



УДК 547.455.6'472.3

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

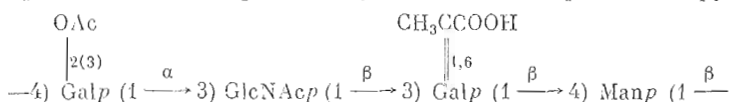
VII. СТРУКТУРА ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA DYSENTERIAE* ТИП 9

Дмитриев В. А., Книрель Ю. А., Виноградов Е. В.,
Кочетков Н. К., Гофман И. Л.

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

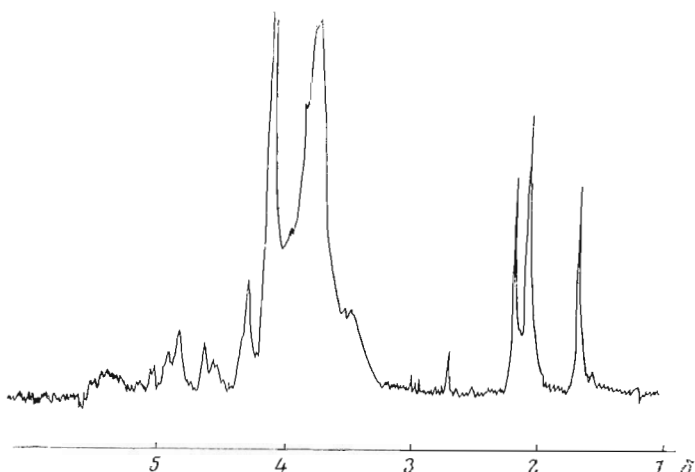
Институт эпидемиологии и микробиологии Минздрава РСФСР, Москва

Из О-антигенного липополисахарида *Shigella dysenteriae* тип 9 мягким кислотным гидролизом с последующей хроматографией на сефадексе G-50 выделен кислый специфический полисахарид, построенный из остатков *D*-галактозы, *D*-маннозы и 2-ацетамидо-2-дезоксид-*D*-глюкозы в соотношении 2 : 1 : 1. Кроме того, в состав полисахарида на повторяющееся звено входят также один остаток пировиноградной кислоты, присоединенный кетальной связью, и одна О-ацетильная группа. На основании данных анализа методом метилирования нативного полисахарида и полисахарида, полученного после частичного снятия остатков пировиноградной кислоты, а также по данным расщепления нативного и О-дезацетилированного полисахарида по Смитту и окисления ацетилированного полисахарида хромовым ангидридом повторяющемуся звену специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* типа 9 приписана структура



В ходе изучения липополисахаридов (ЛПС) всех 10 серотипов группы *Shigella dysenteriae* было показано, что отсутствие серологического родства внутри этой группы бактерий обусловлено существенными различиями в строении специфических полисахаридных цепей их ЛПС [1]. Кроме того, оказалось, что в соответствии с серологическими свойствами и химической природой специфических полисахаридов серотипы *Sh. dysenteriae* образуют две четко различающиеся группы. К первой группе относятся серотипы 1,2 и 10, обладающие нейтральными специфическими полисахаридами, ингибирующими реакцию как с О(К)-, так и с О-антисыворотками. Во вторую группу входят серотипы 3—9 с кислыми специфическими полисахаридами, ингибирующими только О(К)-антисыворотку, т. е. ведущими себя подобно К-антигенам [2].

Кислотность полисахаридов серотипов 3—9 обусловлена различными моносахаридами, такими, как глюкуроновая кислота у серотипов 4 [3] и 8, глюколактиловая и рамнолактиловая кислоты в случае серотипов 3 [4] и 5 [5], галактозаминуриновая кислота у серотипа 7. В настоящем сообщении приведены данные о структуре специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 9, включающего новый кислый компонент 4,6-О-(1-карбоксииэтилиден)-галактозу.



Спектр протонного магнитного резонанса специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 9, снятый в $^2\text{H}_2\text{O}$ при 100 МГц

ЛПС был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией водным фенолом с последующим отделением нуклеиновых кислот в виде солей с цетавлоном и ультрацентрифугированием по методике [6]. Полученный антиген ингибировал РПГА с антисыворотками против живой и прогретой культур в дозах до 1,9 мкг/мл и, следовательно, являлся типовым О-антигеном.

Деградация ЛПС была проведена 1% уксусной кислотой (1,5 ч, 100°), липид был отделен центрифугированием, а углеводная фракция подвергалась гель-хроматографии на сефадексе С-50, что привело к специфическому полисахариду и олигосахаридной фракции. Полученный полисахарид ингибировал РПГА с антисывороткой против живой культуры в дозе 15 мкг/мл. При использовании для иммунизации прогретой (100°, 2 ч) культуры активность полисахарида заметно падала (активная доза 250 мкг/мл) и практически исчезала в реакции с антисывороткой против автоклавированной (120°, 2 ч) культуры. Олигосахаридная фракция была серологически неактивна и поэтому далее не исследовалась.

Полисахарид, по данным электрофореза на бумаге, был кислым и двигался к аноду в виде одной зоны. В ИК-спектре полисахарида имелись полосы поглощения ацетамидной (1650 и 1560 см^{-1}), а также сложнэфирной (1740 и 1257 см^{-1}) группы. В ПМР-спектре присутствовали сигналы N-ацетильной (δ 2,01 м.д.) и O-ацетильной группы (δ 2,11 м.д.), а также синглет при δ 1,59 м.д. с соотношением интегральных интенсивностей 1,2 : 1 : 0,9. Последний сигнал принадлежал, по нашему предположению, метильной группе остатка пировиноградной кислоты, присоединенной к одному из моносахаридных остатков кетальной связью (рисунок). Для подтверждения этого предположения полисахарид был обработан триэтиламином в воде. При этом сигнал O-ацетильной группы в ПМР-спектре исчезал, тогда как сигналы N-ацетильной группы и остатка пирувата оставались без изменения. Кроме того, полисахарид был подвергнут гидролизу в условиях дегградации липополисахарида (1%-ная AcOH , 100°). O-Ацетильная и N-ацетильная группы в этих условиях не затрагивались, тогда как содержание C-метильной группы пирувата снизилось за 6 ч в 3 раза (соотношение интегральных интенсивностей сигналов в ПМР-спектре 1,2 : 1 : 0,3). Таким образом, устойчивость исследуемой группы в щелочных условиях и лабильность в кислой среде в сочетании с полным совпадением величины химического сдвига с данными, приведенными в литературе для кеталей пировиноградной кислоты [7], а также данные метилирования (см. ниже) подтверждают наличие в полисахариде карбок-

святилиденной группы. Заниженное содержание остатка пировиноградной кислоты в исходном полисахариде объясняется частичной ее потерей в процессе кислотной дегградации ЛПС.

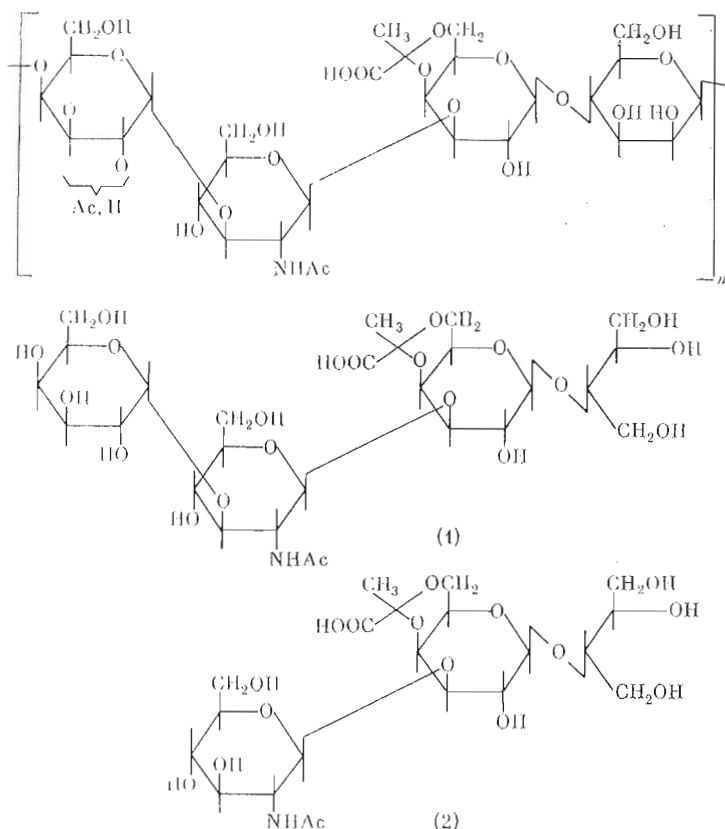
Для определения моносахаридного состава полисахарид был подвергнут гидролизу 2 н. HCl (4 ч, 100°); в гидролизате с помощью анализатора углеводов были обнаружены галактоза (37%) и манноза (18%). Кроме того, в гидролизате полисахарида (4 н. HCl, 100°) с помощью анализатора аминокислот был идентифицирован глюкозамин, его количество составило 22%. Дезаминирование гидролизата с последующей идентификацией галактозы, маннозы и 2,5-ангидроманнозы методом ГЖХ в виде полных ацетатов полиолов показало, что эти моносахариды входят в состав полисахарида в соотношении 2 : 1 : 1. *D*-Конфигурация галактозы была доказана окислением *D*-галактозооксидазой, *D*-конфигурация глюкозамина — по величине оптического вращения образца, выделенного из гидролизата с помощью хроматографии на бумаге. Манноза была измерена действием Na₂MoO₄ в разбавленной HCl по методике [8], и полученная при этом глюкоза была окислена *D*-глюкозооксидазой, что доказывало принадлежность маннозы также к *D*-ряду.

Для определения характера замещения моносахаридных остатков в цепи полисахарид был подвергнут метилированию в условиях Хакомори [9] и последующим метанолизу и ацетилированию; полученные ацетаты частично метилированных гликозидов исследовались методом хромато-масс-спектрометрии (колонка Б). При этом наряду с производными метилированных гексоз был идентифицирован 2-(*N*-метил)-ацетиамидо-2-дезоксид-4,6-*O*-метил-3-*O*-ацетил- α , β -метилглюкопиранозид, масс-спектр которого совпадал с описанным ранее спектром этого соединения [10]. Кроме того, метилированный полисахарид был превращен формолизом, гидролизом, восстановлением NaBD₄ и ацетилированием в смесь частично метилированных ацетатов полиолов. Методом хромато-масс-спектрометрии (колонка А) в смеси были идентифицированы (с использованием данных о фрагментации [11]) меченные дейтерием производные 2,3,6-три-*O*-метилманнозы, 2,3,6-три-*O*-метил-галактозы и 2-*O*-метил-галактозы. Для выяснения положения карбоксиэтилиденной группы на остатке галактозы метилированию был подвергнут полисахарид с частично снятым остатком пирувата (см. выше). При этом в смеси частично метилированных ацетатов полиолов наряду с моносахаридами, обнаруженными при анализе исходного полисахарида, было идентифицировано также производное 2,4,6-три-*O*-метил-галактозы*. Таким образом, из данных анализа методом метилирования следовало, что все моносахариды находятся в линейной полисахаридной цепи, остатки маннозы и галактозы имеют заместители в положении 4, а остаток глюкозамина и второй остаток галактозы — в положении 3, причем остаток пировиноградной кислоты присоединен к 3-замещенному остатку галактозы в положении 4 и 6.

Последовательность моносахаридных остатков в цепи была определена с помощью распада по Смуту нативного и *O*-дезацетилированного полисахаридов. При окислении исходного полисахарида периодатом натрия расщеплению подверглась только манноза, что заставляло предположить присутствие *O*-ацетильной группы в 3-м или 2-м положении остатка 4-замещенной галактозы. Окисленный полисахарид был восстановлен NaBH₄ и подвергнут мягкому кислотному гидролизу, что привело по данным гель-хроматографии на сефадексе G-15 практически к одному олигосахариду (I). В состав этого олигосахаридов входили два остатка галактозы, остаток глюкозамина и эритрит, идентифицированные методом ГЖХ после полного кислотного гидролиза и дезаминирования, а также пировиноградная кислота. Анализ олигосахаридов (I) методом метилирования

* Относительное содержание каждого из метилированных сахаров в смеси определить не удалось из-за неудовлетворительного разделения производных 2,3,6-три-*O*-метил-маннозы, 2,3,6- и 2,4,6-три-*O*-метил-галактозы при ГЖХ.

показал, что на его невосстанавливаемом конце находится остаток галактозы, который в полисахаридной цепи имеет заместитель в положении 4, тогда как остаток глюкозамина и остаток карбоксиэтилиденгалактозы замещены так же, как в исходном полисахариде.



Для выяснения взаимного расположения остатков глюкозамина и карбоксиэтилиденгалактозы распаду по Смитсу был подвергнут *O*-дезацетилованный полисахарид. При этом периодатному окислению подверглись остаток маннозы и один из остатков галактозы, что подтвердило предположение о наличии в исходном полисахариде *O*-ацетилованного остатка галактозы. Продуктом мягкого кислотного гидролиза окисленного *O*-дезацетилованного полисахарида оказался олигосахарид (2), который был выделен гель-хроматографией на сефадексе G-15. В состав олигосахарида (2) входили галактоза, глюкозамин и эритрит, а на его невосстанавливаемом конце находился остаток глюкозамина, что следовало из данных анализа олигосахарида методом метилирования.

Таким образом, олигосахариды (1) и (2) имеют строение, приведенное на схеме, и из их строения вытекает последовательность моносахаридных остатков в полисахариде.

Для определения конфигурации гликозидных связей нами был использован метод, основанный на окислении полностью ацетилованного полисахарида хромовым ангидридом в ледяной уксусной кислоте [12, 13]. Анализ окисленного полисахарида показал, что окислению подверглись остатки маннозы, глюкозамина и один из остатков галактозы, и, следовательно, они присоединены β -гликозидными связями. Для выяснения, какой из двух остатков галактозы разрушается при действии CrO_3 , окислению был подвергнут ацетилованный олигосахарид (2). При этом окислились оба составляющих его моносахарида. Следовательно, остаток кар-

боксияэтилиденгалактозы присоединен β -гликозидной связью, а связь остатка галактозы, несущего О-ацетильную группу, имеет α -конфигурацию. К сожалению, вывод о конфигурации гликозидных связей не удалось подтвердить данными ПМР-спектра полисахарида, поскольку область сигналов аномерных протонов в спектре (δ 4,5—5,5) представляла сложную для интерпретации картину.

Экспериментальная часть

Хроматографические методы. Восходящую хроматографию на бумаге FN-11 выполняли в системе бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3) при обнаружении сахаров щелочным раствором нитрата серебра. Гель-хроматографию проводили на колонках с сефадексом G-15 и G-50 в пиридин-ацетатном буфере с pH 4,5 (10 мл уксусной кислоты и 4 мл пиридина на 1 л воды), ионообменную хроматографию — на анализаторе углеводов Technicon SC-2 и на анализаторе аминокислот BC-200, ГЖХ — на приборе Pye Unicam, серия 104, на колонках с ECNSS-M (колонка А) и SE-30 (колонка Б). Хромато-масс-спектрометрию выполняли на приборе Varian MAT 111 Gnom с использованием колонки Б. Все условия методов описаны в работе [10].

Другие методы. ПМР-спектры снимали на приборе Varian XL-100 в D_2O при 90° с предварительной лиофилизацией раствора образца (50 мг) в 1 мл D_2O . ИК-спектры записывали на приборе UR-10 в прессовке с KBr. Электрофорез на бумаге проводили в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере с pH 4,5. Оптическое вращение определено на поляриметре Perkin-Elmer, модель 141, при 20° в воде. Растворы упаривали в вакууме при 40° . Серологические тесты выполняли по описанной ранее методике [14].

Выделение специфического полисахарида. Сухие клетки *Sh. dysenteriae* тип 9, штамм 9348, экстрагировали горячим 45% фенолом, нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном и ЛПС пересаждали спиртом из раствора NaCl по стандартной методике [6], выход ЛПС $\sim 4\%$ от веса сухих клеток. ЛПС (600 мг) нагревали 1,5 ч с 1% уксусной кислотой при 100° , осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизовали и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50, собирая фракцию, выходящую с холостым объемом колонки, выход полисахарида 200 мг, $[\alpha]_D^{+65}$ (с 0,5; вода).

Полисахарид (30 мг) нагревали в 3 мл воды с одной каплей триэтиламина (15 мин, 60°), диализовали против дистиллированной воды и получали О-дезацетилованный полисахарид. Другую порцию полисахарида (20 мг) нагревали в растворе 1% уксусной кислоты (100° , 6 ч) и после диализа получали полисахарид (16 мг) с частично снятой карбоксиэтиленовой группой.

Моносахаридный состав. Нейтральные сахара определяли в гидролизате полисахарида (2н. HCl, 4 ч, 100°) с помощью анализатора углеводов, аминокислота — в гидролизате (4 н. HCl, 4 ч, 100°) с помощью анализатора аминокислот. Одновременное определение аминокислот и нейтральных сахаров методом ГЖХ после дезаминирования гидролизата полисахарида и олигосахаридов проведено как описано ранее [15].

Полисахарид (15 мг) подвергали гидролизу (2н. HCl, 4 ч, 100°), гидролизат упаривали, остаток дважды упаривали с водой. Часть гидролизата окисляли D-галактозооксидазой (Sigma, ФРГ) и с помощью анализатора углеводов определяли исчезновение галактозы. Другую часть обрабатывали Na_2MoO_4 в условиях работы [8] и образовавшуюся глюкозу (степень изомеризации маннозы 30%) окисляли D-глюкозооксидазой. Из третьей части гидролизата хроматографией на бумаге выделяли хлоргидрат глюкозамина, $[\alpha]_D^{+59}$ (с 0,4; вода); лит. данные [16]: $[\alpha]_D^{+72}$.

Анализ методом метилирования. Метилирование полисахарида и олигосахаридов проводили иодистым метилом в присутствии метилсульфинил-

аниона [9]. Метилированный полисахарид очищали диализом, олигосахариды экстрагировали хлороформом. Формолиз проводили 85% муравьиной кислотой (100°, 3 ч), последующий гидролиз — 0,3 н. HCl и после восстановления NaBD₄ (6 ч, 20°) ацетилировали уксусным ангидридом в пиридине (100°, 15 мин) и исследовали методом ГЖХ на колонках А и Б. Метанолиз проводили 1% раствором HCl в метаноле, далее ацетилировали (100°, 2 ч) и исследовали на колонке Б.

Распад по Смитту. Специфический полисахарид (20 мг) окисляли 48 ч при 20° в темноте 3 мл 0,1 М раствора NaIO₄, к раствору добавляли 120 мг NaBH₄, через 2 ч подкисляли уксусной кислотой, деионизировали гелефильтрацией на колонке с сефадексом G-50, полученный окисленный полисахарид гидролизовали 3 сут при 20° 3 мл 0,5 н. HCl и геле-хроматографией на сефадексе G-15 выделяли олигосахарид (1), кислый по данным электрофореза на бумаге (E_{GlcUA} 0,46).

Аналогично из О-дезацетилированного полисахарида получали кислый олигосахарид (2) (E_{GlcUA} 0,58).

Определение конфигурации гликозидных связей было проведено методом окисления полностью ацетилированного полисахарида хромовым ангидридом в ледяной уксусной кислоте [12, 13] с последующим определением моносахаридного состава окисленного полисахарида методом ГЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L., Capek K. (1977) Eur. J. Biochem., 76, 433—440.
2. Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1977) Eur. J. Biochem., in press.
3. Дмитриев Б. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1977) Биоорганическая химия, 3, 1226—1233.
4. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Lvov V. L. (1977) Carbohydr. Res., 54, 253—259.
5. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Backinowsky L. V. (1976) Carbohydr. Res., 51, 229—237.
6. Westphal O., Jann K. (1965) Methods Carbohydr. Chem., 5, 83—91.
7. Choy Y. M., Dutton G. C. S. (1974) Can. J. Chem., 52, 684—687.
8. Bilik V. (1972) Chem. Zvesti, 26, 183—186.
9. Conrad H. E. (1972) Methods Carbohydr. Chem., 6, 361—364.
10. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1976) Eur. J. Biochem., 66, 559—566.
11. Björndal H., Lindberg B., Svensson S. (1967) Carbohydr. Res., 5, 433—440.
12. Angyal S. J., James K. (1970) Carbohydr. Res., 12, 124—131.
13. Hoffman J., Lindberg B., Svensson S. (1972) Carbohydr. Res., 26, 661—666.
14. Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1973) Eur. J. Biochem., 40, 355—359.
15. Дмитриев Б. А., Бакинковский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2335—2338.
16. Stanek J., Cerny M., Kocourek J., Pacak J. (1963) The Monosaccharides (Ernest J., Hebky J., eds.), p. 498, Prague.

Поступила в редакцию
24.VI.1977

BACTERIAL ANTIGENIC POLYSACCHARIDES. VII. THE STRUCTURE OF POLYSACCHARIDE CHAIN OF THE *SHIGELLA DYSENTERIAE* TYPE 9 LIPOPOLYSACCHARIDE

DMITRIEV B. A., KNIREL Yu. A., VINOGRADOV E. V.,
KOCHETKOV N. K., HOFMAN I. L.

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the RSFSR, Moscow

A specific acidic polysaccharide was isolated from *Sh. dysenteriae* type 9 O-antigenic lipopolysaccharide after mild acid hydrolysis followed by chromatography on Sephadex G-50. The polysaccharide consists of D-galactose, D-mannose and 2-acetamido-2-

deoxy-*D*-glucose residues in a 2 : 1 : 1 ratio. Besides, pyruvic acid residue attached by ketal-type linkage, as well as O-acetyl group were found to be the constituents of the oligosaccharide repeating unit. On the basis of methylation analyses of the native polysaccharide and that with partially removed pyruvic acid residues, from the results of Smith degradation of the native and O-deacetylated polysaccharides, as well as from determination of linkage configuration by chromium anhydride oxidation, the specific hexosaminoglycan was assigned the following repeating structure

