



УДК 577.114.5.088:579.841.14

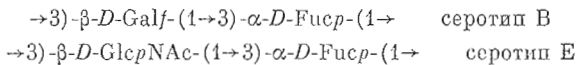
АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ 32*. СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ЦЕПЕЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *Pseudomonas seracia* СЕРОТИПОВ В И Е, СОДЕРЖАЩИХ D-ФУКОЗУ

Елизарь Ю. А., Шапков А. С., Солдаткина М. А.,
Парамонов Н. А., Захарова И. И.**

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

** Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
Академии наук УССР, Киев*

На основании данных кислотного гидролиза, метилирования, анализа методами ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии и расчета удельного оптического вращения установлены следующие структуры дисахаридных повторяющихся звеньев О-специфических полисахаридов *Pseudomonas seracia* серотипов В и Е:



Отличительной особенностью этих полисахаридов является присутствие относительно редко встречающегося в бактериальных антигенах моносахарида — D-фукозы.

В 80-е годы, после того как была показана роль *Pseudomonas seracia* как потенциально летального патогена для больных с ослабленной иммунной защитой, появился ряд работ [2—4], посвященных серотипированию штаммов этого вида, имеющих клиническое происхождение, на основе специфичности О-антигенов. Проводимое нами иммунохимическое исследование О-антигенов *P. seracia* ставит своей основной целью создание молекулярных основ серотипирования, а также выявление филогенетического родства этого вида с другими микроорганизмами [5]. Настоящая работа посвящена установлению структуры О-специфических полисахаридных цепей липополисахаридов *P. seracia* штаммов ИМВ 4208 (=GIFU 644=ATCC 17774) и ИМВ 4211 (=GIFU 2323), представляющих серотипы В и Е соответственно в схеме серотипирования [4].

Липополисахариды были выделены из бактериальных клеток экстракцией водным фенолом, нуклеиновые кислоты были отделены осаждением цетавлоном [6]. Липополисахариды обладали специфической активностью в серологических тестах с гомологичными О-антисыворотками (титры О-антител в реакции кольцепреципитации 1 : 500 000 и 1 : 1 000 000, в реакции пассивной гемагглютинации 1 : 256 и 1 : 1024 для липополисахаридов серотипов В и Е соответственно). О-Специфические полисахариды, полученные путем расщепления липополисахаридов разбавленной уксусной кислотой, были аналогичны исходным полимерам по серологической специфичности и активности.

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДА СЕРОТИПА В

Кислотный гидролиз полисахарида привел к фукозе и галактозе (примерно в равных количествах), которые были идентифицированы в виде полных ацетатов полиололов методом ГЖХ.

¹H- и ¹³C-ЯМР-спектры (рис. 1) полисахарида показывали, что он является регулярным и построен из дисахаридных повторяющихся звеньев (в спектрах присутствовали сигналы двух аномерных протонов при 5,00

* Сообщение 31 см. [1].

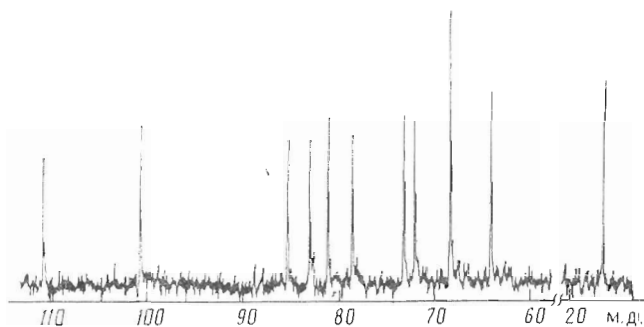


Рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. aeruginosa*, серотип В

и 5,22 м.д. и двух аномерных атомов углерода при 100,7 и 110,9 м.д.). Одним из моносахаридных компонентов является фукоза (имелся сигнал метильной группы, δ_{H} 1,22; δ_{C} 16,6 м.д.), а вторым — галактоза (присутствовал сигнал гидроксиметильной группы, δ_{C} 64,1 м.д.), что согласуется с данными кислотного гидролиза. Положение сигнала С6 остатка галактозы при 64,1 м.д. указывало на его фуранозную форму; химический сдвиг 110,9 м.д. сигнала С1 подтверждал этот вывод и показывал, что фуранозный остаток имеет β -конфигурацию [7]. Из положения сигналов С1 и С6 остатка фукозы следовало, что он находится в пиранозной форме.

^1H -ЯМР-спектр полисахарида был полностью расщипрован с помощью селективного гомоядерного двойного резонанса (табл. 1). Определенные из спектра константы взаимодействия $J_{1,2} < 1$, $J_{2,3} 3,0$, $J_{3,4} 6,0$ и $J_{4,5} 4,1$ Гц подтверждали фуранозную форму и β -конфигурацию остатка галактозы, а константы взаимодействия $J_{1,2} 3,5$, $J_{2,3} 9,5$, $J_{3,4} \sim 3$ и $J_{4,5} < 1$ Гц подтверждали пиранозную форму остатка фукозы и свидетельствовали о его α -конфигурации [8, 9].

Предоблучение Н1 остатка фукозы при 5,00 м.д. вызывало ядерный эффект Оверхаузера на протоне Н3 остатка галактозы, резонирующем при 4,05 м.д., что доказывало замещение этого остатка в положение 3 [10]. Предоблучение Н1 остатка галактозы при 5,22 м.д. вызывало ядерный эффект Оверхаузера на протоне Н3 и/или Н4 остатка фукозы, резонирующем вблизи 3,95 м.д., однако сделать выбор между этими протонами, что дало бы возможность определить тип замещения остатка фукозы, было затруднительным из-за близости положения их сигналов (при 3,94 и 3,95 м.д. соответственно).

Анализ полисахарида методом метилирования привел к идентификации 2,4-ди-О-метилфукозы и 2,5,6-три-О-метилгалактозы, что согласуется

Таблица 1

Данные ^1H -ЯМР-спектра полисахарида серотипа В

Звено	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Наблюдаемая мультиплетность*	Константа взаимодействия, Гц
-3Fuc α	H1	5,00	д	$J_{1,2} 3,5$
	H2	3,89	дд	$J_{2,3} 9,5$
	H3	3,94	дд	$J_{3,4} \sim 3$
	H4	3,95	д	$J_{4,5} < 1$
	H5	4,25	к	$J_{5,6} 6,5$
	H6 (3H)	1,22	д	
-3Gal β	H1	5,22	ш	$J_{1,2} < 1$
	H2	4,34	дд	$J_{2,3} 3,0$
	H3	4,05	дд	$J_{3,4} 6,0$
	H4	4,25	дд	$J_{4,5} 4,1$
	H5	3,86	дт	$J_{5,6} 4,5$
	H6, H6'	3,65-3,72	м	$J_{5,6'} 6,5$

* ш — уширенный синглет, д — дублет, т — триплет, к — квартет, м — мультиплет.

Расчет удельного оптического вращения полисахарида серотипа В

Соединение	$[\alpha]_D$, град	M_T	$[\alpha]_D$, град
L-Fuc(α)-ОМе [12]	-197	178	-351
D-Gal(β)-ОМе [13]	-110	194	-213,4
Полисахарид			
рассчитано для			
D-Fuc, D-Gal	+44,7	308	+137,6
L-Fuc, L-Gal	-44,7	308	-137,6
L-Fuc, D-Gal	-183,2	308	-564,4
D-Fuc, L-Gal	+183,2	308	+564,4
экспериментальная величина	+41		

Таблица 3

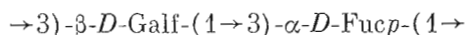
Химические сдвиги в ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида серотипа В (м. д.)

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
-3) Fuc α	100,7	68,4	78,6	73,3	68,4	16,6
-3) Gal β	110,9	81,2	85,3	83,1	72,1	64,1

с данными по ядерным эффектам Оверхаузера и доказывает замещение обоих моносахаридных остатков в положение 3.

Абсолютные конфигурации моносахаридов были определены путем расчета удельного оптического вращения полисахарида по правилу Кляйна [11]. Как видно из табл. 2, расчет приводил к величине, близкой к экспериментальному значению, только в предположении о D-конфигурации галактозы и фукозы.

Таким образом, согласно полученным данным, O-специфический полисахарид *P. serasia*, серотип В, имеет структуру



Эта структура подтверждалась результатами расшифровки ^{13}C -ЯМР-спектра полисахарида (табл. 3), которая была проведена с использованием селективного гетероядерного двойного резонанса $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ и данных по химическим сдвигам для фукопиранозы [7] (табл. 3).

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДА СЕРОТИПА В

При кислотном гидролизе полисахарида образовались фукоза и глюкозамин, которые были идентифицированы после дезаминирования гидролизата в виде полных ацетатов полиолов методом ГЖХ (глюкозамин при дезаминировании превращается в 2,5-ангидроманнозу [14]); соотношение между компонентами было $\sim 1 : 1$.

^{13}C -ЯМР-спектр полисахарида (рис. 2) содержал сигналы двух аномерных углеродных атомов при 101,4 и 103,8 м.д., метильной группы фукозы при 16,7 м.д., гидроксиметильной группы глюкозамина при 61,5 м.д., атома C2 этого моносахарида при 55,7 м.д., семи остальных углеродных атомов моносахаридных остатков в области 67,9–81,4 м.д., а также N-ацетильной группы (CH_3 при 23,6 м.д., CO при 176,1 м.д.). Из этих данных следовало, что полисахарид является регулярным и построен из дисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих по одному остатку фукозы и N-ацетилглюкозамина.

Для установления строения полисахарида был применен анализ методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, основанный на расчете с помощью ЭВМ спектров всех теоретически возможных линейных структур полисахарида данного моносахаридного состава, исходя из химических сдвигов свободных моносахаридов и эффектов гликозилирования, и выборе структуры (или структур), для которой расчетный спектр наиболее близок экспери-

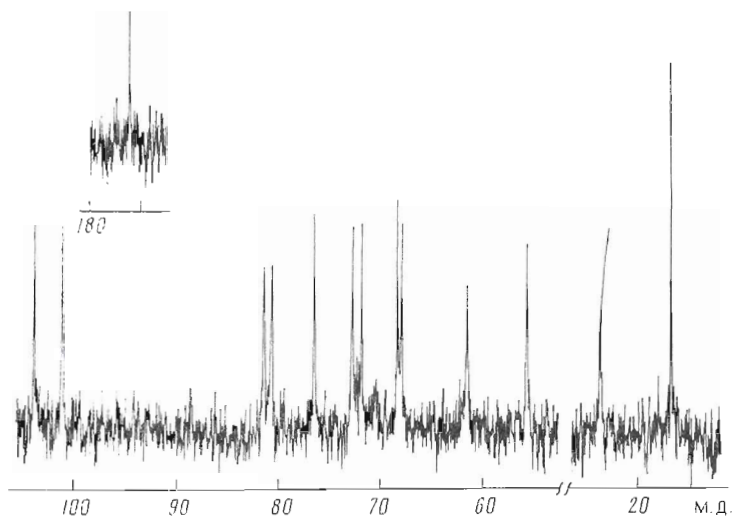
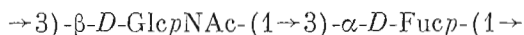


Рис. 2. ^{13}C -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *P. serasia*, серотип Е

ментальному ^{13}C -ЯМР-спектру [15, 16]. При расчете использовались химические сдвиги фукозы и N-ацетилглюкозамина, приведенные в работах [7] и [16] соответственно, и эффекты гликозилирования, характерные для галактозы (при расчете спектра остатка фукозы) и для глюкозы (при расчете спектра остатка N-ацетилглюкозамина) [16].

В результате расчета была выявлена единственная линейная структура, приведенная ниже, для которой сумма квадратов отклонений химических сдвигов расчетного и экспериментального спектров была относительно небольшой (1,6 в расчете на один моносахаридный остаток; для всех альтернативных структур эта величина была не менее 3). При расчете учитывалась возможность как *D*-, так и *L*-конфигурации фукозы, а для N-ацетилглюкозамина принималась обычная для этого моносахарида в природных углеводах *D*-конфигурация. Таким образом, расчет показал также, что фукоза имеет *D*-конфигурацию. Рассчитанные для выявленной оптимальной структуры



химические сдвиги, а также сделанное на основании расчета отнесение сигналов в экспериментальном ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида приведены в табл. 4.

Следует отметить, что величина отклонения 1,6, характеризующая степень схожести рассчитанного и экспериментального ^{13}C -ЯМР-спектров, для исследуемого полисахарида несколько больше, чем отклонения для проанализированных ранее этим методом полисахаридов, которые обычно не превышали 1,0 [16]. Сравнение рассчитанных и экспериментальных химических сдвигов показывает, что основной вклад в величину отклонения вносит разница, наблюдающаяся для сигналов C3 и C4 остатка N-ацетил-

Таблица 4

Химические сдвиги в ^{13}C -ЯМР-спектре полисахарида серотипа Е (м. д.) *

Звено	C1	C2	C3	C4	C5	C6
-3Fucp α	101,1	68,3	80,7	72,8	67,9	16,7
	99,9	68,5	80,6	72,7	67,8	16,5
-3GlcNAc β	103,8	55,7	81,4	71,9	76,5	61,5
	104,0	55,8	81,9	71,1	77,2	62,1

* Во второй строке для каждого остатка приведены рассчитанные химические сдвиги.

Расчет удельного оптического вращения полисахарида серотипа E

Соединение	$[\alpha]_D$, град	M_r	$[M]_D$, град
<i>L</i> -Fuc (α)-ОМе [12]	-197	178	-351
<i>D</i> -GlcNAc (β)-ОМе [17]	-43	235	-101
Полисахарид			
рассчитано для			
<i>D</i> -Fuc, <i>D</i> -GlcNAc	+72	349	+250
<i>L</i> -Fuc, <i>L</i> -GlcNAc	-72	349	-250
<i>D</i> -Fuc, <i>L</i> -GlcNAc	+130	349	+452
<i>L</i> -Fuc, <i>D</i> -GlcNAc	-130	349	-452
экспериментальная величина	+79		

глюкозамина (0,5 и 0,8 м.д. соответственно) и C1 остатка фукозы (1,2 м.д.), т. е. для сигналов углеродных атомов, испытывающих эффекты гликозилирования первого остатка вторым. Очевидно, это следствие использования при расчете химических сдвигов остатка N-ацетилглюкозамина эффектов гликозилирования, характерных для глюкозы, что является недостаточным хорошим приближением. В то же время использование при расчете химических сдвигов остатка фукозы эффектов гликозилирования, характерных для галактозы, привело к удовлетворительным результатам (табл. 4).

Установленная структура полисахарида *P. seracia* серотипа E была подтверждена анализом методом метилирования и расчетом удельного оптического вращения по правилу Кляйна [14]. В результате метилирования были идентифицированы 2,4-ди-О-метилфукоза и 2,4,6-три-*N*,*O*-метилглюкозамин, что указывало на замещение обоих моносахаридных остатков в положении 3 и тем самым на линейный характер полисахарида. Отсюда также следовало, что остатки фукозы и N-ацетилглюкозамина находятся в пиранозной форме. Расчет по правилу Кляйна привел к величине угла вращения, близкой к экспериментальному значению, только в предположении о *D*-конфигурации обоих моносахаридных остатков (табл. 5), что согласуется с выводом, сделанным при компьютерном анализе ^{13}C -ЯМР-спектра.

Особенностью моносахаридного состава изученных O-антигенных полисахаридов *P. seracia* серотипов B и E является присутствие в них *D*-фукозы — моносахарида, довольно редко встречающегося в бактериальных полисахаридах. Ранее *D*-фукоза была найдена в O-специфических полисахаридах ряда фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas*, таких, как некоторые патовары *P. syringae* (серогруппы II—VI) и *P. holci* (серогруппа VI) [18, 19]. Кроме присутствия *D*-фукозы O-антигены *P. seracia* и фитопатогенных видов *Pseudomonas* роднит также наличие в них еще одного относительно редко встречающегося моносахарида — *D*-рамнозы [5, 18—22]. Интересно, что *D*-фукоза недавно была обнаружена в O-специфическом полисахариде другого фитопатогенного микроорганизма — *Erwinia amylovora* T. [23].

Авторы благодарят Г. М. Липкина за проведение компьютерного анализа.

Экспериментальная часть

^1H -ЯМР-спектры сняты на приборе WM-250 (Bruker) в D_2O при 60° C с использованием в качестве внутреннего стандарта ацетона (δ 2,23 м.д.); эксперименты по ядерным эффектам Оверхаузера выполнены как описано [22]. ^{13}C -ЯМР-спектры получены на приборе AM-300 (Bruker) в D_2O при 60° C; внутренний стандарт — метанол (δ 50,15 м.д.). Оптическое вращение определяли на приборе Jasco DIP-360 в воде при 20° C. ГЖХ и ГЖХ-масс-спектрометрия выполнены как в работе [22]. Гель-фильтрация проведена на колонке (3,7×70 см) с гелем Sephadex G-50 в пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5. Серологические тесты проведены как описано ранее [24].

Бактериальные штаммы были любезно предоставлены доктором Шигета (Фукушима, Япония). Выращивание бактериальных культур проводили как в работе [5]. Липополисахариды выделяли по методу [6] и расщепляли как описано в работе [21].

Полисахариды гидролизовали 2 М НСl (100° С, 3 ч), моносахариды превращали в ацетаты полиолов как обычно; дезаминирование проводили как описано [25]. Полисахариды метилировали по методу [26], метилированные полимеры расщепляли как описано ранее, частично метилированные моносахариды идентифицировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов с использованием данных [27, 28].

ЛИТЕРАТУРА

1. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Веремейченко С. Н., Липкин Г. М., Шашков А. С., Захарова И. Я. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 352-358.
2. Monteil H., Richard C., Heidt A. // Med. mal. Infec. 1981. V. 11. № 10. P. 544-547.
3. Heidt A., Monteil H., Richard C. // J. Clin. Microbiol. 1983. V. 18. № 3. P. 738-740.
4. Nakamura Y., Hyodo S., Chonan E., Shigeta S., Yabuuchi E. // J. Clin. Microbiol. 1986. V. 24. № 1. P. 152-154.
5. Книрель Ю. А., Танатар Н. В., Солдаткина М. А., Шашков А. С., Захарова И. Я. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 1. С. 77-81.
6. Вестфаль О., Яни К. // Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967. С. 325-327.
7. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27-65.
8. Altona C., Haasnoot C. A. G. // Org. magn. Reson. 1980. V. 13. № 6. P. 417-429.
9. Cyr N., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1979. V. 57. № 18. P. 2503-2511.
10. Keller R. M., Wüthrich K. // Biol. magn. Reson. 1981. V. 3. P. 1-52.
11. Klyne W. // Biochem. J. 1950. V. 46. № 4. P. xli-xlii.
12. Mitchell F. Chemie der Zucker und Polysaccharide. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft Geest und Portig K.-G., 1956. S. 429.
13. Austin P. W., Hardy F. E., Buchman J. G., Baddiley J. // J. Chem. Soc. 1963. № 11. P. 5350-5353.
14. Williams J. M. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1975. V. 31. P. 9-79.
15. Липкин Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 833-842.
16. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59-75.
17. Kuhn R., Baer H. // Chem. Ber. 1953. V. 86. № 6. S. 724-730.
18. Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Мамян С. С., Яковлева Л. М., Соляник Л. П., Захарова И. Я. // Биоорган. химия. 1986. Т. 14. № 1. С. 82-91.
19. 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.
20. Smith A. R. W., Zamze S. E., Munro S. M., Carter K. J., Hignett R. C. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. № 1. P. 73-78.
21. 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.
22. 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.
23. Ray T. C., Smith A. R. W., Wait B., Hignet R. C. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 170. № 1/2. P. 357-361.
24. Книрель Ю. А., Танатар Н. В., Захарова И. Я., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 536-538.
25. 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.
26. Конрад Г. Е. // Методы исследования углеводов/Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 276-278.
27. Jansson P.-E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren J. // Chem. Commun. Stockholm Univ. 1976. № 8. P. 1-75.
28. Stellner K., Saito H., Nakomori S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1973. V. 155. № 2. Поступила в редакцию 14.IV.1988

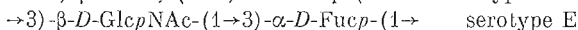
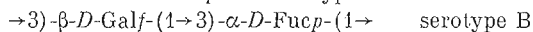
ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 32. STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAINS OF LIPOPOLYSACCHARIDES FROM *Pseudomonas cepacia* SEROTYPES B AND E CONTAINING D-FUCOSE

KNIREL Yu. A., SHASHKOV A. S., SOLDATKINA M. A. *, PARAMONOV N. A., ZAKHAROVA I. Ya. *

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

On the basis of acid hydrolysis, methylation, ¹H and ¹³C NMR analysis, and calculation of specific optical rotation, the following structures were established for O-specific polysaccharides of *Pseudomonas cepacia* serotypes B and E:



A characteristic feature of the polysaccharides is the presence of D-fucose, rather rare for bacterial antigens.