



mom4 * № 6 * 1978

УДК 547.458.02 + 577.11

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

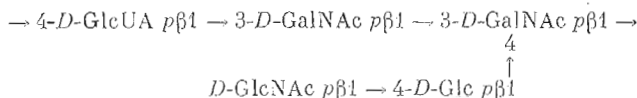
8*. СТРУКТУРА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA DYSENTERIAE* ТИП 8

Дмитриев В. А., Львов В. Л., Рамос Э. Л.,
Кочетков Н. К., Гофман И. Л.

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

Институт эпидемиологии и микробиологии,
Минздрав РСФСР, Москва

При расщеплении антигенного липополисахарида *Shigella dysenteriae* тип 8 с последующим фракционированием углеводного компонента на сефадексе G-50 получен специфический полисахарид, построенный из остатков 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозы, 2-ацетамидо-2-дезоксигалактозы, *D*-глюкуроновой кислоты и *D*-глюкозы в соотношении 1 : 2 : 1 : 1. На основании данных метилирования, частичного гидролиза, распада по Смиту и расщепления с помощью метода *N*-деацетилирования-дезаминирования повторяющемуся звену специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 8 приписано строение разветвленного пентасахарида



Конфигурация гликозидных связей определена методом окисления хромовым ангидридом и подтверждена данными ПМР. Обсуждаются серологические свойства липополисахаридов бактерий *Sh. dysenteriae* в связи с химическим строением их специфических полисахаридных цепей.

В предыдущих сообщениях [1—4] были приведены данные о структуре полисахаридных цепей термостабильного [2] и термолабильных [1, 3, 4] соматических антигенов *Shigella dysenteriae* и обсуждались серологические свойства антигенов с нейтральными и кислыми полисахаридными цепями.

В настоящей работе установлено строение специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 8, соматический антиген которого термолabileн. Липополисахарид (ЛПС) *Sh. dysenteriae* тип 8 был выделен из сухих бактериальных клеток по стандартной методике [5] экстракцией горячим водным фенолом. ЛПС ингибировал реакцию пассивной гемагглютинации с антисыворотками против живой, гретой и автоклавированной культур в дозах 0,48; 1,96 и 1,95 мкг/мл соответственно и, таким образом, являлся типовым О-антигеном. ЛПС расщепляли разбавленной CH_3COOH при нагревании, осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант хроматографировали на сефадексе G-50 и получили высокомолекулярный полисахарид и олигосахаридную фракцию. Полисахарид ингибировал

* Сообщение 7 см. [1].

реакцию пассивной гемагглютинации с антисывороткой к живой культуре в дозе 3,9 мкг/мл и, следовательно, являлся типоспецифическим, но был неактивен в реакции с антисыворотками против гретых и автоклавируемых клеток. Олигосахаридная фракция («кор» и продукты расщепления специфического полисахарида) оказалась серологически неактивной и далее не исследовалась.

По данным электрофореза на бумаге и хроматографии на DEAE-целлюлозе в градиенте NaCl, полисахарид был индивидуальным, а по своей химической природе кислым, $[\alpha]_D + 46^\circ$ (с 1,0; вода). В его ИК-спектре имелись полосы поглощения ацетамидной (1650, 1570 см⁻¹) и карбоксильной (1740 см⁻¹) групп. В спектре ПМР полисахарида присутствовали сигналы N-ацетильных групп (δ 1,98 м.д., 6H; 2,02 м.д., 3H) и пяти аномерных протонов (δ 4,35—4,70 м.д., 4H; 4,88 м.д., 1H).

В гидролизате полисахарида с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов, хроматографии и электрофореза на бумаге были идентифицированы глюкуроновая кислота, глюкоза, глюкозамин, галактозамин и небольшое количество галактозы. Количественное содержание идентифицированных моносахаридов приведено в таблице. Кроме того, в гидролизате (2 н. HCl, 3 ч, 100°) содержался компонент (дисахарид (1)) с R_{Glc} 0,23 (A), который при электрофорезе на бумаге в буфере с pH 4,5 оставался на старте, а в буфере с pH 9,5 двигался к катоду (E_{GlcUA} 0,85) и обнаруживался щелочным нитратом серебра и нингидрином. Дисахарид (1), выделенный с помощью препаративного электрофореза на бумаге, оставался неизменным в условиях гидролиза (2 н. HCl, 3 ч, 100°), а в более жестких условиях (6 н. HCl, 8 ч, 100°) высвобождал галактозамин. Определение содержания уроновой кислоты [6] и галактозамина с помощью аминокислотного анализатора показало, что глюкуроновая кислота и галактозамин входят в состав дисахарида в эквимольном соотношении, причем восстанавливающим концом является галактозамин, так как он исчезал после окисления олигосахарида бромом [7]. Таким образом, дисахарид (1) представлял собой биоуроновую кислоту — глюкуронил-галактозамин.

Абсолютная конфигурация моносахаридов, входящих в состав полисахарида, была определена следующим образом: D-глюкозамин и D-галактозамин были выделены из гидролизата препаративной хроматографией на бумаге в системе Б и идентифицированы по величине оптического вращения, D-конфигурация глюкуроновой кислоты и глюкозы следовала из идентификации D-глюкозы в гидролизате восстановленного по карбоксильным группам полисахарида [3] с помощью D-глюкозооксидазы [8].

Из приведенных выше данных следовало, что повторяющимся звеном полисахарида является пентасахарид, построенный из остатков D-глюкозы, 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы, 2-ацетамидо-2-дезоксид-галактозы и D-глюкуроновой кислоты в соотношении 1 : 1 : 2 : 1.

Определение содержания глюкозы и аminosахаров в гидролизате восстановленного по карбоксильным группам полисахарида методом ГЖХ [9] после дезаминирования, восстановления и ацетилирования дало результаты, согласующиеся с данными по моносахаридному составу кислого полисахарида (см. таблицу). Для выяснения характера замещения моносахаридных остатков полисахарид был подвергнут метилированию с последующей идентификацией частично метилированных сахаров методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Часть метилированного полисахарида гидролизовали и после восстановления и ацетилирования идентифицировали 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метилсорбит. Следовательно, остаток глюкозы в полисахариде замещен в положение 4.

Количественный состав
полисахаридов, %

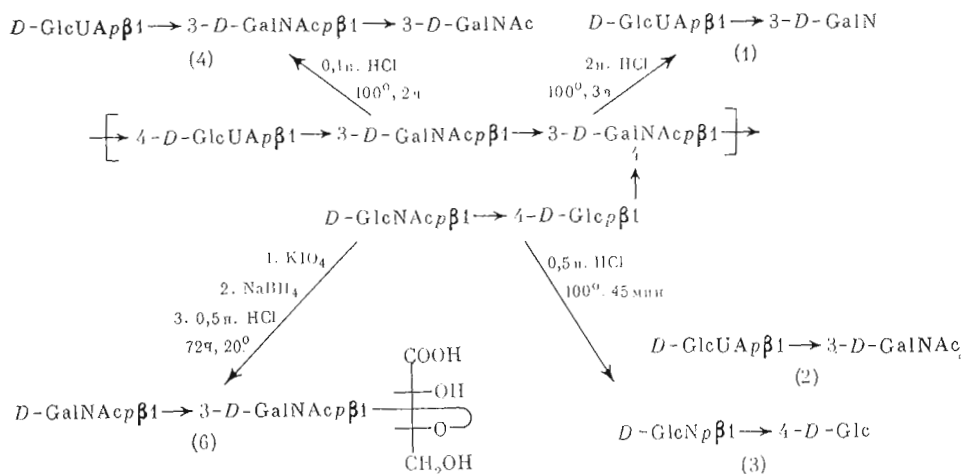
Полисахарид	GlcUA	Glc	GlcN	GalN
Кислый	14	16	13,5	24
Нейтральный	1	31	14	25

Частично метилированные производные глюкозамина и галактозамина были идентифицированы в виде соответствующих гликозидов, полученных из метилированного полисахарида с помощью метанолиза и ацетилирования. Анализ показал наличие 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксиглюкопиранозид-3,4,6-три-O-ацетил- α,β -метилглюкопиранозид, 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксигалактопиранозид и 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксигалактопиранозид-3,4-ди-O-ацетил-6-O-метил- α,β -метилгалактопиранозид, масс-спектры которых совпали со спектрами, описанными нами при установлении строения специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 2 [10].

Для установления характера замещения остатка глюкуроновой кислоты часть метанолизата метилированного полисахарида восстанавливали LiAlH_4 для превращения метилового эфира частично метилированного метилглюкуронида в соответствующий метилглюкозид. Смесь после восстановления гидролизовали и исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии в виде ацетатов полиолов. При этом были обнаружены 1,4,5-три-O-ацетил-2,3,6-три-O-метилсорбит, соответствующий остатку 4-замещенной глюкозы, и 1,4,5,6-тетра-O-ацетил-2,3-ди-O-метилсорбит, который соответствовал остатку глюкуроновой кислоты. Таким образом, глюкуроновая кислота замещена в полисахариде в положение 4. Из данных метилирования следовало, что полисахарид является разветвленным, причем в узле разветвления находится один из остатков N-ацетилгалактозамина, а на концах боковых цепей — остаток N-ацетилглюкозамина.

Для выяснения последовательности моносахаридных остатков в полисахаридной цепи был применен частичный гидролиз (0,5 н. HCl). Из гидролизата с помощью препаративного электрофореза были выделены два индивидуальных олигосахарида (схема 1).

Схема 1



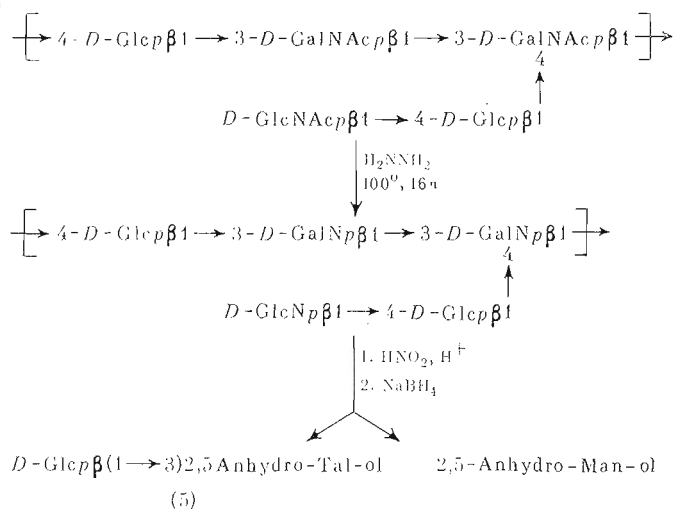
Кислый олигосахарид (2) был идентифицирован как глюкуронопиранозил-N-ацетилгалактозамин, так как при гидролизе 2 н. HCl практически полностью превращался в дисахарид (1). Основной олигосахарид (3) представлял собой 4-O-(2-амино-2-дезоксиглюкопиранозил)-D-глюкозу и давал при расщеплении азотистой кислотой 2,5-ангидроманнозу и глюкозу в соотношении 1 : 1, идентифицированные с помощью ГЖХ в виде полных ацетатов полиолов. Из результатов частичного гидролиза следовало, что боковая цепь полисахарида представлена по меньшей мере двумя моносахаридами: N-ацетилглюкозамином и глюкозой.

Применение более мягких условий гидролиза (0,1 н. HCl) привело параллельно с дисахаридом (1) к кислому олигосахариду (4) (см. схему 1). В гидролизате олигосахарида (4) с использованием аминокислотного анализатора

были идентифицированы эквимольные количества галактозамина и кислого дисахарида (4). Следовательно, в состав олигосахарида (4) входят остаток глюкуроновой кислоты и два остатка N-ацетилгалактозамина. Трисахарид (4) был обработан водным раствором брома, что привело к окислению остатка N-ацетилгалактозамина, расположенного на восстанавливаемом конце трисахарида. Окисленный трисахарид (4) был затем подвергнут периодатному окислению. При этом оказалось, что периодатное окисление не затрагивает второй остаток N-ацетилгалактозамина. Из этих данных следовало, что, во-первых, трисахарид (4) имеет линейную структуру GlcUA-GalNAc-GalNAc и, во-вторых, оба остатка N-ацетилгалактозамина расположены в главной полисахаридной цепи.

Информация о месте присоединения боковой цепи была получена при избирательном расщеплении полисахарида по гексозаминидным связям с использованием метода N-деацетилирования-деаминирования [11]. N-Деацетилирование восстановленного по карбоксильным группам полисахарида гидразином в присутствии гидразинсульфата прошло практически количественно и привело к полисахариду со свободными аминогруппами, движущемуся при электрофорезе на бумаге к аноду в виде одной зоны. При деаминировании полученного модифицированного полисахарида азотистой кислотой происходила полная деполимеризация полисахаридной цепи и образовались два компонента, которые после восстановления боргидридом натрия были выделены хроматографией на бумаге.

Схема 2



Более подвижный компонент оказался 2,5-ангидромагнитом и соответствовал в полисахариде остатку глюкозамина, расположенному на концах боковых цепей. Менее подвижный компонент представлял собой глюкопиранозил-2,5-ангидроталит (5), так как давал при кислотном гидролизе эквимольные количества 2,5-ангидроталита и глюкозы. Из результатов избирательного расщепления N-деацетилированного полисахарида по местам остатков гексозаминов следовало, что местом разветвления полисахаридной цепи является остаток галактозамина, присоединенный в полисахариде к уроновой кислоте.

Для выяснения характера замещения остатка N-ацетилгалактозамина, к которому присоединяется боковая цепь, был применен распад по Смитсу. Из данных метилирования следовало, что окислению должны подвергаться остатки N-ацетилглюкозамина, глюкозы и глюкуроновой кислоты. Полисахарид был окислен периодатом натрия и восстановлен боргидридом натрия. Окисленный полимер был выделен гель-хроматографией на сефа-

декс G-50 и подвергнут мягкому кислотному гидролизу. Полученный таким образом олигосахарид (6) (см. схему 1) был очищен гель-хроматографией на сефадексе G-15. В гидролизате олигосахарид (6) методом электрофореза на бумаге и ионообменной хроматографии были идентифицированы эритроновая кислота и галактозамин. Метилирование олигосахарид (6) с последующим метанолизом и ацелированием привело к идентификации методом ГЖХ-масс-спектрометрии 2-(N-метил)ацетиамидо-2-дезоксигалактозил-4,6-ди-O-метил- α , β -метилгалактопиранозид и 2-(N-метил)ацетиамидо-2-дезоксигалактозил-3,4,6-три-O-метил- α , β -метилгалактопиранозид. Из этих данных следовало, что олигосахарид (6) имеет структуру, приведенную на схеме 1, и, таким образом, остаток N-ацетилгалактозамина, расположенный в точке разветвления, замещен в главной цепи в положение 3, а боковая цепь присоединена в положение 4.

Для определения конфигурации гликозидных связей был использован метод окисления ацелированных гликозидов хромовым ангидридом [12, 13]. При обработке хромовым ангидридом ацетата восстановленного полисахарида оказалось, что все моносахаридные остатки окисляются и, следовательно, связаны в полисахариде β -гликозидными связями. Этот вывод подтверждается данными спектра ПМР восстановленного полисахарида, в котором сигналы всех пяти аномерных протонов лежат в области 4,8—4,35 м.д. [14].

Таким образом, на основании всех приведенных выше данных повторяющемуся звену специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 8 может быть приписана структура кислого разветвленного пентасахарид, представленная на схеме 1.

Отличительной чертой строения повторяющегося звена специфической полисахаридной цепи ЛПС из *Sh. dysenteriae* тип 8 является наличие в нем сразу трех остатков гексозаминов. Такое высокое содержание аминсахаров, не характерное для O-специфических гексозаминогликанов грамотрицательных бактерий [15], наблюдалось нами ранее лишь в случае специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 2 [10].

В предыдущих сообщениях [1—4] отмечалось, что специфические полисахариды соматических антигенов *Sh. dysenteriae* в соответствии со своей химической природой образуют две группы — кислую и нейтральную. Все изученные до сих пор ЛПС *Sh. dysenteriae*, специфические полисахариды которых были кислыми, являлись термолабильными и напоминали K-антигены B-типа. Результаты настоящей работы подтверждают это наблюдение.

Экспериментальная часть

Общие методы. Специфический ЛПС получен из сухих бактериальных клеток *Sh. dysenteriae* тип 8, штамм 599, экстракцией водным фенолом по стандартной методике [5]. Получение и выделение специфического полисахарида, его характеристика физико-химическими методами, восстановление полисахарида по карбоксильным группам, определение моносахаридного состава, исследование методом метилирования, периодатного окисления и окисления хромовым ангидридом, а также серологические тесты выполнены как описано в работах [3, 16]. Количественное определение сахаров осуществлено по стандартным методикам: глюконовой кислоты по реакции с карбазолом и серной кислотой [6], D-глюкозы — по реакции с D-глюкозооксидазой [8]. Хроматографию на бумаге проводили в системах бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (А), и этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 18 : 4 : 1 : 3 (Б).

Определение характера замещения остатка глюконовой кислоты. 5 мг полисахарида метилировали по Хакамори [17], диализовали 3 сут против дистиллированной воды, упаривали, сушили. Остаток подвергали метанолизу 1 н. HCl в метаноле при 100° в течение 20 ч, метанолизат упаривали, растворяли в 5 мл абс. эфира, прибавляли 30 мг LiAlH₄ и получен-

ную смесь кипятили 8 ч, разлагали этилацетатом, а затем водой. Осадок гидроокисей отделяли центрифугированием, супернатант экстрагировали хлороформом, объединенные экстракты упаривали, остаток гидролизovali 0,5 н. HCl при 100° в течение 16 ч, восстанавливали боргидридом натрия и после ацетилирования исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии.

Распад по Смуту. 50 мг полисахарида окисляли 0,1 н. раствором периодата натрия (5 мл) в течение 60 ч в темноте, затем к раствору прибавляли 100 мг боргидрида натрия, через 16 ч реакционную смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 5 и фракционировали на колонке с сефадексом G-50. Фракции, выходящие со свободным объемом колонки, объединяли и после лиофилизации получали 40 мг окисленного полисахарида, который далее обрабатывали 72 ч при комнатной температуре 10 мл 0,5 н. раствора HCl. Гидролизат лиофилизovali, остаток хроматографировали на сефадексе G-15 (130×1,8 см), собирая фракции по 5 мл. Фракции, соответствующие олигосахаридным компонентам, объединяли и упаривали. Выделенный таким образом олигосахарид (6) был индивидуален по данным электрофореза (E_{GlcUA} 0,5) и хроматографии на бумаге (R_{GlcUA} 0,34). Перед метилированием олигосахарид (6) обрабатывали 0,5 М раствором триэтиламина в 50% водном метаноле (1 ч, комнатная температура), чтобы предотвратить возможность образования лактона эритроновой кислоты.

Избирательное расщепление восстановленного полисахарида методом N-деацетилирования-деаминирования (схема 2). 50 мг восстановленного полисахарида растворяли в 1 мл безводного гидразина, к раствору прибавляли 100 мг гидразинсульфата и полученную смесь нагревали 16 ч при 100° в запаянной ампуле. После окончания реакции содержимое ампулы упаривали, остаток подвергали гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-50 и получали 45 мг N-деацетилированного полисахарида, имеющего электрофоретическую подвижность 0,75 относительно глюкозамина. Модифицированный полисахарид растворяли в 0,6 мл воды, обрабатывали 40 мин 1 мл 33%-ного раствора уксусной кислоты и 1 мл 5%-ного раствора нитрита натрия при 20°, затем смесь перемешивали с 3 мл катионита КУ-2 (H⁺), отфильтровывали, фильтрат лиофилизovali, растворяли 1 мл воды, обрабатывали 16 ч 20 мг боргидрида натрия и после обычной обработки получали смесь гликозилполиолов, которую подвергали разделению с помощью препаративной хроматографии на бумаге в системе Б. Выделенные компоненты имели подвижность 2,1 и 0,9 относительно лактозы.

Частичный гидролиз полисахарида. 40 мг специфического полисахарида гидролизovali 45 мин 10 мл 0,5 н. HCl при 100°, остаток после упаривания сушили в вакууме над гидроокисью натрия и подвергали разделению с помощью препаративного электрофореза в пиридин-ацетатном буфере (pH 5,4). Выделенный таким образом кислый олигосахарид (2) имел при электрофорезе E_{GlcUA} 0,85, а основной олигосахарид (3) имел подвижность 0,80 относительно глюкозамина.

При использовании более мягких условий гидролиза (0,1 н. HCl, 100°, 2 ч) был выделен кислый трисахарид (4), который имел при электрофорезе E_{GlcUA} 0,65.

Установление строения трисахарида (4). К раствору олигосахарида (4) в 10 мл воды прибавляли 0,1 мл брома и 30 мг BaCO₃, полученную суспензию перемешивали 20 ч в темноте при 20°, избыток брома отгоняли током азота, раствор лиофилизovali. Остаток растворяли в 2 мл воды, к аликвоте этого раствора (1 мл) прибавляли 21,4 мг периодата калия, через 72 ч реакционную смесь обрабатывали 30 мг NaBH₄, через 16 ч избыток восстановителя разрушали прибавлением CH₃COOH, полученный раствор упаривали, остаток несколько раз упаривали с метанолом для удаления H₃BO₃. Образцы олигосахарида (4) (после обработки бромом) до и после периодатного окисления подвергали кислотному гидролизу 6 н. HCl при 100° в течение 8 ч и исследовали с помощью аминокислотного анализатора.

ЛИТЕРАТУРА

- Поступила в редакцию:
4.I.1978

DMITRIEV B. A., L'VOV V. L., RAMOS E. L.,
KOCHEKOV N. K., HOFMAN I. L.

On mild acid hydrolysis of lipopolysaccharide from *Shigella dysenteriae* type 8, followed by fractionation of the «degraded polysaccharide» on Sephadex G-50 column, a specific polysaccharide was obtained. It consists of *D*-glucuronic acid, *D*-galactose, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose and 2-acetamido-2-deoxy-*D*-galactose in 1:1:1:2 ratio. On the basis of methylation analysis data, partial hydrolysis, Smith degradation, and selective cleavage of glycosidic linkages by *N*-deacetylation-deamination, the polysaccharide repeating unit was concluded to have the following structure:

