



УДК 577.114.5 : 543.422.23 : 579.842.15

© 1991 г.

*Б. А. Дмитриев, Е. В. Лапина, Е. А. Мурашко***ОБНАРУЖЕНИЕ ДВУХ ТИПОВ СТРУКТУР ВНУТРЕННЕГО КОРА  
В ЛИПОПОЛИСАХАРИДАХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ  
С ПОМОЩЬЮ ХРОМОФОРНОЙ МЕТКИ***Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва*

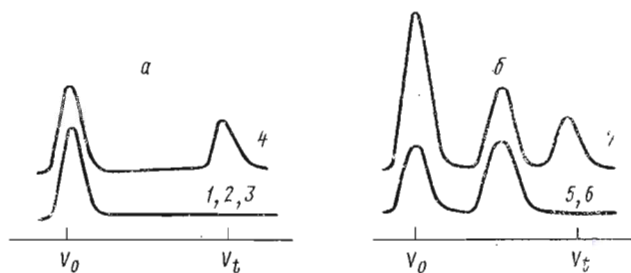
С помощью техники хромофорной метки в молекулах липополисахаридов грамотрицательных бактерий обнаружены два типа структур внутреннего олигосахаридного кора, различающиеся по содержанию аминокомпонентов со свободной аминогруппой.

Как известно [1], липополисахариды (ЛПС) грамотрицательных бактерий построены из трех структурных блоков: липида А, внутреннего олигосахаридного кора и внешней О-специфической полисахаридной цепи. Заключительной стадией биосинтеза молекул ЛПС является ферментативный перенос О-специфической цепи на внутренний кор, присоединенный к липиду А [2]. Однако в любом полноценном препарате ЛПС всегда имеется значительное количество (более 50%) свободных олигосахаридных цепей внутреннего кора, к которым О-специфические полисахаридные цепи не присоединены. Принято считать, что причина неполного биосинтеза заключается в недостроенности внутреннего кора, однако, в чем она конкретно состоит, остается неясным.

Поскольку в состав кора наряду с фосфатами и пиррофосфатами могут входить компоненты, содержащие свободную аминогруппу [3], мы исследовали их наличие в достроенных и недостроенных молекулах ЛПС с помощью хромофорного зонда, специфически взаимодействующего с аминогруппой. Из большого количества известных хромофорных и люминесцентных зондов [4] мы остановили свой выбор на 2,4-динитрофенильной группе (Dnp), поскольку реакция 2,4-динитрофторбензола с ЛПС протекает количественно [5], а описанные в литературе многочисленные Dnp-производные аминокислот и аминокислот устойчивы в условиях жесткого кислотного гидролиза и обладают хорошими хроматографическими характеристиками, а также дают молекулярные ионы при масс-спектрометрии под электронным ударом [6].

Действительно, при взаимодействии взятых нами образцов ЛПС с динитрофторбензолом в присутствии триэтиламина были получены с количественными выходами соответствующие окрашенные в яркий желтый цвет Dnp-производные, которые были подвергнуты стандартной процедуре деградации (1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 100° С, 2 ч), широко применяемой в химии ЛПС. Такая деградация Dnp-ЛПС во всех случаях приводила к образованию нерастворимого осадка липида А и так называемого деградированного полисахарида, содержащего хромофорные Dnp-группы. Гель-хроматография окрашенной углеводной фракции на колонке с сефадексом G-25 в 0,2 М пиридин-ацетатном буфере с рН 5,4 при длине волны детектирования  $\lambda_{\text{Dnp}} = 365 \text{ нм}$  выявила два типа элюционных кривых. Первый тип (рисунок, а) содержал только пик полисахарида, тогда как второй (рисунок, б) — дополнительно олигосахаридную фракцию (наличие низкомолекулярной фракции будет обсуждено ниже).

Сразу следует отметить, что олигосахаридная фракция как таковая присутствует всегда (данные реакции с фенолом и серной кислотой на об-



Элюционные кривые «деградированных полисахаридов» из Дпр-ЛПС, записанные при 365 нм. Номера кривых соответствуют номерам препаратов ЛПС, приведенных в таблице

щие сахара), но в первом случае она избежала детектирования, так как не несла хромофорной группы. Наличие в обоих типах элюционных кривых умеренного по интенсивности пика полисахарида указывало на то, что полисахаридная фракция аминирована именно по олигосахаридному кору, соединенному с О-специфической цепью, так как в случае наличия аминогрупп в составе повторяющихся звеньев О-специфической цепи интенсивность полисахаридного пика резко возрастает (рисунок, б, кривая 7). Кроме того, структуры О-специфических полисахаридов исследуемых нами ЛПС были установлены ранее и заведомо не содержали (кроме *Pr. mirabilis*) заместителей со свободной аминогруппой.

Таким образом, из данных гель-хроматографии следовало, что различие в структурах олигосахаридного кора в препарате ЛПС, выделенного из одного штамма, в зависимости от достроенности молекул ЛПС реально существует и обусловлено, в частности, различным содержанием компонентов со свободной аминогруппой. Далее, достоверность сделанного наблюдения была подтверждена данными по идентификации Дпр-аминов, высвобожденных из соответствующих окрашенных фракций после их дефосфорилирования 50 %-ной фтористоводородной кислотой и полного кислотного гидролиза. Идентификация проводилась методом ТСХ на силикагеле сравнением с заведомыми образцами соответствующих Дпр-производных.

Обнаружение остатка глюкозамина со свободной аминогруппой в полисахаридной фракции из *Sh. boydii* (таблица) при полном его отсутствия в олигосахаридной фракции (имеются в виду структуры: О-цепь — кор и свободный кор) подтверждает вывод о возможной роли аминокомпонентов в формировании различия в структурах олигосахаридного кора. Более того, в литературе описан случай исключения из структуры внутреннего кора остатка незамещенного глюкозамина при спонтанной S → R-мутации бактерии *Sh. sonnei* из фазы 1, ЛПС которой имеет О-специфический полисахарид, в фазу 2, ЛПС которой имеет только свободный кор [7]. Тем не менее не исключено, что различие в структурах олигосахаридного кора может быть обусловлено и другими компонентами, как, например,

#### Локализация аминокомпонентов в молекулах ЛПС в виде Дпр-производных

Номер препарата	Препараты ЛПС из микроорганизмов	Дпр-компоненты окрашенных фракций из Дпр-ЛПС		
		Полисахарид		Олигосахарид (свободный кор)
		О-цепь	Кор	
1	<i>Shigella boydii</i> , type 12	—	GlcN	—
2	<i>E. coli</i> 0114	—	EA-P*	—
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , immunotype 2	—	EA-P	—
4 <sub>b</sub>	<i>Salmonella typhi</i>	—	EA-P	—
5	<i>Sh. boydii</i> , type 10	—	GlcN	EA-P
6	<i>S. anatum</i>	—	EA-P	EA-P
7	<i>Proteus mirabilis</i> 027	Lys	EA-P	EA-P

\* EA-P — фосфорилэтаноламин.

в случае *S. anatum* и *Pr. mirabilis* 027 (рисунок, кривые 6 и 7), где фосфорилэтаноламин присутствует как в полисахаридной, так и в олигосахаридной фракциях.

Для полноты приведенных данных следует отметить, что пик низкомолекулярной фракции в элюиционных кривых обоих типов наблюдался в случае ЛПС, в липиде А которых заведомо имелся аминокомпонент, присоединенный лабильной гликозил-фосфатной связью [8]. Этот компонент был идентифицирован нами как 4-амино-4-дезоксисарабиноза (данные будут опубликованы отдельно), являющаяся компонентом липида А ряда бактерий.

### Экспериментальная часть

Выбор препаратов ЛПС специально не проводился, и в работе использованы образцы, оставшиеся после структурных исследований О-специфических полисахаридов. Препараты ЛПС выделены из соответствующих сухих бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом [9] и охарактеризованы данными электрофореза в полиакриламидном геле с обнаружением зон веществ на электрофореграммах азотнокислым серебром [10].

*Днр-производные* ЛПС получали по методике [5] с использованием в качестве основания триэтилamina, причем реакция протекала количественно (данные аминокислотного анализа гидролизата образца до и после динитрофенилирования).

Гель-хроматография на колонке (2 × 40 см) с сефадексом G-25sf выполнена в 0,2 М пиридин-ацетатном буфере с pH 5,4 при скорости элюирования 20 мл/ч и  $\lambda$  365 нм (Holochrome, Gilson). Соответствующие окрашенные фракции были лиофилизированы.

*Высвобождение Днр-аминов* проводили в две стадии. Первоначально окрашенный материал дефосфорилировали 50% HF (1 мл) в закрытой полиэтиленовой пробирке (4° С, 24 ч) и упаривали в токе воздуха. Остаток обрабатывали 0,2 мл 75% спирта и анализировали методом ТСХ в системе А. При наличии на пластинке неподвижных зон содержимое пробирки упаривали и остаток гидролизали 0,5 мл 2 М соляной кислоты (100° С, 3 ч). Гидролизат упаривали несколько раз с водой и анализировали в системе Б. ТСХ выполнена на пластинках Silufol (Kavalier, Чехо-Словакия), причем желтые Днр-производные хорошо видны непосредственно. Заведомые образцы Днр-производных, упомянутые в таблице, получены с помощью синтеза по описанным методикам. Системы растворителей: хлороформ — ацетон, 1 : 1 (А), *n*-пропанол — конц. NH<sub>4</sub>OH, 7 : 3 (Б).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilkinson S. G. // Surface carbohydrates of the prokaryotic cell // Ed. Sutherland I. W., N. Y.: Acad. Press, 1977. P. 97—176.
2. Mäkelä P. H., Stocker B. A. D. // Chemistry of Endotoxin // Ed. Rietschel E. Th. Elsevier. 1984. P. 59—137.
3. Lüderitz O., Galanos C., Rietschel E. Th. // Pharmac. Ther. 1982. V. 15. P. 383—402.
4. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. // Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран // Ред. Овчинников Ю. А. М.: Наука, 1980. С. 1—320.
5. Gromska W., Mayer H. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 62. P. 391—399.
6. Усов А. И., Крылова Р. Г., Рябовская С. Н., Каденцев В. Н., Чижов О. С. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1973. № 12. С. 2780—2783.
7. Gamian A., Romanowska E. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 129. P. 105—109.
8. Mayer H., Bhat U. R., Masoud H., Radziewska-Lebrecht J., Widemann C., Krauss J. H. // Pure Appl. Chem. 1986. V. 6. P. 1277—1288.
9. Westphal O., Jann K. // Method in carbohydrate chemistry. V. 5 / Ed. Whister R. L. Acad. Press, 1965. P. 83—91.
10. Tsai C. M., Frash C. E. // Anal. Biochem. 1982. V. 119. P. 115—119.

Поступила в редакцию  
5.VII.1990

B. A. DMITRIEV, E. B. LAPINA, E. A. MURASHKO

**DETECTION OF TWO TYPES OF THE INTERNAL CORE STRUCTURES  
IN THE LIPOPOLYSACCHARIDE MOLECULES OF GRAM-NEGATIVE  
BACTERIA WITH THE USE OF CHROMOPHORE LABELLING**

*N. F. Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology,  
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

In lipopolysaccharide molecules of Gram-negative bacteria, two types of the internal core structures differing in content of substituents with free amino group were discovered by means of the chromophore labelling technique.