

Isolering en gedeeltelijke karakterisering van Groep H, I en K meningococcon polysaccharide

R.H.TIESJEMA, B.J.TE PAS, P.A.DE GRAAF, P.SMID, E.P.M.VERHAGEN, E.C.BEUVERY, A.VAN DER KAADEN*, J.P.KAMERLING** en J.F.G.VLIEGENTHART**

Inleiding

Meningococcon worden op basis van hun kapselpolysaccharide ingedeeld in serogroepen, waarvan er tot voor enkele jaren acht waren beschreven (A, B, C, 29E, W135, X, Y en Z). Met het bestaande systeem is een aantal stammen echter niet groepeerbaar. In 1981 beschreven Ding Shao-ting et al. drie nieuwe serogroepen (H, I en K), waarmee het merendeel van de tot dusverre niet groepeerbare stammen in China nu wel gegroepeerd kon worden. Van de eerstgenoemde acht serogroepen is de chemische structuur van de kapselpolysacchariden bekend (Tiesjema, 1977), van de drie recent beschreven chinese groepen ontbreken gegevens.

Resultaten

Teneinde na te gaan of de groepen H, I en K elk eveneens een groepspecifiek polysaccharide bezitten, zijn de via prof.H.C.Zanen (Laboratorium voor de Gezondheidsleer, Amsterdam) ontvangen chinese referentiestammen in 40 l Biltoven-fermentoren aangekweekt in het voor de productie van meningococcon polysaccharide gebruikelijke gemodificeerde Frantz-medium, onder regeling van pH (7.0) en pO_2 (10% luchtverzadiging). Uit de cultuurvloeistoffen zijn, met de voor anionische meningococcon polysacchariden beschreven methodiek (Tiesjema, 1977), de groep H, I en K polysacchariden geïsoleerd; de opbrengsten bedroegen respectievelijk 34, 29 en 29 mg per liter, vergelijkbaar met die van andere serogroepen. De gezuiverde polysacchariden zijn geanalyseerd met de voor meningococcon (WHO, 1976; 1981) en pneumococcon (BoB, 1979; WHO, 1979) polysacchariden gebruikelijke analysemethoden, en met behulp van infraroodspectroscopie en pyrolyse-massaspectrometrie.

Tabel 1 geeft de resultaten van chemische analyse. De groep H, I en K polysacchariden zijn (partiële) O-gaacetylerd. Alle polysacchariden bevatten Ca^{2+} als kation, waartegenover dus een anionische groep moet staan. Groep H bevat, evenals A, X en Z, fosfaat, maar onderscheidt zich van deze groepen door de aanwezigheid van een hexose (met behulp van dunnelaagchromatografie en gaschromatografisch geïdentificeerd als galactose) in plaats van een N-gaacetylerde hexosamine, en heeft met groep Z verder een glyceroleenheid gemeen. De groepen I en K bevatten geen fosfaat, en in tegenstelling tot de groepen B, C, 29E, W135 en Y ook geen N-acetylneuraminezuur of ketodesoxyoctonzuur.

Tabel 2 geeft een schatting van de grootte van de repeterende eenheid van de polysacchariden, berekend uit het calcium- of fosfaatgehalte. Op grond hiervan mag verwacht worden dat de repeterende eenheid van groep H polysaccharide twee suikereenheden bevat, die van groep I en K waarschijnlijk één.

Tabel 1

Kwalitatieve analyse van meningococcon polysacchariden

analyse	groep											
	A	B	C	29E	H	I	K	W135	X	Y	Z	
Alditol	-	-	-	-	glyc	-	-	-	-	-	glyc	
Aldose	-	-	-	-	gal	-	-	gal	-	glc	-	
Ca	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
HexNAc	man	-	-	gal	-	+	+	-	glc	-	gal	
KDO	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
NeuNAc	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	
O-acetyl	+	-	+, -	+	+	+	+	+, -	-	+	-	
P	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	
Uronzuur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabel 2

Schatting molecuulgewicht repeterende eenheid van meningococcon polysacchariden op grond van calcium respectievelijk fosforgehalte

groep	P (%)	Ca (%)	MW repeterende eenheid uit		
			P	Ca	structuur
A	9.0	5.5	340	360	340
B	-	4.9	-	410	310
C	-	4.9	-	410	340
29 E	-	4.4	-	460	450
H	7.5	4.9	410	410	
I	-	6.8	-	290	
K	-	6.7	-	300	
W135	-	4.5	-	450	480
X	8.3	7.1	370	280	300
Y	-	3.9	-	510	480
Z	8.0	5.2	390	390	380

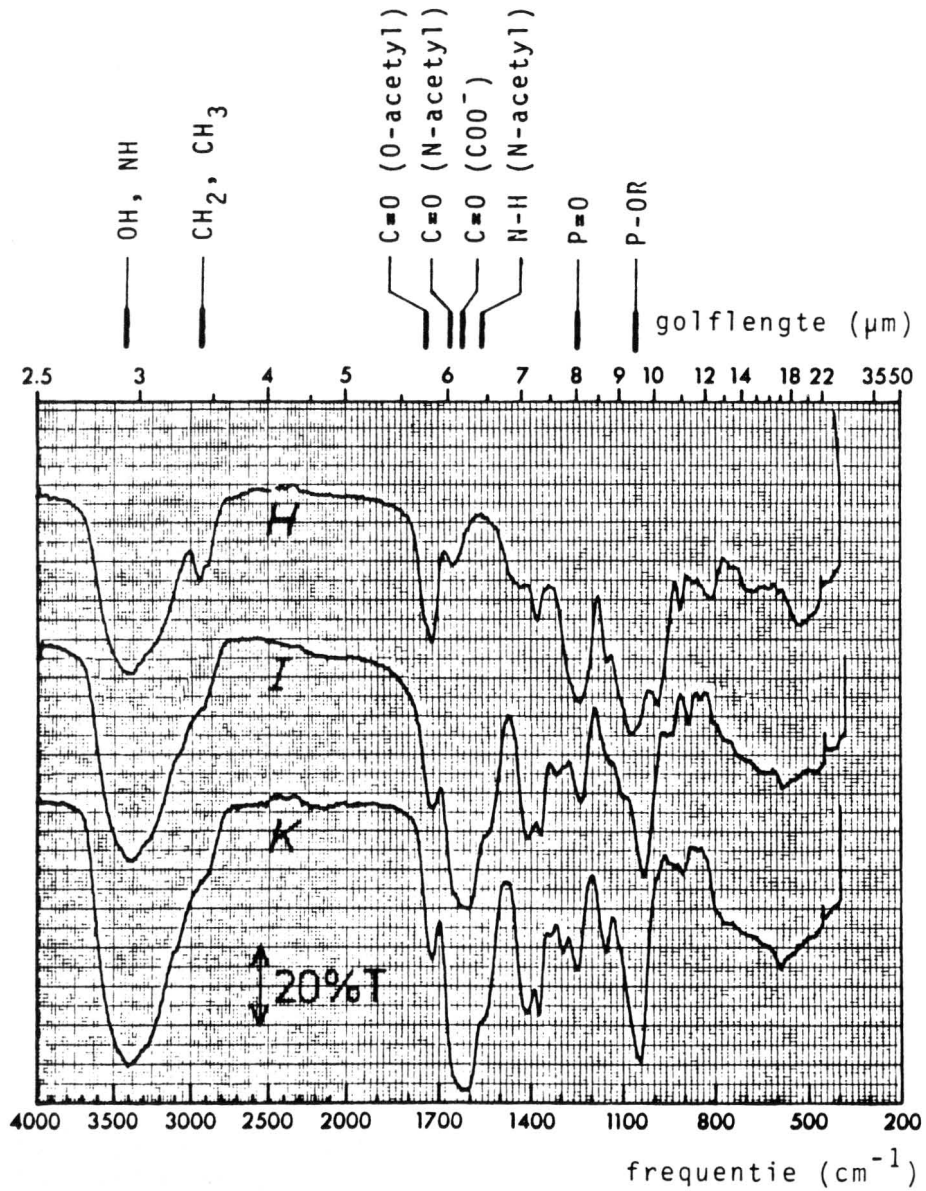
De infraroodspectra in figuur 1 bevestigen de chemische analyse. Een fosfaatgroep (ca. 1230 cm^{-1}) is aanwezig in groep H, en afwezig in de groepen I en K. Groepen I en K bevatten, in tegenstelling tot groep H, een COO^- groep (ca. 1620 cm^{-1}). Opvallend is de sterke overeenkomst tussen de spectra van groepen I en K, met slechts geringe verschillen (ca. 1300 en 1150 cm^{-1}), wat aansluit bij de door Ding Shao-ting (1981) beschreven sterke mate van kruisreactiviteit tussen de groepen I en K.

* FOM Instituut voor Atoom- en Molecuulfysica, Amsterdam

** Afdeling Bio-Organische Chemie, Organisch-Chemisch Laboratorium, R.U. Utrecht

Figuur 1

Infraroodspectra van groep H, I en K meningococce polysacchariden (0,3% in KBr)



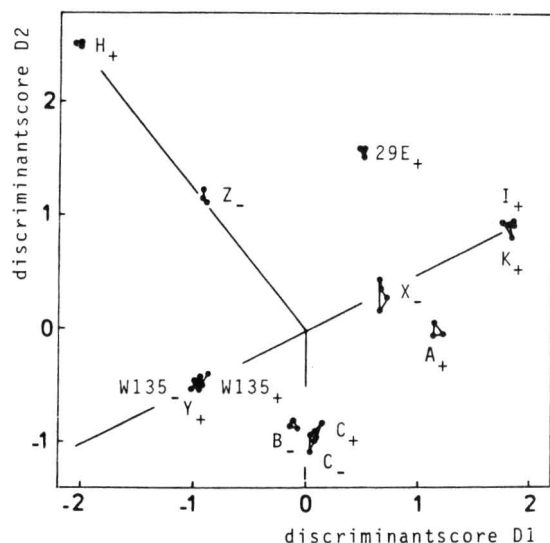
Pyrolyse-massaspectrometrie leverde aanwijzingen voor de aanwezigheid van glycerol (partiële O-geacetylerd) in groep H polysaccharide, en voor de aanwezigheid van een N-geacetylerde aminosuiker in de groepen I en K. De via computerbewerking verkregen discriminant scoreplot in figuur 2 rangschikt de verschillende polysacchariden naar structurele overeenkomsten; duidelijk is de verwantschap tussen groep I en groep K en een zekere mate van verwantschap tussen groep H en groep Z.

Conclusie

Het is duidelijk dat ook bij de groepen H, I en K het onderscheid is gebaseerd op de aanwezigheid van groep-specifieke polysacchariden.

Figuur 2

Discriminantscoreplot van pyrolyse-massaspectra van meningococcon polysacchariden groep A, B, C, 29E, H, I, K, W135, X, Y en Z. Aan- respectievelijk afwezigheid van O-acetylering is aangegeven met + respectievelijk -.



Als waarschijnlijke samenstelling van groep H polysaccharide kan, op basis van de voorgaande gegevens, worden opgegeven galactose, glycerol, via fosfordiëster-verbindingen gekoppeld, en partiële O-geacetylerd op glycerol. Het polysaccharide is daarmee structureel verwant aan dat van groep Z, opgebouwd uit N-acetylgalactosamine en glycerol, eveneens via fosfordiëster-verbindingen gekoppeld. Uit de opgegeven samenstelling volgt voor de repeterende eenheid van groep H polysaccharide een molecuulgewicht van ca. 380; dit komt goed overeen met het uit calcium- en fosforgehalte geschatte molecuulgewicht van 410.

Groep I en groep K polysaccharide zijn mogelijk opgebouwd uit N-geacetylerde suikerzuren, hetzij verschillend in bindingstype tussen dezelfde eenheden (zoals bij groep B en groep C), hetzij verschillend in sterische configuratie van een -OH groep (zoals bij W135 en Y).

Literatuur

- Bureau of Biologics, Food and Drug Administration. Guidelines for release of pneumococcal vaccine, polyvalent. Issued november 16, 1977, reissued july 27, 1979
- Ding Shao-qing, Ye Ren-bang and Zhang Huan chun. Three new serogroups of *Neisseria meningitidis*. *J.Biol.Stand.* 9 (1981) 307
- Tiesjema, R.H. Meningococcenvaccin. Bereiding en controle. *Volksgezondheid, V.A.R.* 17 (1977) 235
- World Health Organization. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. *WHO Tech.Rep.Ser.* 594 (1976) 50
- World Health Organization. Draft requirements for pneumococcal polysaccharide vaccine. (1979)
- World Health Organization. Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine, Addendum 1980. *WHO Techn.Rep.Ser.* 658 (1981) 174