



УДК 577.114.5.088.53 : 543.422.25

ХАРАКТЕРИСТИКА РАМНАНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПРЕПАРАТОВ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*Кочирова Н. А., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К.,
Станиславский Е. С.*

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

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

Ранее [1, 2] при структурном изучении ЛПС *Pseudomonas aeruginosa* O7* мы обнаружили, что их расщепление в условиях мягкого кислотного гидролиза на углеводный и липидный компоненты сопровождается деполимеризацией O-специфических полисахаридных цепей вследствие присутствия в них производных 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-*L*-глицеро-*L*-манно-нонулозоновой (псевдааминовой) кислоты с кислотолabileй гликозидной связью. После этого расщепления остается полисахарид, не содержащий O-специфических компонентов (*D*-ксилозы, *N*-ацетил-*D*-фукозамына и ди-*N*-ацилпсевдааминовой кислоты). В настоящем сообщении приведены данные по анализу состава и строения этого полисахарида и его обнаружению у других представителей *P. aeruginosa*.

Полисахарид был выделен с выходом 1—3% гель-хроматографией на геле Sephadex G-50 деградированных ЛПС всех трех подгрупп серогруппы O7 (штаммы 170011, 170013 и 170046). После дополнительной очистки на геле TSK HW 55 он был разделен на две фракции (А и Б, соотношение ~5 : 1) с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе в воде. По данным гель-хроматографии на колонке с гелем Sephacryl S-300, калиброванной стандартными декстранами (элюент — 0,15 М NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, рН 6,65), обе фракции имели близкие молекулярные массы (~15 000). При анализе фракций А и Б на той же колонке в воде их кажущиеся молекулярные массы составляли ~190 000 и ~15 000 соответственно.

После гидролиза фракции А (2 М CF₃COOH, 120° С, 1 ч) были обнаружены рамноза, манноза, глюкоза и неидентифицированный сахар в соотношении ~83 : 8 : 3 : 6. При анализе с помощью углеводного анализатора неидентифицированный сахар совпадал по времени удерживания с рибозой, при анализе методом БХ (метилэтилкетон — СН₃COOH — насыщенная Н₃ВО₃, 9 : 1 : 1) он, однако, отличался от рибозы и имел R_{Rib} 1,7 (для Rib $R_{\text{Rib}} = 1,35$), а при анализе методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов соответствующий ему пик не был обнаружен. Аминосакхара и 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота в составе полисахарида обнаружены не были. Содержание фосфора (в пересчете на фосфорную кислоту) во фракции А составляло 0,63%.

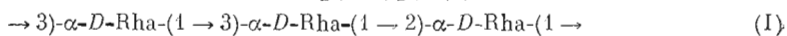
Фракция Б имела такой же моносахаридный состав, что и фракция А, но отличалась значительно меньшим содержанием фосфора (0,05%). С большим содержанием фосфатных групп связано, по-видимому, резкое возрастание кажущейся молекулярной массы фракции А при гель-хроматографии в отсутствие солей.

¹H-ЯМР-спектры фракций А и Б были идентичны. Они содержали сигналы метильных групп трех остатков рамнозы (δ_{H} 1,33 м. д., 3H, дублет; 1,36 м. д., 6H, суперпозиция двух дублетов), трех аномерных протонов (δ_{H} 5,02; 5,09 и 5,26 м. д., все уширенные синглеты), а также остальных протонов в области 3,5—4,3 м. д. Кроме того, в спектрах был различим

* Здесь и далее обозначения серогрупп даны по более поздней классификационной схеме [3]; в работе [1] для этой серогруппы использовалось применяемое ранее обозначение O5. ЛПС — липополисахарид.

ряд мипорных сигналов. В ^{13}C -ЯМР-спектре фракции А присутствовали сигналы метильных групп трех остатков рамнозы (δ_{C} 17,9 м. д., 2 С, 18,0 м. д., 1 С), трех аномерных углеродных атомов (δ_{C} 102,0 м. д., 1 С, 103,1 м. д., 2 С) и 12 углеродных атомов в области 70—80 м. д. Таким образом, исследуемый полисахарид представляет собой в основном рамнан, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев, и содержит также незначительное количество других структурных компонентов.

По данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров и удельного оптического вращения, $[\alpha]_{\text{D}} +82^\circ$ (вода), этот рамнан идентичен О-специфическому полисахариду *Pseudomonas syringae*, патовары *morsprunorum* и *cerasi*, для которого химическими методами [4] и методами ^1H -ЯМР-спектроскопии [5] была установлена структура (I). Следовательно, рамнан, выделенный из препаратов ЛПС *P.aeruginosa* O7, также имеет структуру (I):



Интересно, что рамноза в полисахариде (I) находится в форме относительно реже встречающегося в природе *D*-изомера, в то время как в О-специфических и внеклеточных полисахаридах *P.aeruginosa* до сих пор была обнаружена только *L*-рамноза.

С целью выявить присутствие рамнана (I) были исследованы препараты ЛПС восьми других серогрупп *P.aeruginosa* (O1—O3, O6, O9, O10, O12 и O13) с кислыми О-специфическими полисахаридными цепями. По данным ионообменной хроматографии на геле DEAE-Trisacryl M, все деградированные ЛПС содержали кроме О-специфического полисахарида нейтральную фракцию, которая была выделена препаративно из препаратов ЛПС серогрупп O1 и O9, где ее содержание было наибольшим. По данным ^1H -ЯМР-спектра, в случае серогруппы O1 нейтральный полисахарид представляет собой рамнан (I), а в случае серогруппы O9 — смесь рамнана (I) с другим неизвестным полисахаридом. Таким образом, рамнан (I) характерен не только для серогруппы O7, но и для других, хотя, возможно, и не для всех, серогрупп *P.aeruginosa*.

Полисахариды, основным компонентом которых является рамноза, были ранее обнаружены другими исследователями ЛПС *P.aeruginosa*. Так, рамнан был обнаружен после щелочной деполимеризации по остаткам *D*-галактозаминураонамида О-специфического полисахарида штамма PD1008 [6], серологически родственного серогруппе O6. Полисахарид, содержащий наряду с рамнозой меньшее количество арабинозы, получен из препарата ЛПС штамма NCIB 8626 [7] (серогруппа O2). Рамнан с незначительным содержанием рибозы, по-видимому ковалентно связанный с липидным компонентом, присутствует в ЛПС штамма FO3080 [8]. Иммунохимический анализ с использованием моноклональных антител, специфичных к этому рамнану, показал, что такие же полисахаридные цепи присутствуют в ЛПС почти всех (за исключением одной) исследованных в работе [8] серогрупп, и, таким образом, этот рамнан является общим полисахаридным антигеном *P.aeruginosa* [8].

Хотя строение этого антигена не было установлено, можно предполагать, что их основная, построенная из остатков рамнозы цепь имеет структуру (I). Для окончательного доказательства идентичности рамнана (I), изученного в настоящей работе, и общего полисахаридного антигена, выявленного в работе [8], необходим их сравнительный химический (или спектроскопический) и серологический анализ. Представляется важным также иммунохимическое и иммунологическое исследование рамнана (I) с целью выяснения его возможного значения для диагностики и защиты от вызываемых *P.aeruginosa* инфекций.

Когда настоящая работа была закончена, появилось сообщение [9], из которого следовало, что рамнан, выделенный из липополисахарида штамма OD1008, имеет такое же строение, что и рамнан (I).

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Кочарова Н. А., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Машилова Г. М. // Биооргани. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1384—1390.

2. Knirel Yu. A., Kocharova N. A., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 3. P. 639—652.
3. Lányi B., Bergan T. // Meth. Microbiol. 1978. V. 10. P. 93—168.
4. Smith A. R. W., Zamze S. E., Munro S. M., Carter K. J., Hignett R. C. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 141. № 1. P. 73—78.
5. Книрель Ю. А., Эдоровенко Г. М., Шашков А. С., Мамян С. С., Яковлева Л. М., Соляник Л. П., Захарова И. Я. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 82—91.
6. Yokota Sh., Kaya Sh., Kawamura T., Araki Y., Ito E. // J. Biochem. 1986. V. 99. P. 1551—1561.
7. Wilkinson S. G. // Rev. Infect. Dis. 1983. V. 5. Suppl. 5. S941—S949.
8. Sawada Sh., Kawamura T., Masuho Y., Tomibe K. // J. Infect. Dis. 1985. V. 152. № 6. P. 1290—1299.
9. Yokota Sh., Kaya Sh., Sawada Sh., Kawamura T., Araki Y., Ito E. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 167. № 2. P. 203—209.

Поступило в редакцию
27.XI.1987

CHARACTERIZATION OF A RHAMNAN DERIVED FROM PREPARATIONS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LIPOPOLYSACCHARIDES

KOCHAROVA N. A., KNIREL Yu. A., KOCHETKOV N. K.,
STANISLAVSKY E. S.*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR;*

** I. I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera,
Health Ministry of the USSR, Moscow*

A polysaccharide isolated from the degraded lipopolysaccharides of *P. aeruginosa* serogroup O7 (Lányi — Bergan classification) was characterized by liquid chromatography, acid hydrolysis, and ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. It has molecular mass 15 000 and represents mainly a rhamnan of the structure $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rha-(1}\rightarrow$, identical to the structure of O-specific polysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* pvs *morsprunorum* and *cerasi*. Some minor constituents, such as glucose, mannose, an unknown sugar, and phosphate, are found in the polysaccharide preparation as well. Distribution of the rhamnan in some other *P. aeruginosa* serogroups is discussed and its identity to the common polysaccharide antigen of *P. aeruginosa* is suggested.