, 1973, v. 51, № 22, p. 3812 - 3819.
14. *Шашков А. С., Чижев О. С. Биоорган. химия*, 1976, т. 2, № 4, с. 437-496.
15. *Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. Carbohydr. Res.*, 1984, v. 133, № 2, p. 173-185.
16. *Klyne W. Biochem. J.*, 1950, v. 46, № 4, xli-xlii.
17. *Fischer E., Bergmann M., Rabe A. Ber.*, 1920, B. 53, S. 2362-2388.
18. *Beuchok S., Ashwell G. Carbohydr. Res.*, 1971, v. 17, № 1, p. 19-24.
19. *Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Шеремет О. К., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. Биоорган. химия*, 1977, т. 3, № 9, с. 1219-1225.
20. *Micheel F. Chemie der Zucker und Polysaccharide. Leipzig: Akad. Verlagsgesellschaft.* 1956, S. 467.
21. *Конрад Г. Е. В кн.: Методы исследования углеводов./Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир*, 1975, с. 276-278.
22. *Bjorndal H., Lindberg B., Svensson S. Carbohydr. Res.*, 1967, v. 5, № 4, p. 433-440.
23. *Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 66, № 3, p. 559-566.
24. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Forr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265-275.
25. *Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kocharova N. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 106, № 3, p. 643-651.

Поступила в редакцию
23.I.1986

**ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 17. STRUCTURE
OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA X (MEITERT) LIPOPOLYSACCHARIDE**

KNIREL YU. A., KOCHAROVA N. A., SHASHKOV A. S., VARBANETS I. D.,
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 composed of *L*-rhamnose and 2-acetamido-2-deoxy-*D*-mannose was obtained on mild acid degradation of *P. aeruginosa* X (Meitert classification) lipopolysaccharide. On the basis of non-destructive analysis using ¹H, ¹³C NMR spectroscopy and Klyne's rule calculation, as well as chemical methods (acid hydrolysis, methylation, Smith degradation), it was established that the polysaccharide is built up of disaccharide repeating units of the following structure: →4)-α-*L*-Rha-(1→3)-β-*D*-ManNAc-(1→