



УДК 547.455.6'472.3

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

V. СТРУКТУРА O-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПОЛИСАХАРИДНОЙ ЦЕПИ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA DYSENTERIAE* ТИП 10Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Шеремет О. К.,
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 мягком кислотном гидролизе антигенного липополисахарида *Shigella dysenteriae* тип 10 с последующим фракционированием «деградированного полисахарида» на сефадексе G-50 получен O-специфический полисахарид, в состав которого в эквимолекулярных количествах входят D-манноза, L-рамноза, 2-ацетиламино-2-дезоксид-D-манноза и 2-ацетиламино-2-дезоксид-D-глюкоза. Из данных метилирования следовало, что специфический полисахарид имеет неразветвленную цепь и что все моносахаридные остатки находятся в пиранозной форме, причем рамноза и N-ацетилманнозамин замещены в положение 3, манноза — в положение 2 и N-ацетилглюкозамин — в положение 4. Последовательность моносахаридных остатков в цепи вытекала из строения олигосахаридов, полученных из полисахарида в результате двух распадов по Смитту. Конфигурации гликозидных связей определены с помощью окисления ацетилированного полисахарида хромовым ангидридом. На основании приведенных данных повторяющемуся звену специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10 приписана структура линейного тетрасахарида

→ 2) -β-D-Manp (1 → 3)-α-D-ManNAcp (1 → 3)-β-L-Rhap (1 → 4)-α-D-GlcNAcp (1 →
Обсуждаются серологические свойства антигенов бактерий *Sh. dysenteriae* в свете химического строения их специфических полисахаридов.

В предыдущем сообщении [1] были приведены данные о полной структуре специфического полисахарида *Shigella dysenteriae* тип 3, в состав которого входил новый кислый моносахарид — глюколактиловая кислота [2]. Иммунологическая специфичность бактерий рода *Shigella* ввиду отсутствия капсульных и жгутиковых антигенов определяется главным образом соматическим антигеном (O-антиген), который по своей химической природе является липополисахаридом (ЛПС) и образует вместе с белком внешний слой наружной мембраны бактериальной клетки. Иммуноспецифический участок такого антигена — построенная из повторяющихся олигосахаридных звеньев полисахаридная цепь — непосредственно присоединяется к внутреннему олигосахаридному ядру, который в свою очередь ковалентно связан с липидом [3].

В ходе изучения O-антигенов бактерий подгруппы *Sh. dysenteriae*, состоящей из 10 серологически неродственных типов, было показано, что специфические полисахаридные цепи этих антигенов представляют собой гексозаминогликаны, значительно различающиеся по моносахаридному составу [4]. Эти данные стали химическим обоснованием отсутствия перекрестных реакций между всеми 10 серотипами [5].

В соответствии с химическими свойствами специфических полисахаридов О-антигена бактерий *Sh. dysenteriae* могут быть разделены на две группы — кислую и нейтральную [6]. Оказалось, что антигены первой группы термолabileны и по серологическим свойствам напоминают кислые капсулярные антигены типа В, тогда как антигены второй группы термостабильны и являются в этом смысле классическими О-антигенами.

В настоящей работе приводятся данные по установлению строения О-специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10, соматический антиген которого термостабилен.

Липополисахарид *Sh. dysenteriae* тип 10 был выделен из сухих бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом с последующим осаждением нуклеиновых кислот цетавлоном [7]. Высокая типоспецифическая активность О-антигена была подтверждена реакциями пассивной гемагглютинации (титр антисыворотки 51 200) и ингибирования пассивной гемагглютинации (минимальная активная доза 0,03 мкг/мл). Нагреванием с 1% уксусной кислотой липополисахарид был расщеплен на «деградированный полисахарид» и липид. Гель-хроматография углеводной фракции на сефадексе G-50 дала высокомолекулярный полисахарид, элюирующийся с холостым объемом колонки, и олигосахаридную фракцию (кор), которая была серологически неактивна и далее не исследовалась. Полученный полисахарид ингибировал агглютинацию эритроцитов, сенсibilизированных липополисахаридом, в реакции с антисывороткой к живой культуре в дозе 7,9 мкг/мл. Из данных серологических тестов следовало, что выделенный полисахарид обуславливает типовую специфичность клеток *Sh. dysenteriae* тип 10.

Полисахарид был нейтральным по данным электрофореза на бумаге и имел $[\alpha]_D^{20} +98,6^\circ$. В его ИК-спектре присутствовали полосы поглощения амидной (1655, 1560 см^{-1}) и гидроксильной (3400 см^{-1}) групп. Сложноэфирная и карбоксильная группы по данным ИК-спектра в полисахариде отсутствовали. В сильном поле ПМР-спектра полисахарида имелись сигналы N-ацетильной (δ 2,11 м.д., синглет) и C-метильной группы остатка 6-дезоксигексозы (δ 1,50 м.д., дублет, J 4 Гц) с соотношением интегральных интенсивностей 2,3:1. Кроме того, в спектре присутствовали сигналы четырех аномерных протонов с δ 4,82; 4,92; 5,07 и 5,19 м.д., а также обычные неинформативные сигналы других углеводных протонов.

После полного кислотного гидролиза полисахарида в гидролизате с помощью углеводного анализатора идентифицированы рамноза (17%), манноза (17%), галактоза (2%) и глюкоза (2%) и с помощью анализатора аминокислот — глюкозамин (18%) и маннозамин (17%). Кроме того, гидролизат был подвергнут дезаминированию азотистой кислотой* и восстановлен боргидридом натрия. Полученные полиолы идентифицированы в виде полных ацетатов методом ГЖХ [8, 9]. Относительное содержание сахаров Rha — Man — GlcNAc — ManNAc, главных компонентов полисахарида, составило 1 : 1 : 0,86 : 0,9. Таким образом, из результатов моносахаридного анализа и данных ПМР-спектра вытекало, что повторяющееся звено полисахарида — тетрасахарид, построенный из остатков рамнозы, маннозы, N-ацетилманнозамина и N-ацетилглюкозамина, тогда как глюкоза и галактоза, обнаруженные в незначительных количествах, — компоненты внутреннего кора.

Затем была определена абсолютная конфигурация моносахаридов, входящих в состав полисахарида. D-Манноза и L-рамноза выделены из гидролизата хроматографией на бумаге и идентифицированы по величине оптического вращения. D-Маннозамин идентифицирован превращением в D-глюкозу с помощью реакции дезаминирования, примененной непосредственно к гидролизату полисахарида, с последующим окислением D-глюко-

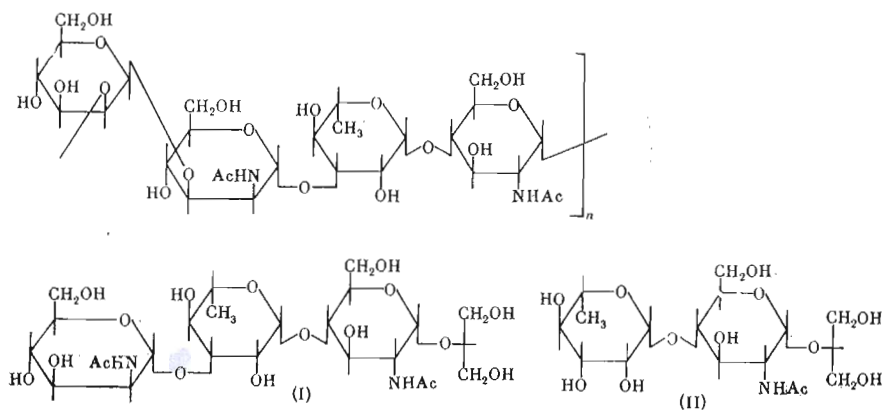
* При этом глюкозамин превращается в 2,5-ангидро-маннозу, а маннозамин — в глюкозу.

зоксидазой. *D*-Конфигурация глюкозамина следовала из положительного оптического вращения смеси обоих гексозаминов, поскольку *D*-маннозамин имеет небольшое отрицательное вращение.

Для определения типов связей полисахарид был подвергнут метилированию в условиях [10] с последующей идентификацией частично метилированных сахаров методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Часть метилированного полисахарида гидролизовали, восстанавливали натрийборгидридом и ацетилировали. Ацетаты частично метилированных полиолов, полученные из нейтральных сахаров, идентифицированы на основании данных [11] по их фрагментации. В результате были идентифицированы 2,4-ди-*O*-метил-рамноза и 3,4,6-три-*O*-метил-манноза, откуда следовало, что в полисахариде оба сахара находятся в пиранозной форме и замещены в положения 3 и 2 соответственно.

Другую часть метилированного полисахарида подвергли метанолизу и ацетилированию, частично метилированные метилгликозиды исследовали методом ГЖХ-масс-спектрометрии. При этом идентифицированы аномеры 2-(*N*-метил)ацетиамидо-2-дезоксидо-3,6-ди-*O*-метил-4-*O*-ацетил- α (β)-метил-глюкопиранозиды, совпадающие по времени удерживания и масс-спектру (рис. 1) с заведомым образцом, полученным из *N*-ацетиллактозамина методом метилирования. Кроме того, идентифицированы аномеры 2-(*N*-метил)ацетиамидо-2-дезоксидо-3-*O*-ацетил-4,6-ди-*O*-метил- α (β)-метил-маннопиранозиды, масс-спектр которых был практически идентичен спектру соответствующего производного глюкозамина, описанного при установлении строения специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 1 [12]. Следовательно, остатки *N*-ацетилманнозамина и *N*-ацетилглюкозамина замещены в полисахариде в положения 3 и 4 соответственно, а сам полисахарид имеет неразветвленную цепь.

Для определения последовательности моносахаридных остатков в цепи полисахарид был подвергнут распаду по Смитсу. Исследование состава окисленного периодатом натрия полисахарида показало, что окислению подверглись только остатки маннозы. Последующий мягкий гидролиз окисленного полисахарида привел к образованию практически одного олигосахарида (I) (см. схему), выделенного гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-15. В состав полученного олигосахарида входили *N*-ацетилманнозамин, *N*-ацетилглюкозамин, рамноза, а также глицерин, что было установлено исследованием дезаминированного гидролизата методом ГЖХ. В результате анализа олигосахарида (I) методом метилирования, выполненного так же, как в случае полисахарида, были идентифицированы 2,4-ди-*O*-метил-рамноза, 2-(*N*-метил)ацетиамидо-2-дезоксидо-3,6-ди-*O*-метил-4-*O*-ацетил- α (β)-глюкопиранозид и 2-(*N*-метил)ацетиамидо-2-дезоксидо-3,4,6-три-*O*-метил- α -метил-маннопиранозид, масс-спектр которого (рис. 2) соответствовал литературным данным [13] для полностью метилированного производного глюкозамина.



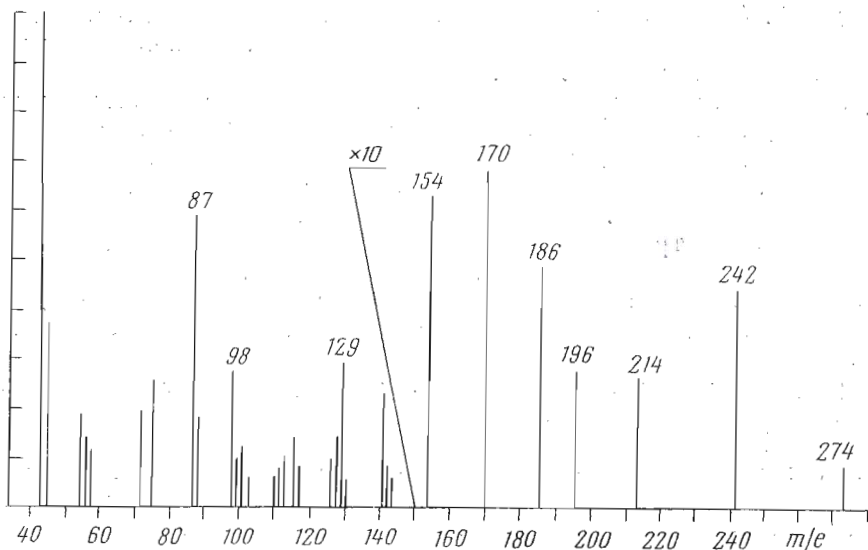


Рис. 1. Масс-спектр 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксид-3,6-ди-О-метил-4-О-ацетил-метил- $\alpha(\beta)$ -D-глюкопиранозид из специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10

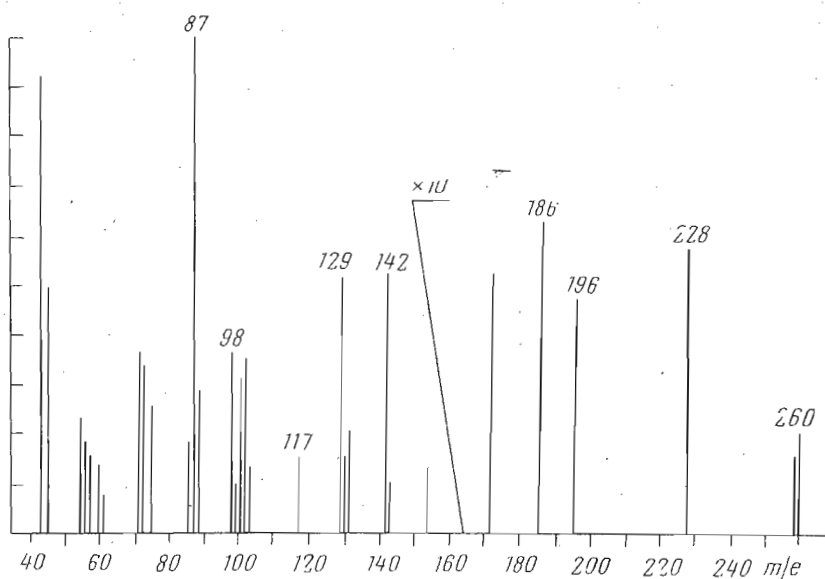


Рис. 2. Масс-спектр 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксид-3,4,6-три-О-метил-метил- α -D-маннопиранозид из специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10

Таким образом, остаток N-ацетилманнозамина находится на невосстанавливаемом конце олигосахарида (I), и, следовательно, в полисахариде к нему был присоединен остаток маннозы. Однако нерешенным оставался вопрос о последовательности остатков рамнозы и N-ацетилглюкозамина. Для выяснения этого вопроса был использован повторный распад по Смитсу. Периодатное окисление олигосахарида (I) затрагивало только остаток N-ацетилманнозамина, что согласуется с его конечным положением. Мягкий кислотный гидролиз окисленного олигосахарида привел к образованию олигосахарида (II), выделенного гель-хроматографией на сефадексе G-15. В его состав входили рамноза, N-ацетилглюкозамин и глицерин. Анализ методом метилирования показал, что на невосстанов-

ливающим конце олигосахарида (II) находится остаток рамнозы, откуда следовало, что в олигосахариде (I) и полисахариде присутствует последовательность N-ацетилманнозамин — рамноза — N-ацетилглюкозамин, как показано на схеме.

Для определения конфигурации гликозидных связей был использован метод [14, 15], основанный на окислении ацетилированных гликозидов хромовым ангидридом. При этом окислению подвергаются β -гликозиды; α -гликозиды в этих условиях устойчивы. Анализ состава окисленного ацетата полисахарида методом ГЖХ показал практически полное исчезновение остатков рамнозы, манноза окислилась на 65%, тогда как остатки аминсахаров оказались устойчивы. Отсюда следовало, что рамноза и манноза присоединены β -гликозидными связями, а гексозаминидные связи имеют α -конфигурацию. Этот вывод подтверждается и данными ПМР-спектра полисахарида, в котором имеются сигналы четырех аномерных протонов с химическими сдвигами δ 5,19; 5,07; 4,92 и 4,82 м.д. По данным [16], протоны с химическим сдвигом, превышающим 5 м.д. в шкале δ , относятся к α -аномерам, тогда как аномерные протоны β -гликозидов имеют химический сдвиг меньше 5 м.д. Таким образом, в полисахариде на повторяющееся тетрасахаридное звено приходится две α - и две β -гликозидные связи.

На основании всех приведенных данных можно заключить, что O-специфический полисахарид *Sh. dysenteriae* тип 10 имеет строение, приведенное на схеме.

Специфические полисахаридные цепи липополисахарида, обуславливающие типовую специфичность грамотрицательных бактерий, часто содержат в своем составе аминсахара, но, как правило, по одному остатку на повторяющееся звено [3]. В случае полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10 в состав повторяющегося звена входят сразу два аминсахара, один из которых (N-ацетилманнозамин) встречается в составе липополисахарида сравнительно редко. Наличие двух аминсахаров в одном повторяющемся звене не является пределом для липополисахарида. Недавно нами было показано наличие сразу трех аминсахаров в звене специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 2 [5].

Выше отмечалось, что подгруппа *Sh. dysenteriae* состоит из серологически неродственных типов, O-антигены которых, как правило, термолabileны. Исключение составляют антигены серотипов 1,2 и, по-видимому, 10. Строение специфических полисахаридных цепей антигенов серотипов 1 [12] и 2 [5] было установлено нами ранее. Они оказались нейтральными гексозаминогликанами. Специфический полисахарид серотипа 10 также нейтрален и образует с ними одну группу.

Сравнение строения специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 10 со структурами полисахаридов остальных серотипов этой подгруппы еще раз показывает, что они не только построены из различных моносахаридов, но и не имеют общих структурных элементов, которые могли бы обеспечить перекрестные реакции между отдельными серотипами. Таким образом, отсутствие группового фактора у бактерий *Sh. dysenteriae* объясняется полным отсутствием структурного сходства специфических полисахаридных цепей их соматических антигенов.

Экспериментальная часть

Восходящая хроматография на бумаге FN-11 выполнена в системе бутанол—пиридин — вода (6 : 4 : 3) при обнаружении сахаров щелочным раствором нитрата серебра. Гель-хроматография проведена на колонках с сефадексом G-15 и G-50 в пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5 (10 мл уксусной кислоты и 4 мл пиридина на 1 л воды); ионообменная хроматография — на анализаторе углеводов Technicon SC-2 и на анализаторе

аминокислот BC-200; ГЖХ — на приборе Pye Unicam, серия 105, на колонках с ECNSS-M (колонка А) и SE-30 (колонка Б). ГЖХ-масс-спектрометрия выполнена на приборе Varian MAT 111, Gnom, с использованием колонки Б. Условия методов описаны в [12].

ПМР-спектр полисахарида снят на приборе Varian XL-100 в D₂O с предварительной лиофилизацией образца (50 мг) из 1 мл D₂O. ИК-спектр записан на приборе UR-10 в прессовке с KBr. Электрофорез на бумаге проведен в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, pH 4,5. Оптическое вращение определяли на поляриметре Perkin-Elmer, модель 141, при 20° в воде. Растворы упаривали в вакууме при 40°. Серологические тесты выполнены по описанной ранее методике [4].

Выделение специфического полисахарида. Сухие клетки *Sh. dysenteriae* тип 10, штамм 9351, экстрагировали горячим 45% фенолом, нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном и липополисахарид пересаждали спиртом из раствора NaCl по стандартной методике [7], выход липополисахарида 2,5% от веса сухих клеток. Липополисахарид (600 мг) нагревали 3 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.

Нейтральные сахара определяли в гидролизате полисахарида (2 М HCl, 100°, 4 ч) с помощью анализатора углеводов, аминсахара — в гидролизате (4 М HCl, 100°, 4 ч) с помощью анализатора аминокислот. Одновременное определение аминсахаров и нейтральных сахаров методом ГЖХ после дезаминирования гидролизатов полисахарида и олигосахаридов проведено, как описано ранее [9].

Полисахарид (15 мг) гидролизовали 2 М HCl (4 ч, 100°), гидролизат упаривали, остаток дважды упаривали с водой и разделяли с помощью препаративной бумажной хроматографии на три фракции: а) рамноза $[\alpha]_D +5^\circ$ (*c* 0,1), лит. данные [17] для *L*-рамнозы +8,9°; б) манноза, $[\alpha]_D +11,2^\circ$ (*c* 0,15), лит. данные для *D*-маннозы +14°; в) смесь глюкозамина и маннозамина, $[\alpha]_D +40^\circ$ (*c* 0,35), лит. данные [17] для хлоргидрата *D*-глюкозамина +72° и хлоргидрата *D*-маннозамина —5°.

Метилирование полисахарида и олигосахаридов проводили иодистым метилом в присутствии метилсульфиланиона [10]. Метилированный полисахарид очищали диализом, олигосахариды экстрагировали хлороформом. Формолиз осуществляли 85% муравьиной кислотой (100°, 3 ч), последующий гидролиз — 0,3 М HCl (100°, 16 ч) и после восстановления натрийборгидридом (6 ч при 20°) ацетилювали уксусным ангидридом в пиридине (100°, 15 мин) и исследовали методом ГЖХ на колонке А при 150°. Метанолиз проводили 1% раствором HCl в метаноле, далее ацетилювали (2 ч, 100°) и исследовали на колонке Б при 180°.

Распад по Смуту. О-Специфический полисахарид (30 мг) окисляли в течение 48 ч 3 мл 0,1 М раствора NaIO₄ в темноте при 20°, к раствору добавляли боргидрид натрия (120 мг), через 2 ч подкисляли уксусной кислотой, деионизировали гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50, полученный окисленный полисахарид гидролизовали 5 сут 3 мл 0,5 М HCl при 20° и олигосахарид (I) выделяли хроматографией на колонке с сефадексом G-15.

Олигосахарид (I) окисляли периодатом натрия (2 мл) и восстанавливали натрийборгидридом, как описано для полисахарида, деионизацию проводили гель-фильтрацией на сефадексе G-15. Продукт гидролизовали 10 сут 0,5 М HCl при 20° и гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-15 выделяли олигосахарид (II).

Конфигурация гликозидных связей была определена на полностью ацетилованном полисахариде методом окисления хромовым ангидридом в ледяной уксусной кислоте [14, 15].

1. Дмитриев В. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1977) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1613—1619.
2. Kochetkov N. K., Dmitriev V. A., Lvov V. L. (1977) Carbohydr. Res., in press.
3. Jann K., Westphal O. (1975) in The Antigens (Sela M., ed.), vol. III, pp. 1—125, Acad. Press, New York — San Francisco — London.
4. Dmitriev V. A., Backinowsky L. V., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1973) Eur. J. Biochem., **40**, 355—359.
5. Dmitriev V. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L., Capek K. (1977) Eur. J. Biochem., in press.
6. Dmitriev V. A., Backinowsky L. V., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1977) Eur. J. Biochem., in press.
7. Westphal O., Jann K. (1965) in Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler R. L., Wolfrom H. L., eds.), vol. 5, pp. 83—91, Acad. Press, New York — London.
8. Hase S., Matsushima Y. (1969) J. Biochem., **66**, 57—62.
9. Дмитриев В. А., Бакинковский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., **10**, 2335—2338.
10. Conrad H. E. (1972) in Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler R. L., BeMiller J. N., eds.), vol. 6, pp. 361—364, Acad. Press, New York — London (Методы исследования углеводов (1975) с. 276—278, «Мир», М.).
11. Bjorndal H., Lindberg B., Svensson S. (1967) Carbohydr. Res., **5**, 433—440.
12. Dmitriev V. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1976) Eur. J. Biochem., **66**, 559—566.
13. Stoffyn A., Stoffyn P., Orr J. C. (1972) Carbohydr. Res., **23**, 251—260.
14. Angayal S. J., James K. (1970) Carbohydr. Res., **12**, 124—131.
15. Hoffman J., Lindberg B., Svensson S. (1972) Carbohydr. Res., **26**, 661—666.
16. Bebault G. M., Choy Y. M., Dutton G. G. S., Funnel N., Stephen A. M., Yang M. T. (1973) J. Bacteriol., **113**, 1345—1347.
17. Micheel F. (1956) Chemie der Zucker und Polysaccharide, ss. 400, 463, 467, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.

Поступила в редакцию
23.III.1977

**ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. V. THE STRUCTURE OF
O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF *SHIGELLA DYSENTERIAE*
TYPE 10 LIPOPOLYSACCHARIDE**

DMITRIEV V. A., KNIREL Yu. A., SHEREMET O. K.,
KOCHETKOV N. K., HOFMAN I. L.

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

The O-specific polysaccharide was obtained by mild acid hydrolysis of lipopolysaccharide from *Sh. dysenteriae* type 10 followed by fractionation of «degraded polysaccharide» on Sephadex G-50 column. The polysaccharide consisted of *D*-mannose, *L*-rhamnose, 2-acetamido-2-deoxy-*D*-mannose and 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose in the ratio of 1 : 1 : 1 : 1. According to methylation analysis the polysaccharide comprises a linear chain of pyranoside residues, wherein] rhamnose and *N*-acetylmannosamine are substituted at position 3, mannose substituted at position 2, and *N*-acetylglucosamine — at position 4. The sequence of monosaccharide units was deduced from the structures of oligosaccharides obtained by two consecutive Smith degradations of the polysaccharide. The configurations of glycosidic linkages were determined using chromic anhydride oxidation method. The data presented allowed to assign to the repeating unit of the polysaccharide the following structure: $\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Manp (1} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-ManNAcp (1} \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap (1} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAcp (1} \rightarrow$
Serological properties of *Sh. dysenteriae* antigens are discussed in light of the chemical structures of their specific polysaccharides.