



УДК 577.444.5.088.53 : 579.841.11

© 1990 г. ]

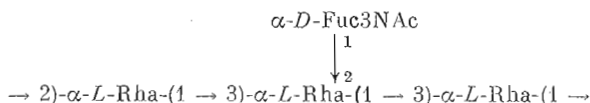
АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ  
**37\*. СТРУКТУРА ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА**  
*PSEUDOMONAS SYRINGAE* pv. *TABACI*  
 (СЕРОГРУППА VII)

*Шашков А. С., Здоровенко Г. М.\*, Давва Е. Д.,  
 Яковлева Л. М.\*, Соляник Л. П.\*, Гвоздяк Р. Н.\*,  
 Книрель Ю. А., Кочетков Н. К.*

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

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

На основании анализа методами одномерной и двумерной <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии, а также <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии и измерения оптического вращения установлена следующая структура О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, штамм 223 (серогруппа VII):



Результаты определения моносахаридного состава после полного кислотного гидролиза и данные метилирования подтвердили структуру полисахарида, установленную спектральными методами. О-Антиген изученного штамма имеет сходную структуру и близкие серологические свойства с О-антигенами штаммов *P. syringae*, относящихся к серогруппе I.

Настоящая работа продолжает изучение О-антигенных липополисахаридов фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* [2] и посвящена установлению строения О-специфической полисахаридной цепи липополисахарида *P. syringae* pv. *tabaci*, штамм 223. Этот микроорганизм, включенный в последнем издании определителя Берджи в вид *P. syringae* в ранге патовара [3], ранее считался самостоятельным видом *P. tabaci*. Согласно классификационной схеме [4], он неоднороден по серологическим свойствам. Его штаммы распределяются в двух серогруппах — VII и VIII; исследуемый штамм 223 — типичный представитель серогруппы VII. Ранее липополисахариды *P. syringae* pv. *tabaci* не исследовались.

Как и у ранее изученных штаммов *P. syringae*, липополисахарид исследуемого штамма легко отделялся в виде комплекса с белком при экстракции бактериальной массы солевым раствором [5]. Он характеризовался высокой серологической активностью в реакциях с гомологичной О-антисывороткой (две линии в тесте Оухтерлони, титры 1 : 50 000 в реакции кольцепреципитации, 1 : 1280 в реакции пассивной гемагглютинации).

О-Специфический полисахарид был получен при расщеплении липополисахарида разбавленной уксусной кислотой с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-50. Он также был серологически активен, о чем свидетельствовали образование одной линии в тесте Оухтерлони, титр 1 : 100 000 в реакции кольцепреципитации и наличие ингибирующей активности в той же минимальной дозе, что и у липополисахарида

\* Сообщение 36 см. [1]. Сокращение: Fuc3NAc — 3-ацетамидо-3-дезоксифукоза.

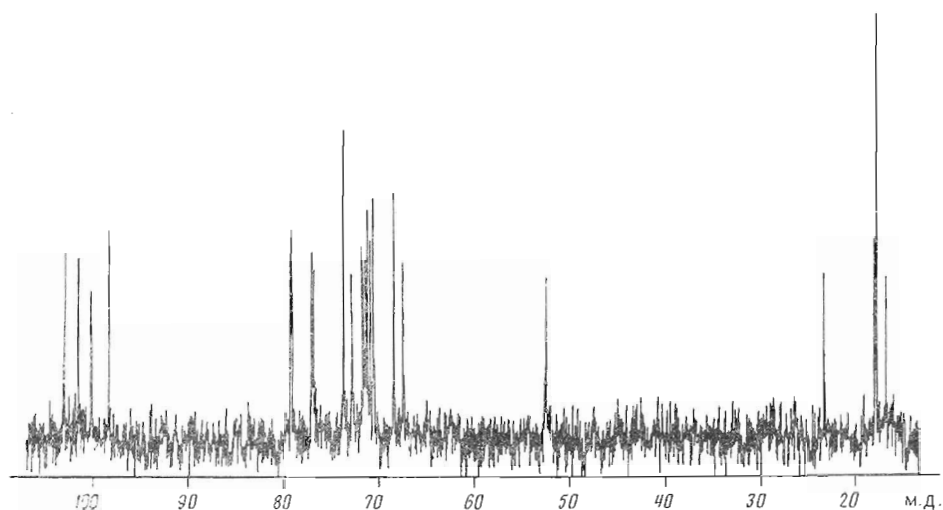


Рис. 1.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида (область резонанса СО не показана)

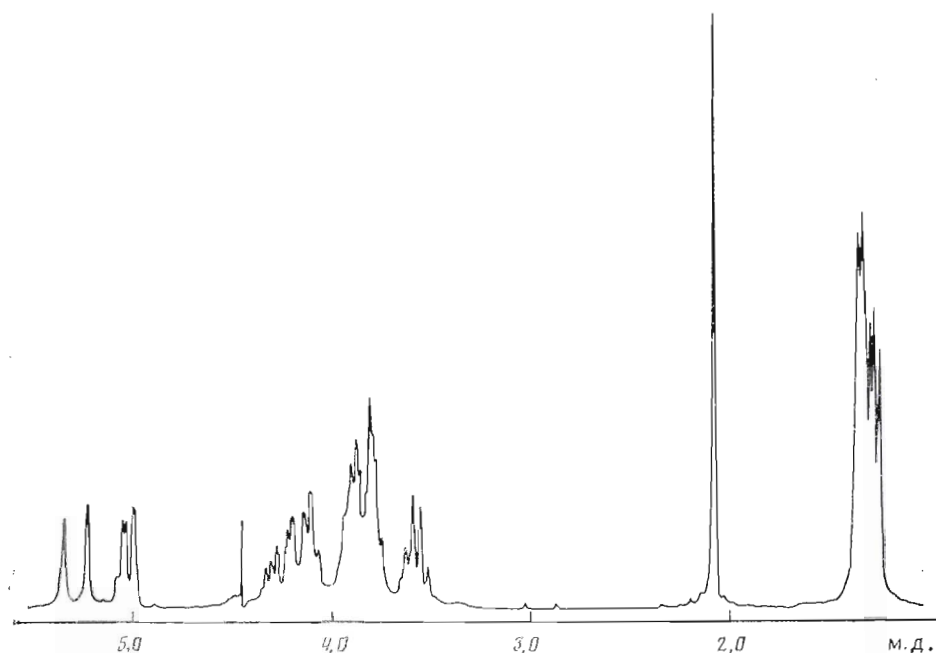


Рис. 2.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр О-специфического полисахарида

(4 мкг/мл), в реакции торможения пассивной гемагглютинации в тест-системе липополисахарид/О-антисыворотка.

$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр полисахарида был типичным для регулярного полимера (рис. 1). Он содержал сигналы четырех аномерных атомов углерода в области 98—103 м. д., четыре сигнала  $\text{CH}_3$  6-дезоксисахаров при 16,8—17,9 м. д., одного атома углерода, связанного с азотом, при 52,3 м. д., 16 остальных атомов углерода моносахаридных остатков в области 67—80 м. д. и одной N-ацетильной группы ( $\text{CH}_3$  при 23,2 м. д. и СО при 175,5 м. д.).

В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре полисахарида (рис. 2) присутствовали сигналы четырех метильных групп 6-дезоксисахаров при 1,25—1,34 м. д., одной N-ацетильной группы при 2,07 м. д., четырех аномерных протонов при 4,9—5,4 м. д. и остальных протонов моносахаридных остатков в области 3,5—4,3 м. д.

Данные <sup>1</sup>H-ЯМР-спектра полисахарида

Моносахаридный остаток	Протон	Химический сдвиг, м. д.	Мультиплетность	Константа спин-спинового взаимодействия, Гц
A	H1	5,36	уш <sup>#</sup>	$J_{1,2}$
	H2	4,12	дд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	3,93	дд	$J_{3,4}$ 9,7
	H4	3,56	т	$J_{4,5}$ 9,7
	H6	1,29 *	д	$J_{5,6}$ 6,0
B	H1	4,99	уш <sup>#</sup>	$J_{1,2}$
	H2	4,20	дд	$J_{2,3}$ 3,6
	H3	3,86	дд	$J_{3,4}$ 9,5
	H4	3,61	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H6	1,33 *	д	$J_{5,6}$ 6,0
C	H1	5,23	уш <sup>#</sup>	$J_{1,2}$
	H2	4,15	дд	$J_{2,3}$ 3,5
	H3	4,09	дд	$J_{3,4}$ 9,7
	H4	3,78	т	$J_{4,5}$ 9,5
	H6	1,34 *	д	$J_{5,6}$ 6,0
D	H1	5,03	д	$J_{1,2}$ 3,8
	H2	3,84	дд	$J_{2,3}$ 11,5
	H3	4,23	дд	$J_{3,4}$ 3,4
	H4	3,79	д	$J_{4,5}$ 1
	H5	4,35	к	$J_{5,6}$ 6,2
	H6	1,25	д	
	CH <sub>2</sub> CON (3H)	2,07	с	

\* Отнесение сигналов может быть обратным.

<sup>#</sup> Уширенный синглет.

Из данных спектров следовало, что полисахарид построен из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, включающих четыре 6-дезоксисахара, один из которых является N-ацетиламиносахаром. Константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) аномерных атомов углерода с аномерными протонами, определенные из снятого без подавления C,H-взаимодействий <sup>13</sup>C-ЯМР-спектра полисахарида, были не менее 170 Гц, что доказывало отсутствие моносахаридов, присоединенных β-гликозидной связью [6].

<sup>1</sup>H-ЯМР-спектр полисахарида оказался достаточно хорошо разрешенным для проведения бездеструктивного анализа состава и строения этого полимера. Для этой цели была использована модифицированная методика селективного гомоядерного двойного резонанса в разностном варианте [7]. В результате последовательного применения этого метода были определены химические сдвиги и КССВ вицинальных протонов моносахаридного остатка, аномерный протон которого резонирует при 5,08 м.д. (остаток D, табл. 1). Судя по величинам КССВ [8], этот остаток находится в пиранозной форме, имеет α-галакто-конфигурацию и является, таким образом, производным фукопиранозы. Для трех остальных моносахаридных остатков удалось идентифицировать только сигналы протонов H2, в то время как соотнести сигналы остальных протонов этих остатков не удалось из-за близости взаимного положения сигналов H2 (табл. 1).

Эту трудность удалось преодолеть с помощью варианта двумерной спектроскопии, в котором сочетается корреляционная спектроскопия COSY и релейная спектроскопия RCT [9]. Этот подход позволяет получить корреляцию химических сдвигов сигналов протонов, разделенных тремя и четырьмя связями (аномерных протонов с протонами H2 и H3, протонов H2 с протонами H3 и H4 и так далее). Из полученного двумерного спектра (рис. 3) легко удалось определить положение сигналов протонов H3 остатков А—С по их взаимодействию с протонами H1 и прото-

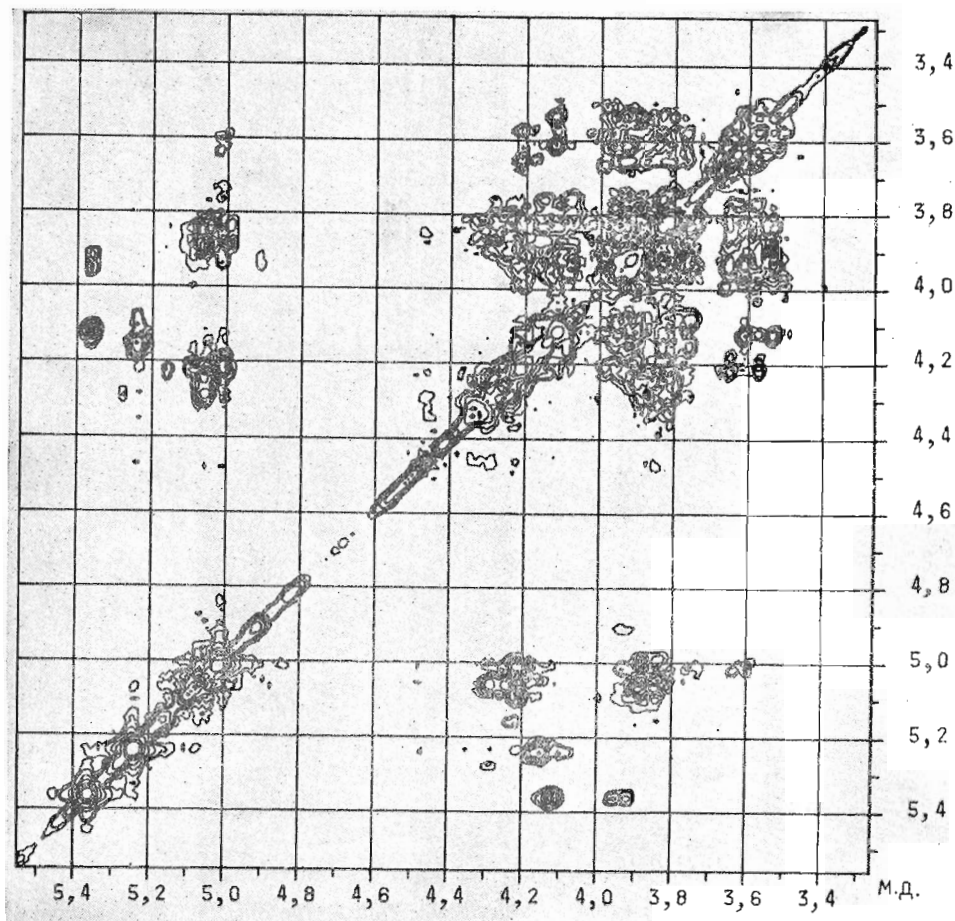


Рис. 3. Двумерный корреляционный спектр COSYRCT

нов Н4 по их взаимодействию с протонами Н2, отнесение которых было сделано с помощью одномерной спектроскопии. Затем с применением методики последовательного селективного двойного резонанса был определен характер расщепления сигналов остатков А—С и для них были найдены КССВ вицинальных протонов (табл. 1). Из величин этих КССВ следовало, что остатки А—С находятся в пиранозной форме и имеют *манно*-конфигурацию, т. е. являются производными рамнопиранозы. С учетом данных по константам спин-спинового взаимодействия  $^1J_{C,H}$  (см. выше) все три производных рамнозы имеют  $\alpha$ -конфигурацию.

Для выяснения вопроса, который из моносахаридных остатков является остатком аминасахара, была использована методика селективного гетероядерного  $^{13}C_i\{^1H_i\}$  резонанса. В результате было найдено, что атомом углерода, несущим ацетамидогруппу, является атом С3 моносахарида с *галакто*-конфигурацией. Следовательно, в состав повторяющегося звена полисахарида входит один остаток 3-ацетамидо-3-дезоксифукозы и три остатка рамнозы. В этой же серии экспериментов было проведено отнесение большинства остальных сигналов в  $^{13}C$ -ЯМР-спектре полисахарида, в частности сигналов неаномерных атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей (табл. 2). Судя по относительно слабопольному положению соответствующих углеродных сигналов, один из остатков рамнозы замещен в положении 2, второй — в положении 3 и третий — в положениях 2 и 3. Следовательно, полисахарид является разветвленным, в узле разветвления лежит один из остатков рамнозы, а остаток аминасахара — терминальный моносахарид боковой цепи.

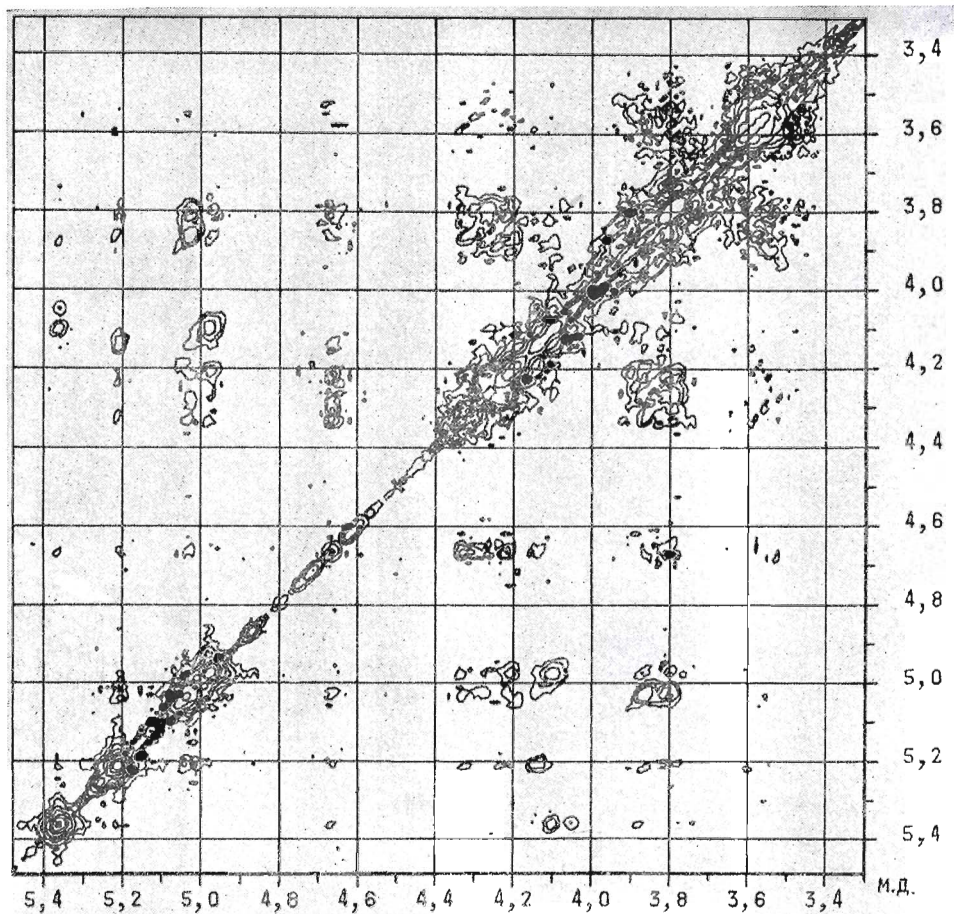
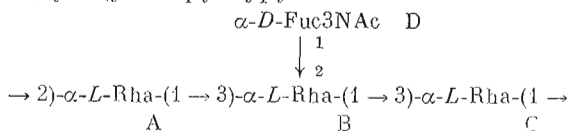


Рис. 4. Двумерный корреляционный спектр NOESY

Для подтверждения типов замещения моносахаридных остатков и выяснения их последовательности были проведены эксперименты по определению ядерных эффектов Оверхаузера в двумерном и одномерном вариантах. В двумерном спектре NOESY [10] (рис. 4), кроме корреляционных пиков на пересечениях химических сдвигов сигналов аномерных протонов и протонов H2, принадлежащих этим же моносахаридам, видны также пики на пересечениях химических сдвигов сигналов H1 остатка А и H3 остатка В, H1 остатка В и H3 остатка С, H1 остатка В и H1 остатка D, H1 остатка С и H2 остатка А, H1 остатка D и H2 остатка В. В одномерном варианте (разностная спектроскопия) при последовательном облучении аномерных протонов подтвердилась пространственная близость всех перечисленных выше пар протонов и были определены также величины наблюдающихся отрицательных ядерных эффектов Оверхаузера (табл. 3). Полученные данные показывают, что остаток 3-ацетамидо-3-дезоксифукозы присоединяется непосредственно к основной цепи в положении 2 остатка В, который замещен в основной цепи в положении 3, остаток В гликозилирует остаток С в положении 3 и остаток С присоединяется в положение 2 остатка А. Эти данные полностью согласуются с результатами расшифровки  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектра (см. выше), и, таким образом, О-специфический полисахарид *P. syringae* pv. *tabaci*, штамм 223, имеет следующую структуру:



Химические сдвиги в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида (м. д.) \*

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
A	101,5	79,1	71,1	73,6	70,5 **	17,7 ***
B	100,2	77,0	76,5	73,5	70,9 **	17,9 ***
C	103,0	71,1	79,2	72,6	70,5 **	17,7 ***
D	98,3	67,2	52,3	71,5	68,4	16,8

\* Химические сдвиги сигналов N-ацетильной группы 23,2 м. д. ( $\text{CH}_3$ ) и 175,5 м. д. (CO).  
 \*\*, \*\*\* Отнесение может быть обратным.

Таблица 3

Величины ядерных эффектов Оверхаузера, наблюдающихся при облучении аномерных протонов

Облучаемое звено	Ядерные эффекты Оверхаузера (% от интенсивности сигнала предоблучаемого протона)							
	H2-A	H1-B	H2-B	H3-B	H2-C	H3-C	H1-D	H2-D
A	*			*				
B			20			40	20	
C	45				20			
D		15	20					40

\* Суммарная интенсивность близлежащих друг к другу сигналов H2-A и H3-B в разностном спектре составляет 65%.

Из данных ядерного эффекта Оверхаузера (табл. 3) может быть сделан ряд заключений об абсолютной конфигурации моносахаридов. Так, отсутствие заметных эффектов на сигнале H2 остатка B при облучении H1 остатка A или на сигнале H2 остатка C при облучении H1 остатка B свидетельствует об одинаковой абсолютной конфигурации рамнозных остатков A, B и C [11]. В то же время наличие заметного эффекта на сигнале H1 остатка B при облучении H1 остатка D указывает на различные абсолютные конфигурации этих двух остатков [11]. Таким образом, возможны две альтернативные структуры полисахарида, в одну из которых входит *L*-рамноза и 3-ацетамидо-3-дезоксид-фукоза, а во вторую — *D*-рамноза и 3-ацетамидо-3-дезоксид-*L*-фукоза. Выбор между этими двумя структурами был сделан на основании расчета величин удельного оптического вращения полисахарида по правилу Кляйна [12]. Расчет привел к величине, хорошо согласующейся с экспериментальной, только в предположении о *D*-конфигурации 3-ацетамидо-3-дезоксифукозы и *L*-конфигурации рамнозы (табл. 4).

Таким образом, полная структура полисахарида установлена бездеструктивным путем без применения каких-либо химических методов. Она была подтверждена результатами полного кислотного гидролиза (2M  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ), приведшего к образованию рамнозы (данные ГЖХ в виде ацетатов полиолов) и 3-амино-3-дезоксифукозы (данные анализа с помощью аминокислотного анализатора), а также метилирование, в результате которого были идентифицированы 2,4-ди-*O*-метилрамноза, 3,4-ди-*O*-метилрамноза, 4-*O*-метилрамноза и 2,3,4-три-*N*,*O*-метил-3-амино-3-дезоксифукоза (данные ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов).

*O*-Специфический полисахарид *P. syringae* pv. *tabaci*, относящийся к серогруппе VII, имеет тип структуры, характерный для многих изученных ранее представителей фитопатогенных псевдомонад, продуцирующих разветвленные полисахариды с основной цепью, представленной рамнозом. Более того, основная цепь полисахарида серогруппы VII имеет такую же структуру, что и построенные из трисахаридных повторяющихся звеньев *O*-специфические полисахариды ряда штаммов *P. syringae*, входя-

Расчет оптического вращения полисахарида по правилу Кляйна

Соединение	$[\alpha]_D$ , град	$M_r$	$[M]_D$ , град
Метил-3-ацетамидо-3-дезоксид- $\alpha$ -L-фукопиранозид [13]	-234,5	219	-513,6
Метил- $\alpha$ -L-рамнопиранозид [14]	-67,2	178	-119,6
Полисахарид, рассчитано	+25	625	+154,8
найденно	+19,7		

щих в серогруппу II, с тем лишь исключением, что в полисахаридах серогруппы II рамноза имеет не L-, а D-конфигурацию [15]. L-Рамнан был обнаружен нами ранее в качестве основной цепи O-специфических полисахаридов *P. syringae* серогруппы I [2, 16]. Эти полисахариды сближаются с полисахаридом серогруппы VII также присутствие в боковой цепи одного и того же моносахарида — 3-ацетамидо-3-дезоксид-D-фукозы, в то время как различия между ними связаны с тем, что в серогруппе I рамнан основной цепи построен не из трисахаридных, а из тетрасахаридных звеньев, боковая цепь присоединяется не в положение 2, а в положение 3 одного из остатков рамнозы, а также тем, что полисахариды серогруппы I лишены истинной регулярности, характерной для полисахарида серогруппы VII.

В соответствии с близостью структур O-антигенов штаммы серогрупп I и VII проявляют высокую степень серологического родства (неопубликованные данные авторов). В то же время выявленное структурное и серологическое родство липополисахаридов не согласуется с данными ДНК/ДНК гибридизации, согласно которым *P. syringae* pv. *syringae* и pv. *tabaci* входят в различные группы бактерий, формирующиеся на основе геномного сходства [3].

#### Экспериментальная часть

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр снят на приборе Bruker WM-250 (ФРГ) в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $70^\circ\text{C}$ , внутренний стандарт — ацетон ( $\delta$  2,24 м.д.). Спектры ядерных эффектов Оверхаузера получали по методике [17] разностным способом. Двумерный спектр, сочетающий спектроскопию COSY и одноступенчатую релейную спектроскопию (COSYRCT), и двумерный спектр NOESY сняты по стандартной методике из матобеспечения фирмы Bruker (ФРГ) к спектрометрам с ЭВМ ASPECT-2000 с введением в них цикла подавления сигнала воды и использованием спектрального окна 1270 Гц при объеме памяти 1К слоев (разрешение 2,5 Гц на точку). В методике COSYRCT применяли последовательность из двух  $90^\circ$ -ных (5,8 мс), одного  $180^\circ$ -ного (11,6 мс) и вновь  $90^\circ$ -ного импульсов, релаксационная задержка  $D1 = 1$  с, время смещения  $D2 = 0,033$  с, что является оптимальным для константы спин-спиновой взаимодействия 10 Гц. В методике NOESY использовали последовательности трех  $90^\circ$ -ных импульсов (5,8 мс). При фурье-преобразовании использовали синусоидальную функцию с нулевым сдвигом.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр записан на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $70^\circ\text{C}$ , внутренний стандарт — метанол ( $\delta$  50,15 м.д.).

Измерение оптического вращения, гель-хроматография, анализ с помощью анализатора аминокислот, ГЖХ, ГЖХ-масс-спектрометрия, полный кислотный гидролиз, метилирование проводились как в работах [16, 18]. Выращивание бактерий, выделение липополисахарида, O-специфического полисахарида, получение сывороток и серологические тесты выполняли как описано в работах [5, 19].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кширель Ю. А., Здоровенко Г. М., Вермейченко С. Н., Шашков А. С., Захарова И. И., Кочетков Н. Е. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15.
2. Кширель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шашков А. С., Мамян С. С., Губанова Н. Я., Яковлева Л. М., Соляник Л. П. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 180—186.

3. *Palleroni N.* // *Bergey's manual of systematic bacteriology* / Ed. Holt J. G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. V. 1. P. 141—219.
4. *Пастушенко Л. Т., Симонович И. Д.* // *Микробиол. журн.* 1979. Т. 41. № 4. С. 330—339.
5. *Здоровенко Г. М., Яковлева Л. М., Гвоздяк Р. И., Захарова И. Я., Кошечкина Л. Н.* // *Микробиол. журн.* 1982. Т. 44. № 2. С. 65—70.
6. *Vock K., Pedersen C.* // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* 1974. № 3. P. 293—297.
7. *Бенидзе М. М., Джикия О. Д., Пхеидзе Т. А., Кемертелидзе Э. П., Шапков А. С.* // *Химия природ. соединений.* 1987. № 4. С. 537—542.
8. *Altona C., Haasnoot C. A. G.* // *Org. Magn. Reson.* 1980. V. 13. № 6. P. 417—429.
9. *Vax A., Drobny G.* // *J. Magn. Reson.* 1985. V. 61. P. 306—311.
10. *Hull W. E.* // *Two-dimensional NMR spectroscopy* / Eds Croasmun W. R., Carlson R. M. K. N. Y.: VCH Publishers Inc. 1987. P. 67—231.
11. *Lipkind G. M., Shashkov A. S., Mamyan S. S., Kochetkov N. K.* // *Carbohydr. Res.* 1988. V. 181. № 1. P. 1—12.
12. *Klune W.* // *Biochem. J.* 1950. V. 46. № 4. P. xli-xlii.
13. *Сарек К., Стофкова Ј., Јару Ј.* // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1966. V. 31. № 4. P. 1854—1863.
14. *Fisher E., Bergmann M., Rabe A.* // *Ber.* 1920. B. 53. № 11. S. 2362—2388.
15. *Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шапков А. С., Мамян С. С., Яковлева Л. М., Соляник Л. П., Захарова И. Я.* // *Биоорган. химия.* 1988. Т. 14. № 1. С. 82—91.
16. *Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Шапков А. С., Яковлева Л. М., Губанова Н. Я., Гвоздяк Р. И.* // *Биоорган. химия.* 1988. Т. 14. № 1. С. 172—179.
17. *Wagner G., Wüthrich K.* // *J. Magn. Reson.* 1979. V. 33. P. 675—680.
18. *Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Веремейченко С. П., Липкинд Г. М., Шапков А. С., Захарова И. Я., Кочетков Н. К.* // *Биоорган. химия.* 1988. Т. 14. № 3. С. 352—358.
19. *Книрель Ю. А., Здоровенко Г. М., Дашукин В. М., Яковлева Л. М., Шапков А. С., Захарова И. Я., Гвоздяк Р. И., Кочетков Н. К.* // *Биоорган. химия.* 1986. Т. 12. № 9. С. 1253—1262.

Поступила в редакцию  
18.IV.1989

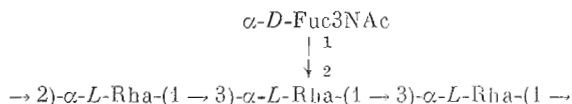
ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 37. STRUCTURE  
OF POLYSACCHARIDE CHAIN OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV.  
*TABACI* (SEROGROUP VII) LIPOPOLYSACCHARIDE

SHASHKOV A. S., ZDOROVENKO G. M.\*, DAEVA E. D., YAKOVLEVA L. M.\*,  
SOLYANIK L. P.\*, GVOZDYAK R. I.\*, KNIREL Y. A., KOCHETKOV N. K.

*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*

The structure of the O-specific polysaccharide chain of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* strain 223 (serogroup VII) lipopolysaccharide was established on the basis of one- and two-dimensional  $^1\text{H}$  NMR analysis,  $^{13}\text{C}$  NMR analysis and calculation of optical rotation. The structure determined by the non-destructive way was confirmed by acid hydrolysis and methylation.



O-Antigen of the strain studied is similar in structure and serological properties to O-antigens of *Pseudomonas syringae* strains belonging to serogroup I.