БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
том 14 * № 2 * 1988

УДК 577.114.5.088.53:579.841.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ
28*. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ПАТОВАР *ATROFACIENS* К-1025, И *PSEUDOMONAS HOLCI* 90а (СЕРОГРУППА II)

Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М.*, Яковлева Л. М.*, Шашков А. С., Соляник Л. П.*, 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*

Липополисахариды серологически родственных штаммов *Pseudomonas syringae*, патовар *atrofaciens* К-1025, и *Pseudomonas holci* 90а имеют идентичную О-специфическую полисахаридную цепь, представляющую собой гомополимер *D*-рамнозы. На основании данных метилирования, частичного и полного распада по Смиту и анализа методами ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР-спектроскопии найдено, что повторяющееся звено полисахарида представляет собой разветвленный пентасахарид, имеющий следующую структуру:

→3)-α-*D*-Rha-(1→3)-α-*D*-Rha-(1→2)-α-*D*-Rha-(1→2)-α-*D*-Rha-(1→
↑3
1
α-*D*-Rha

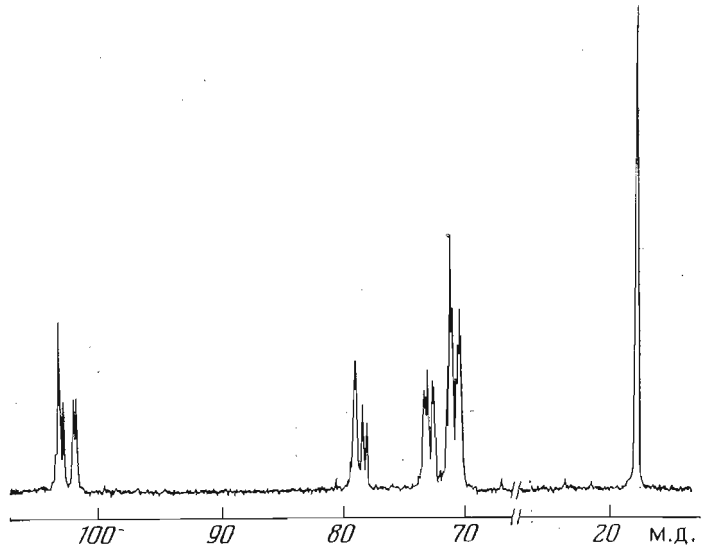
Штаммы ряда патоваров в составе вида *Pseudomonas syringae* и некоторых близкородственных видов серологически неоднородны. Так, штаммы *P. syringae*, патовар *atrofaciens*, согласно классификационной схеме [2], распределяются в серогруппах II, IV–VI, а штаммы *P. holci* – в серогруппах I, II, IV и VI. Проводимое нами систематическое химическое и иммунохимическое изучение липополисахаридов фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* ставит своей целью определение молекулярных основ серогруппирования, а также степени корреляции между свойствами липополисахаридов и специализацией к растению-хозяину. Ранее нами была установлена структура О-специфической полисахаридной цепи липополисахаридов штаммов *P. syringae*, патовар *atrofaciens*, и *P. holci*, относящихся к серогруппам IV [3] и VI [1]. Настоящая работа посвящена исследованию О-специфических полисахаридов штаммов этих бактерий, входящих в серогруппу II.

Липополисахариды были выделены экстракцией раствором хлористого натрия [4] сухих бактериальных клеток *P. syringae*, патовар *atrofaciens* К-1025, и *P. holci* 90а. Они были близки по своим серологическим свойствам и характеризовались высокой О-специфической активностью в реакциях кольцепреципитации (титр 1 : 1 000 000), пассивной гемагглютинации (титры 1 : 5120–1 : 10 240) и давали по одной линии преципитации в тесте Оухтерлони и по две линии в иммуноэлектрофорезе.

При расщеплении липополисахаридов разбавленной уксусной кислотой были получены О-специфические полисахариды, выделенные гельфильтрацией на сефадексе G-50. Они обладали серологической активностью, которая была, однако, заметно ниже, чем у исходных липополисахаридов, о чем свидетельствовали данные торможения реакции пассивной гемагглютинации в гомологичных тест-системах (минимальные ингибирующие дозы липополисахаридов и полисахаридов 0,25 и 64 мкг соответственно).

При кислотном гидролизе обоих полисахаридов образовалась только

* Сообщение 27 см. [1].



^{13}С-ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. holci* 90а

рамноза, которая была идентифицирована методами хроматографии на бумаге и ГЖХ в виде ацетата полиола. ^{13}С-ЯМР-спектры полисахаридов были идентичны друг другу (на рисунке приведен один из них). В них присутствовали сигналы метильных групп пяти остатков 6-дезоксисахара (рамнозы) при 17,9—18,0 м.д., пяти аномерных атомов углерода в области 101,8—103,1 м.д. и 20 сигналов остальных углеродных атомов в области 70—80 м.д. ^{1}Н-ЯМР-спектры этих полимеров также были идентичными и содержали сигналы пяти метильных групп рамнозы при 1,2—1,4 м.д., пяти аномерных протонов в области 5,0—5,3 м.д. и остальных протонов в области 3,5—4,2 м.д. Кроме того, полисахариды имели близкие величины удельного оптического вращения $[\alpha]_D$ +81—86° (*c* 0,5). Следовательно, они построены из одинаковых по структуре пентасахаридных звеньев, содержащих только остатки рамнозы. Дальнейшее структурное исследование было выполнено на полисахариде *P. holci* 90а.

Константы спин-спинового взаимодействия $^1J_{C,H}$ для аномерных углеродных атомов, определенные из снятого без подавления С,Н-взаимодействий ^{13}С-ЯМР-спектра полисахарида, имели относительно большие величины (170—174 Гц), что указывало на α-конфигурацию всех рамнозидных связей [5].

Анализ полисахарида методом метилирования привел к идентификации 2,3,4-три-О-метилрамнозы, 3,4-ди-О-метилрамнозы, 2,4-ди-О-метилрамнозы и 4-О-метилрамнозы в соотношении ~1 : 1 : 2 : 1. Таким образом, полисахарид является разветвленным, в узле разветвления находится остаток рамнозы, замещенный в положения 2 и 3, два остатка рамнозы замещены в положение 3, один остаток замещен в положение 2 и один является терминальным сахаром боковой цепи. Из этих данных следовало также, что все моносахаридные остатки находятся в пиранозной форме.

С целью получения необходимого для дальнейшего исследования строения олигосахаридного фрагмента полисахарид был подвергнут распаду по Смиту, который привел к олигосахариду (I), выделенному гель-хроматографией на геле TSK HW 40. В ^{13}С-ЯМР-спектре этого олигомера присутствовали сигналы метильных групп трех остатков рамнозы при 17,9 м.д., трех аномерных углеродных атомов при 99,5; 103,2 и 103,4 м.д., двух гидроксиметильных групп при 61,9 и 62,7 м.д. (их положение совпадает с положением сигналов С1 и С3 замещенного в положение 2 остатка глицерина в ^{13}С-ЯМР-спектре олигосахарида, полученного при распаде по Смиту полисахарида *P. cepacia* 3181 [6]) и 13 углеродных атомов в области 70—80 м.д. (табл. 1). Таким образом, как и следовало ожидать в соответствии с результатами метилирования, в олигосахарид (I) входят

Таблица 1

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

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
			Олигосахарид (I)			
Rhaα1- (A)	103,4	71,5	71,6	73,4	70,3	17,9
-3Rhaα1- (B)	103,2	71,4	79,8	72,6	70,3	17,9
-2Rhaα1- (C)	99,5	79,1	71,2	73,7	70,6	17,9
-2Gro (D)	61,9	79,8	62,7			
			Полисахарид (II)			
-3Rhaα1- (A)	103,1	71,2	79,1	72,7	70,4	17,9
-3Rhaα1- (B)	102,8	71,4	79,1	72,8	70,5	17,9
-2,3Rhaα1- (C)	102,0	78,6	78,2	73,3	70,8	17,9
-2Rhaα1- (D)	101,8	78,9	71,4	73,7	70,7	17,9
Rhaα1- (E)	103,1	71,4	71,7	73,4	70,4	18,0

* Отнесение сигналов, разница между химическими сдвигами которых не превышает 0,5 м. д., может быть обратным.

три остатка рамнозы и остаток глицерина, замещенный в положение 2, который образовался при окислении замещенного в положение 2 остатка рамнозы.

Структура олигомера (I) была установлена методом ^{1}H-ЯМР-спектроскопии с использованием ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [7]. Спектр олигосахарида был расшифрован с использованием селективного двойного гомоядерного резонанса (табл. 2). Предоблучение H1 остатка рамнозы при 5,07 м.д. (звена А) привело к заметному увеличению (~11%) сигнала H3 соседнего остатка рамнозы (звена В) при 3,86 м.д. Далее, предоблучение H1 звена В при 4,97 м.д. вызывало ЯЭО (~10%) на H2 звена С при 4,03 м.д. И наконец, предоблучение H1 звена С при 5,13 м.д. привело к ЯЭО (~12%) на H2 остатка глицерина, резонирующем при 3,81 м.д. Из этих данных однозначно следует, что олигосахарид (I) имеет следующую структуру:

$$\underset{A}{\alpha\text{-}D\text{-Rha}}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\underset{B}{\alpha\text{-}D\text{-Rha}}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\underset{C}{\alpha\text{-}D\text{-Rha}}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\underset{D}{\text{Gro}} \qquad (I)$$

Из факта образования при распаде по Смиту олигосахарида (I) следует, что замещенный в положение 2 остаток рамнозы находится в основной цепи полисахарида. Этому выводу и строению олигомера (I) удовлетворяют две альтернативные структуры полисахарида:

$$\underset{A}{\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-Rha}}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\underset{B}{\alpha\text{-}D\text{-Rha}}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\underset{\substack{\uparrow 3\\ \uparrow 1\\ C}}{\alpha\text{-}D\text{-Rha}}\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\underset{D}{\alpha\text{-}D\text{-Rha}}\text{-}(1\rightarrow \qquad (II)$$

$$\underset{E}{\alpha\text{-}D\text{-Rha}}$$

$$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-Rha}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-Rha}\text{-}(1\rightarrow$$
$$\uparrow 2$$
$$\alpha\text{-}D\text{-Rha}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-Rha}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-Rha} \qquad (III)$$

Для выбора между этими структурами полисахарид был подвергнут частичному распаду по Смиту с использованием недостатка периодата натрия (~1 эквивалент на повторяющееся звено). После мягкого кислотного гидролиза окисленного периодатом натрия и затем восстановленного боргидридом натрия полисахарида полимерная фракция была отделена гель-хроматографией на геле TSK HW 40. Ее анализ методом метилирования привел к идентификации 2,3,4-три-О-метилрамнозы, 3,4-ди-О-метилрамнозы, 2,4-ди-О-метилрамнозы и 4-О-метилрамнозы в соотношении ~1 : 3 : 4 : 1. Заметное уменьшение относительного содержания метилированных производных рамнозы, соответствующих терминальному и лежа-

Таблица 2

Данные ^{1}H-ЯМР-спектра олигосахарида (I)

Звено	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Наблюдаемая мультиплетность *	КССВ, Гц
Rhaα1- (A)	H1	5,07	д	$J_{1,2}$ 1,7
	H2	4,09	дд	$J_{2,3}$ 3,2
	H3	3,86	дд	$J_{3,4}$ 9,6
	H4	3,52	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H6 (3H)	1,30 **	д	$J_{5,6}$ 6
-3Rhaα1- (B)	H1	4,97	д	$J_{1,2}$ 1,7
	H2	4,18	дд	$J_{2,3}$ 3,2
	H3	3,86	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,48	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H6 (3H)	1,31 **	д	$J_{5,6}$ 6
-2Rhaα1- (C)	H1	5,13	д	$J_{1,2}$ 1,7
	H2	4,03	дд	$J_{2,3}$ 3,4
	H3	3,94	дд	$J_{3,4}$ 9,7
	H4	3,52	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H6 (3H)	1,32 **	д	$J_{5,6}$ 6
-2Gro (D)	H2	3.81	м	

* д — дублет, т — триплет, м — мультиплет.
** Отнесение может быть обратным.

щему в узле связи остаткам, и увеличение содержания производного, соответствующего остатку рамнозы, замещенному в положение 2, показывают, что при отщеплении окислившегося терминального моносахарида образуются участки с линейной структурой. Таким образом, полисахарид имеет структуру (II).

Для определения абсолютной конфигурации рамнозы был проведен расчет оптического вращения олигосахарида (I) и полисахарида (II) по правилу Кляйна [8]. Рассчитанные величины, приведенные в табл. 3, близки экспериментальным данным только при *D*-конфигурации всех остатков рамнозы. Этот вывод согласуется с величинами эффектов гликозилирования на атомы С1 в ^{13}С-ЯМР-спектре полисахарида, которые составляют не менее 7 м.д. Следовательно, все α1,2- и α1,3-связанные рамнопиранозные остатки имеют одинаковые абсолютные конфигурации [9].

Таким образом, О-специфический полисахарид *P. holci* 90а, а значит, и полисахарид *P. syringae*, патовар *atrofaciens* К-1025, имеет структуру (II). Эта структура была подтверждена результатами расшифровки ^{13}С-ЯМР-спектров этого полисахарида и олигосахарида (I) (табл. 1), которая была проведена при сравнении с данными спектров олигосахарида α-*D*-Rha-(1→3)-α-*D*-Rha-(1→2)-Gro, полученного из полисахарида *P. cepacia* 3181 [6], и линейного рамнана, полученного из полисахарида *P. holci* 8299 и имеющего такую же структуру, что и основная цепь полисахарида (II) [1].

Отметим ряд признаков, сближающих О-антигены изученных в настоящей работе представителей серогруппы II с О-антигенами ранее исследованных фитопатогенных видов *Pseudomonas*. Это прежде всего присутствие *D*-рамнозы, редко встречающегося за пределами семейства псевдомонад моносахарида. Кроме того, основная цепь О-специфического полисахарида изученных в настоящей работе штаммов серогруппы II имеет такое же строение, что и основная цепь полисахаридов серогрупп IV [3] и VI [1]. Эти данные свидетельствуют о филогенетической близости фитопатогенных псевдомонад и целесообразности их объединения в составе одного таксона.

В то же время структура (II) заметно отличается от структуры полисахаридов ранее изученных представителей серогруппы II — *P. cerasi* 467 и *P. syringae*, патовар *syringae* 218 [11]. Эти отличия связаны как с основной цепью (она представлена *D*-рамнаном с тетрасахаридным, а не

Таблица 3

Расчет удельного оптического вращения полисахарида (II) и олигосахарида (I) по правилу Кляйна [8]

Соединение	$[\alpha]_D$, град	M_r	$[M]_D$, град
Rhaα1-OMe [10]	−67,2	178	−119,0
Полисахарид (II)			
рассчитано для			
5 *D*Rhaα	+81,9	730	+598,1
4 *D*Rhaα, 1 *L*Rhaα	+49,2	730	+358,8
экспериментальное значение	+85,8		
Олигосахарид (II)			
рассчитано для			
3 *D*Rhaα	+67,6	530	+358,8
2 *D*Rhaα, 1 *L*Rhaα	+22,6	530	+119,6
экспериментальное значение	+61,6		

с трисахаридным повторяющимся звеном), так и с боковыми заместителями (остатки α-*D*-рамнопиранозы вместо остатков α-*D*-фукофуранозы). В связи с этим можно предполагать, что серологическая взаимосвязь, послужившая основанием для объединения всех этих штаммов в серогруппу II, обусловлена сходным структурным участком основных цепей, построенных из остатков α-*D*-рамнопиранозы.

Авторы благодарят С. С. Мамяна (Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского) за съемку спектров ЯЭО.

Экспериментальная часть

^{1}H-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) в D_2O при 50° С. ЯЭО определялись как описано ранее [3]. ^{13}C-ЯМР-спектры сняты на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) при 60° С в D_2O с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола (δ_C 50,15 м.д.). Оптическое вращение определяли на поляриметре ЕПО-1 в воде при 20° С. Анализ методами ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрии и гель-хроматография проведены как описано ранее [3].

Выращивание бактериальных культур, выделение и очистка липополисахаридов, получение сывороток, серологические тесты проведены как описано в работе [4]. Расщепление липополисахаридов и выделение О-специфических полисахаридов осуществляли согласно [3].

Кислотный гидролиз полисахарида проводили 1 М трифторуксусной кислотой (100° С, 3 ч), гидролизат упаривали, рамнозу превращали в ацетат рамнита как обычно и анализировали ГЖХ. Метилирование выполняли по методу [12], идентификацию методом ГЖХ-масс-спектрометрии частично метилированных моносахаридов в виде ацетатов полиолов проводили по данным [13].

Распад по Смиту. а) Полисахарид (25 мг) окисляли 0,1 М метапериодатом натрия (2 мл, 20° С, 2 сут в темноте), добавляли натрийборгидрид (70 мг), через 2 ч избыток боргидрида разлагали концентрированной уксусной кислотой, деионизировали гель-фильтрацией на геле TSK HW 40, гидролизовали 1% уксусной кислотой (3 мл, 100° С, 2 ч), упаривали, остаток дважды упаривали с водой, восстанавливали натрийборгидридом (20 мг) в воде (1 мл, 20° С, 2 ч), гель-хроматографией на геле TSK HW 40 выделяли олигосахарид (I). Выход 10 мг, $[\alpha]_D$ +61,6° (*c* 0,25).

б) Полисахарид (10 мг) окисляли в 0,3 мл 0,05 М метапериодата натрия (20° С, 2 сут в темноте), обрабатывали как описано в «а», гидролизовали 0,1 М трифторуксусной кислотой (100° С, 15 мин), гель-хроматографией на геле TSK HW 40 выделяли частично окисленный полисахарид (4,5 мг).

ЛИТЕРАТУРА

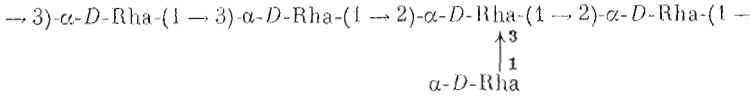
1. *Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Губанова Н. Я., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 92–99.
2. *Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д.* // Микробиол. журн. 1979. Т. 41. № 4. С. 330–339.
3. *Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашунин В. М., Яковлева Л. М., Шашков А. С., Захарова И. Я., Гвоздяк Р. И., Кочетков Н. К.* // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1253–1262.
4. *Здоровенко Г. М., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И., Захарова И. Я., Кошечкина Л. Н.* // Микробиол. журн. 1982. Т. 44. № 2. С. 65–70.

5. *Bock K., Pedersen C.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. II. 1974. № 3. P. 293–297.
6. *Книрель Ю. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Касянчук Н. В., Захарова И. Я.* // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1851–1859.
7. *Keller R. M., Wüthrich K.* // Biol. Magn. Reson. 1981. V. 3. P. 1–52.
8. *Klyne W.* // Biochem. J. 1950. V. 46. № 4. P. xli-xlii.
9. *Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S.* // Carbohydr. Res. 1984. V. 133. № 2. P. 173–185.
10. *Fisher E., Bergmann M., Rabe A.* // Ber. 1920. B. 53. № 11. S. 2362–2388.
11. *Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Мамян С. С., Яковлева Л. М., Соляник Л. П., Захарова И. Я.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 82–91.
12. *Конрад Г. Е.* // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1967. С. 325–327.
13. *Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren J.* // J. Chem. Communs Stockholm Univ. 1976. № 8. P. 1–75.

Поступила в редакцию
7.IV.1987

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 28. STRUCTURE OF O-SPECIFIC CHAIN OF LIPOPOLYSACCHARIDE OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* K-1025 AND *PSEUDOMONAS HOLCI* 90a (SEROGROUP II)

KNIREL Y. A., ZDOROVENKO G. M.*, YAKOVLEVA L. M.*, SHASHKOV A. S., SOLYANIK L. P.*, ZAKHAROVA I. Y.*

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*

Lipopolysaccharides of serologically related strains of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* K-1025 and *Pseudomonas holci* 90a possess the identical O-specific polysaccharide chains, representing a homopolymer of *D*-rhamnose. On the basis of methylation, partial and complete Smith degradation, and analysis by ^{1}H- and ^{13}C-NMR-spectroscopy, it was concluded that the repeating unit of the polysaccharide is a branched pentasaccharide of the following structure: