



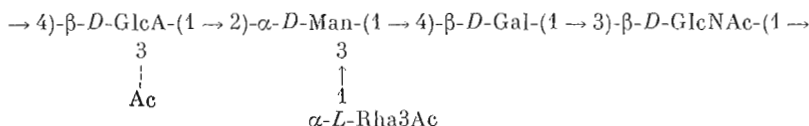
УДК 577.114.5 : 579.842.14.083.3

## СОМАТИЧЕСКИЕ АНТИГЕНЫ *SHIGELLA* И *ESCHERICHIA COLI*. УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *SHIGELLA BOYDII*, ТИП 12, И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СЕРОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ В СРАВНЕНИИ С О-СПЕЦИФИЧЕСКИМ ПОЛИСАХАРИДОМ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* 07

Львов В. Л., Липина Е. Б., Белая О. Ф., Плужникова Г. Н.,  
Шашков А. С., Дмитриев Б. А.

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи  
Академии медицинских наук СССР, Москва

О-Специфический полисахарид соматического антигена (липополисахарида) *Shigella boydii*, тип 12, исследован методами  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, метилирования и частичного гидролиза. Показано, что полисахарид построен из повторяющихся пентасахаридных звеньев, имеющих следующую структуру:

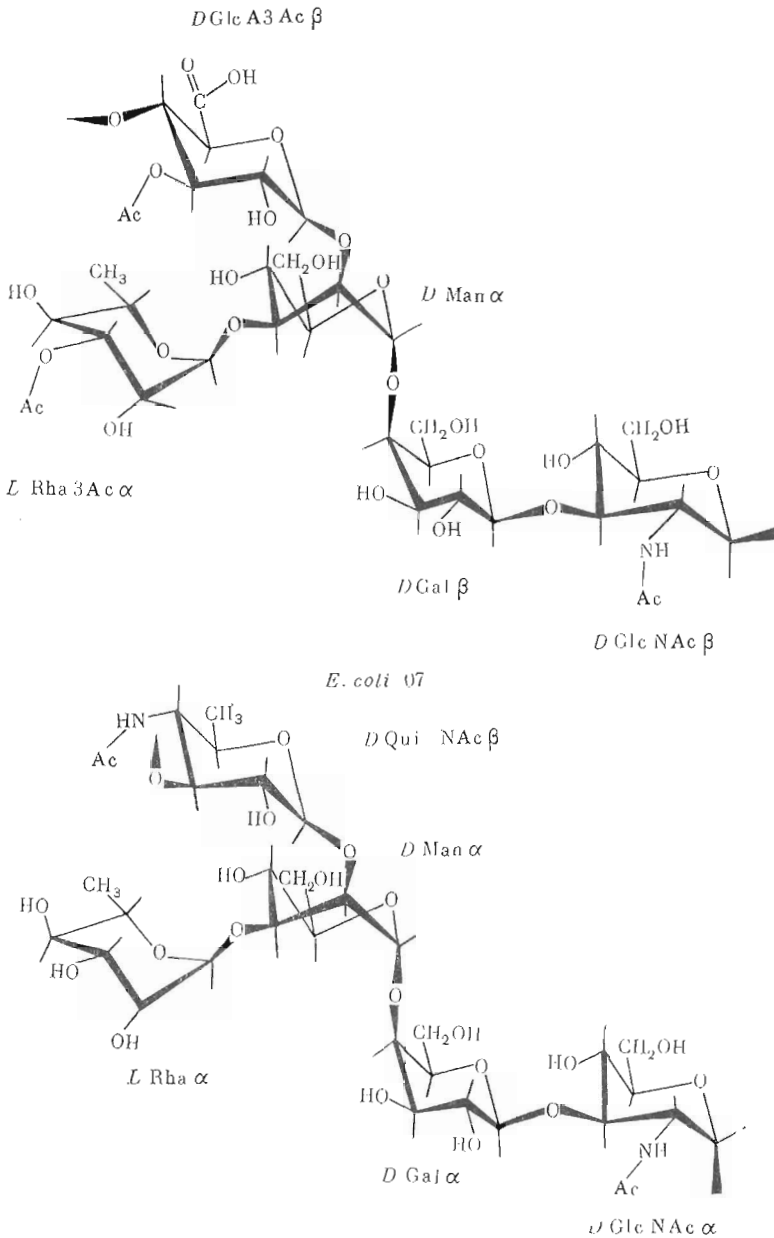


Количество О-ацетильных групп значительно ниже стехиометрического и составляет около двух на три-четыре повторяющихся звена. Тем не менее из проведенных серологических реакций с нативным и модифицированными полисахаридами следует, что критической иммунодетерминантной группой является остаток 3-О-ацетил- $\alpha$ -L-рамнозы.

Показано, что липополисахарид и полисахарид из *Sh. boydii*, тип 12, не дают перекрестных реакций с липополисахаридом и полисахаридом из *Escherichia coli* 07, несмотря на наличие в их структурах общих трисахаридных фрагментов. Обсуждаются причины отсутствия серологического родства между клетками *Sh. boydii*, тип 12, и *E. coli* 07.

В предыдущих исследованиях соматических антигенов (липополисахаридов, ЛПС) энтеробактерий, принадлежащих к различным классификационным группам, но вызывающих родственные заболевания, мы установили идентичность химических структур и серологических свойств О-специфических полисахаридов у *Escherichia coli* 0124 и *Shigella dysenteriae*, тип 3 [1], *E. coli* 058 и *Sh. dysenteriae* 5 [2] соответственно. Однако при изучении ЛПС из *E. coli* 0114 и *Sh. dysenteriae*, тип 8, которые в соответствии с данными работы [3] являются серологически родственными бактериями, оказалось, что их О-специфические полисахариды имеют совершенно различные химические структуры и не дают достоверной перекрестной реакции [4]. Это обстоятельство побудило нас провести сравнительное химическое и серологическое исследования ЛПС О-специфических полисахаридов из *E. coli* 07 и *Sh. boydii*, тип 12, которые считались серологически родственными [3].

Строение О-специфического полисахарида из *E. coli* 07 было установлено нами недавно [5] и представлено на схеме. В настоящей работе мы установили химическое строение О-специфического полисахарида из *Sh. boydii*, тип 12, и показали, что обе химические структуры являются родственными, однако серологические исследования показали, что антигены не дают перекрестной реакции. Полученные данные подтверждают не часто встречающийся факт, что родственные иммунодетерминантные сахара могут проявлять различную специфичность.



ЛПС из *Sh. boydii*, тип 12, получен экстракцией клеток горячим водным фенолом с последующим осаждением пукленовых кислот цетавлоном и ультрацентрифугированием [6]; выход ЛПС составил 5% от веса сухих клеток.

ЛПС расщепляли (2 ч, 100° С) 1% уксусной кислотой и хроматографией гидролизата на сефадексе G-50 выделяли полисахарид с  $K_d=0,05$ ,  $[\alpha]_D^{+6} +6^\circ$  (с 1, вода), выход ~30%.

ЛПС и полисахарид из *E. coli* 07 выделены как описано ранее [7].

В ИК-спектре полисахарида *Sh. boydii*, тип 12, присутствовали полосы поглощения амидных связей (1650 и 1570  $\text{см}^{-1}$ ) и сложноэфирных карбоксильных групп (1740 и 1250  $\text{см}^{-1}$ ). По данным электрофореза на бумаге, полисахарид был кислым,  $M_{\text{GlcA}} 0,42$ .

В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида имелись сигналы O- и N-ацетильных групп (21,7 и 23,7 м.д.) с соотношением интегральных интенсивностей 0,4 : 1. Поскольку наличие нестехиометрического количества O-ацетиль-

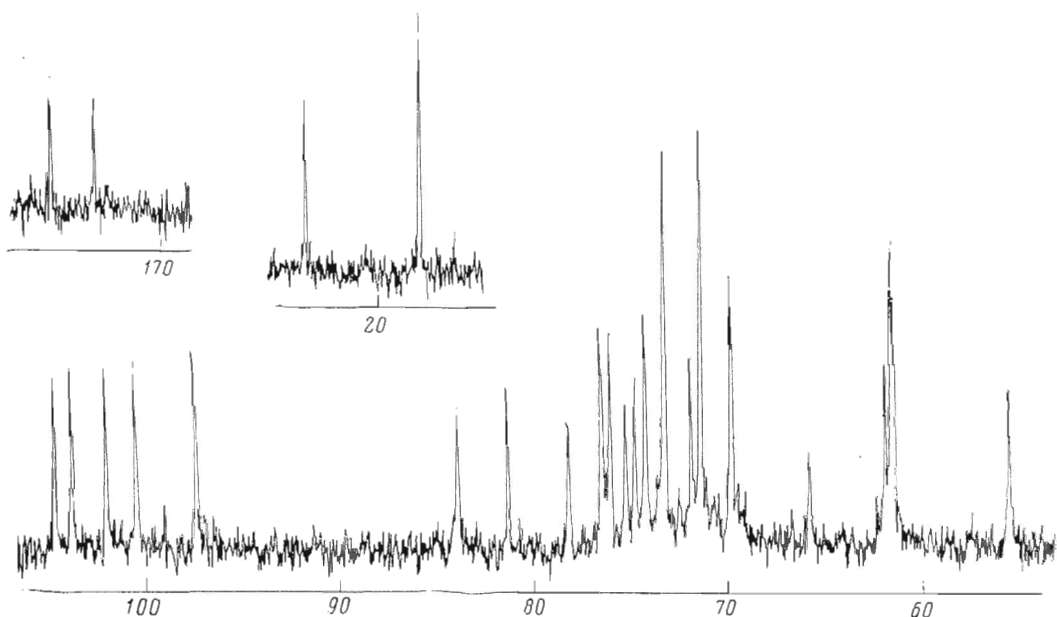


Рис. 1.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр О-деацетилированного полисахарида (ПС1)

ных групп существенно усложняло спектр, полисахарид был омылен. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР О-деацетилированного полисахарида (ПС1) содержал сигналы, соответствующие С-метильной группе при 1,25 м.д. (3H, д,  $J_{5,6}$  5,7 Гц), N-ацетильной группе при 2,04 м.д. (3H, с) и пяти протонам, связанным с аномерными центрами, при 4,40 (1H, д,  $J_{1,2}$  2 Гц), 4,43 (1H, д,  $J_{1,2}$  2 Гц), 4,62 (1H, д,  $J_{1,2}$  7,0 Гц), 4,95 (1H, д,  $J_{1,2}$  7,3 Гц) и 4,98 м.д. (1H, д,  $J_{1,2}$  7,6 Гц). В его  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре (рис. 1) имелись сигналы С-метильной (17,8 м.д.), N-ацетильной группы (23,7 и 175,7 м.д.), сигнал ядра атома углерода, связанного с аминогруппой (55,55 м.д.), сигналы, соответствующие трем оксиметильным группам (61,5; 61,6 и 61,9 м.д.), а также пяти атомам углерода аномерных центров (97,5; 100,6; 102,1; 103,9 и 104,8 м.д.) и СО-группе (173,5 м.д.). Общее количество сигналов в спектре (32) соответствовало пентасахаридному повторяющемуся звену, содержащему моносахариды с С-метильной, ацетамидной и карбоксильной группами.

В гидролизате ПС1 были идентифицированы *L*-рамноза, *D*-манноза, *D*-галактоза и *D*-глюкоза в соотношении 0,95 : 0,7 : 1,0 : 0,5. Аналогичный анализ полисахарида (ПС2), восстановленного по карбоксильным группам, показал наличие *L*-рамнозы, *D*-маннозы, *D*-галактозы и *D*-глюкозы в соотношении 0,95 : 1,1 : 1,0 : 0,15. При ГЖХ-анализе продуктов гидролиза ПС1 и ПС2 после дезаминирования [8] в виде ацетатов полиолов наряду с производными тех же моносахаридов было обнаружено эквивалентное количество 2,5-ангидроманнита, образующегося из 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы, которая была идентифицирована в гидролизатах ПС1 и ПС2 с помощью аминокислотного анализатора (ее количество составило ~17,5%). Появление в составе ПС2 эквивалентного количества *D*-глюкозы свидетельствовало о наличии в нативном полисахариде остатка *D*-глюкуроновой кислоты. Запущенное содержание *D*-маннозы в гидролизате ПС1 по сравнению с гидролизатом ПС2 указывало на то, что к остатку *D*-маннозы в полисахариде, по-видимому, присоединен остаток *D*-глюкуроновой кислоты.

Из приведенных данных следовало, что в состав полисахарида входят остатки *L*-рамнозы, *D*-маннозы, *D*-галактозы, *D*-глюкуроновой кислоты и 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы в эквивалентных количествах.

Восстановленный полисахарид ПС2 метилировали в присутствии метилсульфил-аниона [9]. В результате анализа частично метилирован-

ных сахаров в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ-масс-спектрометрии [10] были идентифицированы 1,5-ди-*O*-ацетил-2,3,4-три-*O*-метилрамнит, 1,4,5-три-*O*-ацетил-2,3,6-три-*O*-метилдульцит, 1,4,5-три-*O*-ацетил-2,3,6-три-*O*-метилсорбит (из глюкуроновой кислоты) и 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил-4,6-ди-*O*-метилманнит. В метанолизате метилированного полисахарида в качестве единственного аминосахарного компонента был обнаружен метил-3-*O*-ацетил-2-дезоксид-2-(*N*-метилацетиламино)-4,6-ди-*O*-метилглюкопиранозид, масс-спектр которого совпал с описанным ранее [11].

Из полученных результатов следовало, что полисахарид является разветвленным, причем на конце разветвления расположены остатки *L*-рамнопиранозы, а в точке разветвления находятся остатки 2,3-ди-*O*-замещенной *D*-маннопиранозы. Все моносахаридные остатки находятся в пиранозной форме, причем размер цикла остатков *D*-галактозы и *D*-глюкуроновой кислоты следовал из расшифровки спектров <sup>13</sup>C-ЯМР (см. ниже).

Для выяснения последовательности моносахаридных остатков дезацетилированный полисахарид ПС1 был подвергнут частичному кислотному гидролизу (0,5 М HCl, 100° С, 30 мин), и с помощью гель-хроматографии, ионообменной хроматографии и хроматографии на бумаге были выделены олигосахариды (1)–(5). В гидролизате биоуроновой кислоты (1) были идентифицированы *D*-манноза и *D*-глюкуроновая кислота. Часть биоуроновой кислоты (1) была восстановлена NaBH<sub>4</sub> (2 ч, 0° С) и подвергнута кислотному гидролизу. Исчезновение из гидролизата *D*-маннозы доказывало, что этот моносахарид расположен на восстанавливаемом конце дисахарид (1). Аналогично было показано, что кислый олигосахарид (2) наряду с *D*-маннозой и *D*-глюкуроновой кислотой содержит *D*-галактозу, которая расположена на восстанавливаемом конце. Периодатное окисление трисахарид привело к расщеплению всех моносахаридных остатков. Из этих данных следовало, что остаток *D*-маннозы замещен остатком *D*-глюкуроновой кислоты в положении 2. Таким образом, триуроновая кислота (2) имеет линейную структуру: GlcA-(1→2)-Man-(1→4)-Gal.

Гидролиз олигосахарид (3) (не мигрирует при электрофорезе на бумаге в пиридин-ацетатном буфере (рН 4,5) и проявляется нингидрином) с последующим дезаминированием привел к идентификации методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов эквивалентных количеств 2,5-ангидроманнита, маннита и дульцита. Олигосахарид (3) приобретал подвижность при электрофорезе в 0,025 М TEAB (рН 9,5) ( $M_{\text{GlcA}}$  0,37), что доказывало наличие в его составе *D*-глюкуроновой кислоты, которая обнаруживалась также в гидролизате олигосахарид (3) наряду с заметным количеством дисахарид (1). При дезаминировании тетрасахарид (3) с последующим восстановлением NaBH<sub>4</sub> был получен кислый олигосахарид (3а), совпадающий при электрофорезе на бумаге с кислыми тетрасахаридами (4) и (5). В гидролизате (3а) методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов были обнаружены эквивалентные количества тех же моносахаридов, что и в случае тетрасахарид (3). Из приведенных данных следовало, что остаток 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы находится на восстанавливаемом конце линейной тетрауроновой кислоты (3), так как при любом ином расположении произошло бы его отщепление в результате дезаминирования. Следовательно, олигосахарид (3) имеет строение GlcA-(1→2)-Man-(1→4)-Gal-(1→3)-GlcN.

Результаты определения моносахаридного состава кислого олигосахарид (4) показали, что он построен из тех же моносахаридных остатков, что и тетрасахарид (3). При изучении гидролизата восстановленного NaBH<sub>4</sub> тетрасахарид с помощью аминокислотного анализатора обнаружено исчезновение 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы с одновременным появлением эквивалентного количества 2-амино-2-дезоксиглюцита. Из этих данных следовало, что олигосахарид (4) представляет собой линейный тетрасахарид, являющийся *N*-ацетилированным аналогом олигосахарид (3). Действительно, *N*-ацетилирование тетрасахарид (3) дало тетрасахарид (4), идентичный образцу, выделенному непосредственно из гидролизата полисахарид.

Изучение гидролизата олигосахарид (5) и его восстановленного NaBH<sub>4</sub>

производного показало, что он имеет следующую линейную структуру: GlcNAc-(1→4)-GlcA-(1→2)-Man-(1→4)-Gal.

Таким образом, согласно результатам определения строения пяти олигосахаридов, моносахаридные остатки в повторяющемся звене полисахарида *Sh. boydii*, тип 12, расположены в последовательности, изображенной на схеме.

Конфигурация гликозидных связей в полисахариде следовала из анализа сигналов пяти аномерных атомов углерода в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ПС1 с химическими сдвигами 104,8; 103,9; 102,1; 100,6 и 97,5 м. д., константы спин-спинового взаимодействия (КССВ)  $^1J_{\text{C}_1, \text{H}_1}$  которых оказались равными 162, 163, 163, 171 и 172 Гц соответственно. Для фуранозидов характерны значения КССВ в пределах 171–175 Гц [12]. Сигналы ядер С1 фуранозидов с *транс*-ориентацией заместителей при атомах С1 и С2 лежат в области 107–111 м. д., а с *цис*-ориентацией — в области 102–104 м. д. [12]. Таким образом, не могут принадлежать фуранозидным остаткам три слабopольных сигнала исходя из величины КССВ, а два сильнопольных — исходя из значений их химических сдвигов. Поскольку все остатки находятся в полисахариде в пиранозной форме, на основании величины КССВ можно заключить, что сигналы при 104,8; 103,9 и 102,1 м. д. принадлежат  $\beta$ -пиранозидным остаткам, а сигналы при 100,6 и 97,5 м. д. —  $\alpha$ -пиранозидным. Кроме того, из анализа области спектра  $^1\text{H}$ -ЯМР полисахарида ПС1, содержащей сигналы, соответствующие протонам, связанным с аномерными центрами, следовало, что три сигнала  $\beta$ -пиранозидных остатков принадлежат гексозам с аксиально-аксиальным расположением протонов при С1 и С2 (величины  $^1J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$  составляют 7,0–7,6 Гц) и, значит, соответствуют остаткам галактозы, N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты.

Таким образом, повторяющееся звено специфического полисахарида из *Sh. boydii*, тип 12, без учета локализации O-ацетильных групп имеет строение, представленное на схеме.

Полное отнесение сигналов в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида ПС1, приведенное в таблице, было осуществлено с использованием полученных нами ранее данных для специфического полисахарида из *E. coli* 07, содержащего идентичный трисахаридный фрагмент  $\alpha$ -L-Rha-(1→3)- $\alpha$ -D-Man-(1→4)- $\beta$ -D-Gal [4], а также литературных спектральных данных для (1→4)- $\beta$ -D-глюкопиранозидуронана [13] и метил-2-ацетамидо-2-дезоксигалакто-3-O-метил- $\beta$ -D-глюкопиранозидов [14] (см. таблицу).

В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР пассивного полисахарида каждый сигнал атома углерода аномерного центра остатков L-рамнозы и D-глюкуроновой кислоты представлен двумя пиками, различие в химических сдвигах между которыми не превышает 0,4 м. д. Поскольку O-ацетилирование вызывает значительное сильнопольное смещение (2–4 м. д.) сигналов соседних углеродных атомов [15], ацетоксигруппы в остатках рамнозы и глюкуроновой кислоты не могут находиться при С2. Для остатков D-глюкуроновой кислоты, замещенной в положении 4, это означает, что ацетоксигруппа находится при С3. Этот вывод подтверждается детальным анализом минорных сигналов остатка глюкуроновой кислоты в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре.

В случае остатка L-рамнозы ацетоксигруппа может находиться в положениях 3 или 4. Выбор в пользу положения 3 сделан на основании наличия в спектре пассивного полисахарида сигнала при 67,8 м. д., который может принадлежать только атому С2 остатка 3-O-ацетилированной рамнозы.

Сравнение структур повторяющихся звеньев O-специфических полисахаридов из *Sh. boydii*, тип 12, и *E. coli* 07 показывает, что они содержат идентичный трисахаридный фрагмент, состоящий из остатков L-рамнозы, D-маннозы и D-галактозы.

ЛПС из *Sh. boydii*, тип 12, реагировал с гомологичной антисывороткой в реакции двойной иммунодиффузии по Оухтерлони с образованием одной главной и одной — двух минорных дуг преципитации. При иммуноэлектрофорезе ЛПС давал интенсивную дугу, направленную к катоду. В реакции непрямого геммагглютинации (РНГА) с эритроцитами барана, sensibilizированными ЛПС из *Sh. boydii*, тип 12, взаимодействие с ан-

Данные <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров нативного и модифицированного полисахаридов и некоторых модельных соединений

Соединение	Остаток	Химические сдвиги					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
Исходный полисахарид (ПС) <sup>1*</sup>	-3DGlcNAc $\beta$ 1-	102,4	55,5	83,9	69,8	76,6	61,9
	-4DGlcA $\beta$ 1-	103,9	74,2	74,8	81,4	76,6	173,5
		(103,7)	(72,4)	(76,2)	(79,2)	(76,2)	(173,1)
	-2DMan $\alpha$ 1-	100,6	74,2	75,2	65,8	73,3	61,6
	LRhap $\alpha$ 1-	97,5	71,4	71,4	73,3	69,8	17,8
		(97,1)	(67,8)	(74,3)	(70,9)	(69,2)	(17,6)
	-4DGal $\beta$ 1-	104,8	71,19	73,3	78,2	76,1	61,5
О-Дезацетилированный полисахарид (ПС1) <sup>2*</sup>	-3DGlcNAc $\beta$ 1-	103,1	55,55	84,0	69,9	76,5	61,9
	-4DGlcA $\beta$ 1-	103,9	74,3	74,8	81,4	76,5	173,5
	-2DMan $\alpha$ 1-	100,6	74,3	75,2	65,8	73,3	61,6
	LRhap $\alpha$ 1-	97,5	71,4	71,4	73,3	69,8	17,8
	-4DGal $\beta$ 1-	104,8	71,85	73,3	78,2	76,1	61,5
Восстановленный полисахарид (ПС2)	-3DGlcNAc $\beta$ 1-	102,3	55,8	83,9	69,8	76,5	61,8
	-4DGlc $\beta$ 1-	103,5	74,1	74,7	80,5	75,9	61,6
	-2DMan $\alpha$ 1-	100,5	74,1	75,4	65,7	73,4	61,6
	LRhap $\alpha$ 1-	97,1	71,6 <sup>3*</sup>	71,4 <sup>3*</sup>	73,2	69,9	17,8
	-4DGal $\beta$ 1-	104,9	71,8	73,2	78,0	76,1	61,3
DGlcNAc $\beta$ 1,3Me <sub>2</sub> <sup>4*</sup>		102,9	55,0	84,2	70,0	77,0	62,0
	-4DGlcA $\beta$ 1 <sup>5*</sup>	103,9	73,3	74,6	80,0	76,4	175,3

<sup>1\*</sup> В скобках указаны химические сдвиги соответствующих атомов углерода, несущих ацетилированную гидроксильную группу.

<sup>2\*</sup> Величины химических сдвигов атомов углерода остатков L-рамнозы, D-маннозы и D-галактозы в спектре <sup>13</sup>C-ЯМР-полисахарида из *E. coli* 07 [4] полностью совпадают с соответствующими сигналами в спектре ПС1 и в таблице не приводятся.

<sup>3\*</sup> Отнесение может быть обратным.

<sup>4\*</sup> Данные работы [14].

<sup>5\*</sup> Данные работы [13].

тисывороткой протекало в титрах до 12800. При этом положительная реакция в титре 200 и ниже считалась неспецифической, так как при таком разведении положительную реакцию в ряде случаев давали преципитные сыворотки. ЛПС из *Sh. boydii*, тип 12, давал реакцию коаггуляции с диагностическим клеткам золотистого стафилококка в разведениях 10<sup>-6</sup>—19<sup>-9</sup> г/мл ЛПС. Использование ЛПС *Sh. boydii*, тип 12, в твердофазном иммуоферментном анализе (ИФА) показало, что он реагирует с гомологичной антисывороткой в высоких титрах (20000) (рис. 2а).

Таким образом, из полученных данных следовало, что ЛПС *Sh. boydii*, тип 12, является соматическим антигеном. Практически те же количественные характеристики были получены с гомологичными антисыворотками для ЛПС из *E. coli* 07 (рис. 2б).

Исследование соответствующих полисахаридов *Sh. boydii*, тип 12, и *E. coli* 07 показало, что с гомологичными антисыворотками нативные полисахариды участвуют в реакциях коаггуляции в высоких титрах (10<sup>-6</sup> г/мл), а также тормозят реакции ЛПС с гомологичными антисыворотками в иммуоферментном тесте (рис. 3а, б) и РНГА. Из этих данных следует, что полисахариды из *Sh. boydii*, тип 12, и *E. coli* 07 — полноценные гаптены соответствующих антигенов.

Поскольку полисахарид *Sh. boydii*, тип 12, — разветвленный кислый гексозаминогликан, мы предположили, что в состав его антигенной детерминанты входят находящиеся в боковой цепи остатки рамнозы (как ацетилированные, так и незамещенные) и, возможно, остатки глюкуроновой кислоты (как ацетилированные, так и незамещенные), лежащие рядом с точкой перегиба основной цепи, вызванного наличием 2-О-замещенного остатка маннозы. Для проверки этого предположения были приготовлены дезацетилированный полисахарид ПС1, метиловый эфир полисахарида ПС3 (получен действием эфирного раствора СН<sub>2</sub>Н<sub>2</sub> в диметилсульфоксиде) и восстановленный по остаткам уроновых кислот полисахарид ПС2.

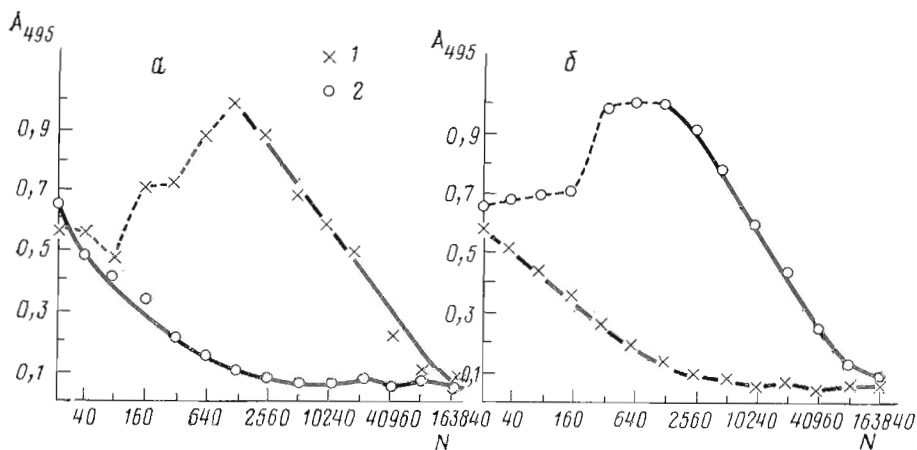


Рис. 2. Иммуноферментный анализ. Титрование гипериммунных кроличьих антисывороток к *Sh. boydii*, тип 12 (1), и *E. coli* 07 (2): а — реакция с ЛПС *Sh. boydii*, тип 12, б — реакция с ЛПС *E. coli* 07. N — обратное разведение сыворотки

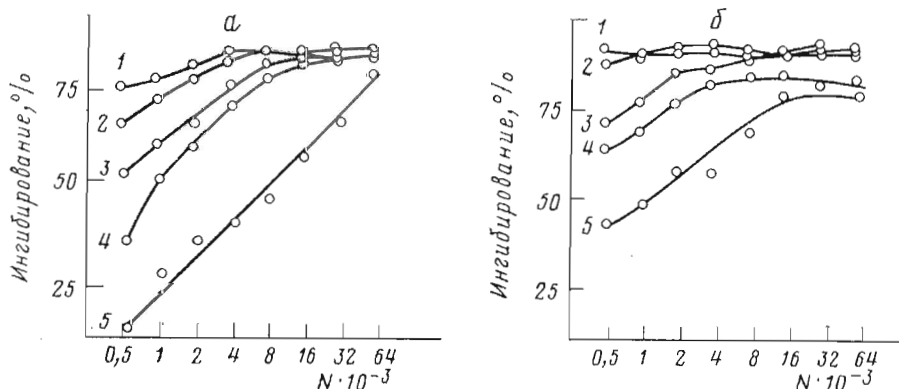


Рис. 3. Иммуноферментный анализ. Ингибирование реакции антисывороток с ЛПС O-специфическими полисахаридами при концентрации соответствующего полисахарида 100 (1), 50 (2), 25 (3), 12,5 (4) и 6,25 (5) мкг/мл. а — антисыворотка к *Sh. boydii*, тип 12, ЛПС из *Sh. boydii*, тип 12, полисахарид из ЛПС *Sh. boydii*, тип 12. б — антисыворотка к *E. coli* 07, ЛПС из *E. coli* 07, полисахарид из ЛПС *E. coli* 07. N — обратное разведение сыворотки

Исследование ПС1 в реакции коагуляции, а также ингибирования РНГА и ИФА (рис. 4, 3) показало, что дезацетилирование привело к полной потере способности полисахарида реагировать с антисывороткой. Метилловый эфир полисахарида, ПС3, эту способность сохранил, хотя был менее активен в реакциях ингибирования РНГА и ИФА (рис. 4, 2), чем исходный полисахарид, и неактивен в реакции коагуляции. Восстановленный полисахарид ПС2, не содержащий карбоксильных групп, не участвовал ни в одной из серологических реакций, однако этот результат нельзя отнести только за счет исчезновения COOH-группы, так как ПС2 подобно ПС1 не содержал и O-ацетильных групп.

Из полученных данных можно заключить, что в состав специфической антигенной детерминанты полисахарида из липополисахарида *Sh. boydii*, тип 12, входит в качестве доминанты остаток 3-O-ацетил- $\alpha$ -L-рамнопирапозы и, возможно, остаток 3-O-ацетил- $\beta$ -D-глюкуроновой кислоты.

Спектральные данные свидетельствовали о нестехиометрическом содержании O-ацетильных групп в составе O-специфического полисахарида *Sh. boydii*, тип 12. Этот факт не является неожиданным, так как O-ацетилирование является постполимеризационным процессом в ходе биосинтеза и, как правило, протекает не количественно, внося этим вклад в микрогетерогенность ЛПС [16]. С другой стороны, недавно было показано, что гетерогенный по остаткам глюкозы (фактор 1) полисахарид из *S. zuerich*

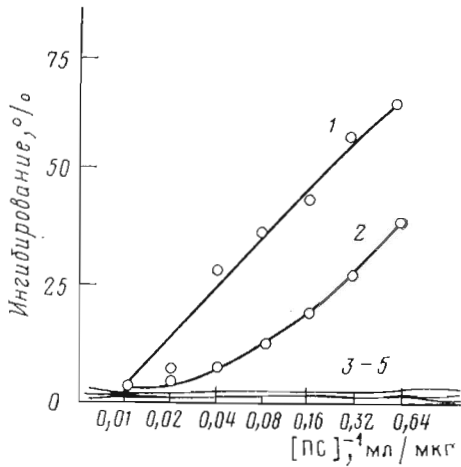


Рис. 4

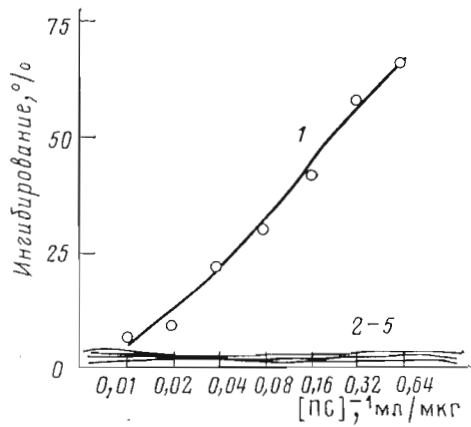


Рис. 5

Рис. 4. Иммуноферментный анализ. Ингибирование реакции антисыворотки к *Sh. boydii*, тип 12, с ЛПС *Sh. boydii*, тип 12, полисахаридом из *Sh. boydii*, тип 12 (1), полисахаридом ПС3 (2), полисахаридами ПС1, ПС2 и полисахаридом из *E. coli* 07 (3-5 соответственно). Разведение антисыворотки 1/5000

Рис. 5. Иммуноферментный анализ. Ингибирование реакции антисыворотки к *E. coli* 07 с ЛПС из *E. coli* 07 полисахаридом из *E. coli* 07 (1), полисахаридом из *Sh. boydii*, тип 12 (2), ПС1, ПС2, ПС3 (3-5). Разведение антисыворотки 1/5000

можно разделить на полисахариды ПС-Glc<sup>+</sup> и ПС-Glc<sup>-</sup> [17]. Это значит, что не исключается возможность существования полисахаридов ПС-OAc<sup>+</sup> и ПС-OAc<sup>-</sup> в случае *Sh. boydii*, тип 12. Однако неактивность дезацетилированного ПС1 во всех серологических реакциях свидетельствовала против этого предположения. Если бы исходный полисахарид являлся смесью ПС-OAc<sup>+</sup> и ПС-OAc<sup>-</sup>, то омыленный полисахарид ПС1, идентичный ПС-OAc<sup>-</sup>, непременно реагировал бы с антисывороткой.

Объяснить критическое значение О-ацетильной группы можно, предположив, что ее распределение вдоль полисахаридной цепи не является статистическим, а большая часть О-ацетилированных повторяющихся звеньев расположена вблизи невосстанавливающего конца полисахарида. Поскольку антисыворотки были получены к целым клеткам, на поверхности которых молекулы ЛПС прикреплены точно, то возможно, что антитела образовывались именно к этим концевым, О-ацетилированным участкам полисахаридной цепи. Однако такое предположение нуждается в строгом экспериментальном подтверждении.

В настоящей работе мы руководствовались данными о том, что бактерии *Sh. boydii*, тип 12, и *E. coli* 07 являются серологически родственными [3], и поставили своей задачей определить химическое строение общих структурных фрагментов полисахаридных цепей. Как следует из схемы, оба полисахарида имеют идентичные трисахаридные фрагменты, включающие остатки *L*-рамнозы, *D*-маннозы и *D*-галактозы, с единственным отличием, заключающимся в том, что ~20% этих трисахаридных участков в случае *Sh. boydii*, тип 12, имеют в своем составе ацетилированную рамнозу. Химическая и конформационная близость этих фрагментов подтверждалась полным совпадением сигналов ядер атомов углерода этих трех сахаров в спектрах <sup>13</sup>C-ЯМР полисахарида из *E. coli* 07 и омыленного полисахарида из *Sh. boydii*, тип 12.

Первоначально мы сделали заключение, это известное серологическое родство обуславливается существенным химическим сходством специфических полисахаридов. Однако первые же эксперименты по изучению перекрестных взаимодействий показали, что таковые отсутствуют. Поскольку известно, что некоторые серологические реакции имеют ограничения (например, в сыворотке могут отсутствовать преципитирующие антитела и



она не будет реагировать в преципитационных тестах), мы применили широкий набор принципиально различающихся реакций. Ни в одной из них мы не получили убедительного подтверждения серологического родства между ЛПС: они не давали перекрестных реакций в тестах двойной иммунодиффузии, иммуноэлектрофореза и коаггутинации. Отрицательный результат был получен в РНГА и ИФА (положительная реакция отмечена в области низких титров, в РНГА ниже 1/200, в ИФА — ниже 1/1000 (рис. 2а, б)). Поскольку полисахарид из *Sh. boydii*, тип 12, после дезацетилирования теряет серологическую специфичность по отношению к гомологичной антисыворотке, можно было ожидать, что ЛПС и полисахарид из *E. coli* 07 в перекрестной реакции будут неактивными, что и было подтверждено (рис. 3, 4). Тем не менее нельзя было исключить возможность реакции ЛПС и полисахарида из *Sh. boydii*, тип 12, и тем более модифицированных производных этого полисахарида ПС1 и ПС3 с антисывороткой к клеткам *E. coli* 07. Проведенное исследование показало, что ЛПС из *Sh. boydii*, тип 12, не реагировал с антисывороткой к *E. coli* 07 ни в одной из использованных реакций. Полисахариды ПС1 и ПС3 не участвовали в реакции коаггутинации и не являлись ингибиторами в РНГА и ИФА (рис. 5) подобно немодифицированному полисахариду из *Sh. boydii*, тип 12.

Поскольку в работе были использованы гипериммунные антисыворотки к клеткам, а не к антигенам, мы провели дополнительно реакцию бактериальной агглютинации и обнаружили, что на уровне клеток серологическое родство также отсутствует. С другой стороны, мы показали интенсирующие двусторонние перекрестные реакции с антигенами Грассе, полученными из клеток *E. coli* 07 и *Sh. boydii*, тип 12. По-видимому, отмеченный в литературе [3] факт наличия перекрестной реакции между *E. coli* 07 и *Sh. boydii*, тип 12, обусловлен внутриклеточными полимерами этих бактерий, а не их соматическими антигенами.

Обнаруженный нами факт отсутствия серологического родства у структурно родственных полисахаридов не является уникальным, поскольку известно, что в некоторых случаях антигенные детерминанты могут подавляться структурными изменениями в соседних участках антигена. Например, остаток глюкозы (фактор 1) полностью ингибирует специфичность остатка галактозы (фактор 46) в полисахариде из *S. zuerich* [17]. Анализ литературных данных по серологической специфичности полисахаридов из ЛПС *Salmonella* [18], *E. coli* [19], *Sh. flexneri* [20] и других показал, что иммунодоминантный сахар, образующий боковую цепь специфического полисахарида, часто присоединен к остатку с манно-конфигурацией (*D*-манноза, *L*-рамноза), замещенному в положение 2. Любые структурные изменения, касающиеся соседних с остатком маннозы сахаров, приводят к изменению специфичности данного иммунодетерминантного сахара, хотя сам по себе в химическом плане он не меняется. В нашем случае действует тот же принцип. Остаток *L*-рамнозы, присоединенный в положение 3 к остатку *D*-маннозы, находится в близком *цис*-положении с заместителем, присоединенным в положение 2. В случае полисахарида из *Sh. boydii*, тип 12, этим заместителем является *D*-глюкуроновая кислота, а в случае *E. coli* 07 — 4-ацетамидо-4,6-дидезоксид-*D*-глюкоза. Сближенные сахара, несомненно, взаимодействуют друг с другом и придают данному участку уникальную конфигурацию, принимаемую антителами за антигенную детерминанту. Мы полагаем, что такие составные детерминанты, образованные рамнозой и глюкуроновой кислотой, с одной стороны, и рамнозой и 4-ацетамидо-4,6-дидезоксид-*D*-глюкозой — с другой, настолько отличаются друг от друга, что несущие их антигены, несмотря на формальное химическое сходство, не проявляют серологического родства.

### Экспериментальная часть

*Бактерии и культивирование.* Типовые штаммы *Sh. boydii*, тип 12 (штамм 123), и *E. coli* 07 (штамм В1 7509-41) получены из Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. И. А. Тарасевича (Москва).

Клетки выращивали на твердой среде (мясопептонный агар, 37° С, 18 ч), смывали физиологическим раствором и бактериальную массу собирали центрифугированием (300 об/мин, 90 мин). Сырые клетки обрабатывали ацетоном и сушили на воздухе.

*Серологические методы.* Гипериммунные кроличьи антисыворотки были получены при 6-кратной иммунизации (через неделю) кроликов в ушную вену убитыми нагреванием бактериальными клетками ( $10^9$  клеток).

Для серологической характеристики ЛПС применялись следующие реакции: а) двойная иммунодиффузия по Оухтерлони [21]; б) реакция непрямой гемагглютинации и ее ингибирование специфическим полисахаридом [22]; в) реакция коаггутинации с клетками золотистого стафилококка [23]; г) иммуноэлектрофорез по [24], в веронал-ацетатном буфере (рН 8,6); д) иммуноферментный метод [25]; е) бактериальная агглютинация в соответствии с методикой [26]. Иммуноферментный метод применяли в следующем варианте: 100 мкл раствора ЛПС в 0,05 М трис-НСI-буфере (рН 7,3), содержащем 0,15 М NaCl (буфер I), вносили в лунки 96-луночных планшетов (micro-ELISA, Dynatech) и оставляли на 16 ч при 4° С. Планшеты промывали трижды буфером I, содержащим 0,05% твин-20 (буфер II), и дважды буфером I. Для пассивирования пластика в лунки вносили по 200 мкл 0,1% раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) в буфере I и инкубировали планшеты при 37° С в течение 40 мин. После отмывания (как описано выше) в лунки вносили раствор кроличьих антисывороток в растворе бычьего сывороточного альбумина и инкубировали 1,5–3 ч при 37° С. В отмытые лунки вносили раствор конъюгата (козы антитела против глобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена) в буфере II и инкубировали 2 ч при 37° С. После отмывания в лунки вносили по 100 мкл раствора субстрата (1% раствор *o*-фенилендиамина в 0,05 М цитратном буфере, рН 4,45, содержащий 0,003%  $H_2O_2$ ). Через 3–5 мин реакцию останавливали, добавляя по 100 мкл 0,1 н.  $H_2SO_4$ , и фотометрировали на приборе Uniskap (Flow, Англия) при 495 нм.

В опытах по ингибированию полисахаридами в лунки вносили смесь полисахаридов с антисыворотками, причем инкубацию проводили 3 ч при 37° С либо при 4° С в течение ночи.

*Спектральные и хроматографические методы.* Спектры  $^1H$ -ЯМР полисахаридов сняты на приборе Bruker-Physik WP-250 в  $D_2O$  при 70° С с ацетоном в качестве внутреннего стандарта; спектры  $^{13}C$ -ЯМР получены на том же приборе в  $D_2O$  при 40° С с использованием в качестве внутреннего стандарта метанола. ИК-спектр снимали на приборе UR-2 в таблетках с KBr. Оптическое вращение определяли на автоматическом поляриметре Perkin – Elmer 141.

ГЖХ выполняли на приборе Pye-Unicam, модель 64, с использованием стеклянной колонки (0,4×150 см) с 3% ECNSS-M на газхроме Q 100–200 меш (колонка А) и стальной колонки (0,6×150 см) с 3% SE-30 на диатомите CQ (колонка В). Хромато-масс-спектрометрию проводили на приборе Varian MAT Spom-111 с использованием тех же фаз.

Гель-хроматографию осуществляли на колонках (3,5×67; 1,7×70 см) с сефадексами G-50 и G-15 соответственно в 0,05 М пиридин-ацетатном буфере (рН 5,4); для детектирования использовали анализатор углеводов фирмы Technicon.

Ионообменная хроматография нейтральных моносахаридов выполнена на углеводном анализаторе Technicon на колонке (25×0,6 см) с анионообменной смолой DA×4 (Duglum, США) в 0,5 М боратном буфере (рН 9,0) при 55° С и скорости элюирования 60 мл/ч. Анализ гексозаминов проводили на колонке (0,9×27 см) с ионообменной смолой Chromex UA-8 с помощью анализатора аминокислот BC-200 (Bio-Cal) при элюировании 0,35 М натрий-цитратным буфером (рН 5,28) со скоростью 80 мл/ч.

Ионообменную хроматографию кислых олигосахаридов проводили на колонке (1,2×28 см) с анионитом AG 1×8 (100–200 меш) в ацетатной форме с использованием линейного градиента концентрации  $CH_3COOH$  (0–10%) со скоростью 4–5 мл/ч (общий объем элюента 600 мл).

Хроматографию на бумаге FN-11 проводили в системах *n*-бутанол – пиридин – вода, 6 : 4 : 3 (А), и этилацетат –  $CH_3COOH$  –  $HSO_4H$  – вода, 18 : 3 : 1 : 4 (В), а электрофорез с использованием той же бумаги – в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5 (27 В/см). Сахара на бумаге обнаруживали с помощью щелочного раствора нитрата серебра. Растворы упаривали в вакууме при 40° С.

*Определение моносахаридного состава.* Полисахарид или олигосахариды (1 мг/мл) гидролизовали 3 ч 2 М HCl при 100° С в запаянной ампуле. После упаривания в вакууме и высушивания над КОН остаток ана-

лизировали хроматографией на бумаге в системе А, с помощью углеводного анализатора и методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов после дезаминирования [14]. Аминосахара определяли после гидролиза полисахарида (0,5 мг/мл) 4 М HCl при 100°С в течение 16 ч.

Для определения абсолютной конфигурации моносахаридных компонентов ПС2 был подвергнут гидролизу, и из гидролизата препаративной хроматографией на бумаге в системе А были выделены рамноза, манноза, галактоза, глюкоза и 2-амино-2-дезоксиглюкоза. Значения оптического вращения ( $[\alpha]_D$ ) для выделенных моносахаридов составили: для рамнозы +5,1° (с 0,54, вода), для маннозы +10,8° (с 0,63, вода), для глюкозы +49,0° (с 0,52, вода), для галактозы +77,6° (с 0,69, вода), для гидрохлорида 2-амино-2-дезоксиглюкозы +70,5° (с 0,34, вода)\*.

*Модифицированные полисахариды (ПС1, ПС2, ПС3).* а. 10 мг специфического полисахарида из *Sh. boydii*, тип 12, растворяли в 5% растворе триэтиламина в воде (2,5 мл). Через 18 ч смесь разбавляли в 3–4 раза водой и встряхивали с катионообменной смолой КУ-2 (H<sup>+</sup>-форма, 5 мл). Фильтрат лиофилизовали и получали 9 мг дезацетилированного полисахарида (ПС1).

б. Нативный полисахарид (10 мг) растворяли в сухом диметилсульфоксиде (2 мл), прибавляли по каплям эфирный раствор диазометана (1,0 мл) и выдерживали 1 ч при 20°С. Эфир упаривали в вакууме, из остатка после гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-50 выделяли 10 мг полимера, который, по данным электрофореза на бумаге, является нейтральным и представляет собой метиловый эфир полисахарида (ПС3).

в. Образец ПС3 (5 мг) растворяли в 2 мл натрий-боратного буфера (рН 7,7) и добавляли небольшими порциями 20 мг K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> в течение 30 мин. Смесь выдерживали 1 ч, подкисляли CH<sub>3</sub>COOH до рН 3,5–4,0 и деионизировали на колонке с сефадексом G-50. Фракции, выходящие в свободном объеме колонки, лиофилизовали и получали О-дезацетилированный восстановленный полисахарид (ПС2) с выходом 3,5 мг. ПС2 являлся нейтральным по данным электрофореза на бумаге.

*Анализ методом метилирования.* Высушенный в вакууме при 60°С над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> полисахарид (10 мг) метилировали по стандартной методике [9]. Полученную реакционную смесь разбавляли небольшим количеством воды и фракционировали на колонке с сефадексом G-50. Выделенный таким образом метилированный полисахарид подвергли метанолизу 1 М HCl в MeOH (100°С, 20 ч). Метанолизат упаривали и остаток исследовали методом хроматомасс-спектрометрии в виде ацетатов метилгликозидов с использованием колонки В при 200°С. Другую часть метилированного полисахарида после гидролиза 0,25 М HCl (100°С, 16 ч) превращали в ацетаты полиолов [10] и также исследовали методом хроматомасс-спектрометрии на колонке А при 170°С.

*Частичный кислотный гидролиз.* Раствор 130 мг полисахарида в 50 мл 0,5 М HCl нагревали 30 мин при 100°С, после двукратного разбавления водой лиофилизовали. Раствор остатка в 2 мл пиридин-ацетатного буфера наносили на колонку с сефадексом G-15. Элюирование проводили со скоростью 0,32 мл/мин, собирая фракции по 1,5 мл. Определение олигосахаридного материала во фракциях проводили с помощью анализатора углеводов и электрофореза на бумаге. Повторной гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-15 фракций, обогащенных ди- и трисахаридным материалом (фракции 65–72 и 53–64 соответственно), были выделены индивидуально, по данным электрофореза на бумаге и хроматографии на бумаге (система Б), а также ионообменной хроматографии на анионите в ацетатной форме, биоуроновая кислота (1) (выход 5,3 мг,  $[\alpha]_D$  –27° (с 0,5, вода),  $E_{G1cA}$  0,8;  $R_{G1cA}$  0,74) и триуроновая кислота (2) (выход 4,8 мг,  $[\alpha]_D$  +13° (с 0,45, вода),  $E_{c.cA}$  0,53;  $R_{G1cA}$  0,47). Смесь тетрасахари-

\* В случае L-рамнозы и D-маннозы подтверждение их абсолютной конфигурации было получено также после превращения их в соответствующие α-метилгликозиды (метанолиз 1 М HCl в MeOH, 20 мин, 100°С) и измерения угла вращения плоскости поляризации света.

дов (фракции 47–52) была подвергнута разделению на колонке (1×8 см) с катионитом КУ-2 в Н<sup>+</sup>-форме. Элюцию проводили сначала водой (50 мл), а затем 0,25 М НСl (75 мл). Из кислого элюата был получен тетрасахарид (3), дополнительная очистка которого была проведена методом хроматографии на бумаге в системе Б (выход 2,4 мг,  $[\alpha]_D +30^\circ$  (с 0,2, вода),  $R_{GICA}$  0,15). При анализе смеси тетрасахаридов, находящихся в водном элюате, методом хроматографии на бумаге в системе Б оказалось, что она содержит два тетрасахарида с близкой хроматографической подвижностью (тетрасахариды (4) и (5),  $R_{GICA}$  0,31 и 0,39 соответственно), которые были разделены препаративной хроматографией на бумаге в системе Б. Выход тетрасахарида (4) составил 3,5 мг,  $[\alpha]_D +42^\circ$  (с 0,3, вода), выход тетрасахарида (5) – 4,2 мг,  $[\alpha]_D +26^\circ$  (с 0,4, вода).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dmitriev B. A., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. Eur. J. Biochem., 1976, v. 64, № 3, p. 491–498.
2. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. Eur. J. Biochem., 1977, v. 79, № 1, p. 113–115.
3. Sedlak J., Rische H. Enterobacteriaceae Infektionen. Leipzig: G. Thieme, 1961, p. 279–310.
4. Dmitriev B. A., Lvov V. L., Tochtamysheva N. V., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Jann K. Eur. J. Biochem., 1983, v. 134, № 3, p. 517–521.
5. Lvov V. L., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Jann B., Jann K. Carbohydr. Res., 1984, v. 126, № 2, p. 249–259.
6. Westphal O., Jann K. Methods Carbohydr. Chem., 1965, v. 5, p. 83–91.
7. Jann K., Jann B. Eur. J. Biochem., 1967, v. 2, № 1, p. 26–29.
8. Dmitriev B. A., Backinovsky L. V., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hoffman I. L. Eur. J. Biochem., 1975, v. 50, № 3, p. 539–547.
9. Conrad H. E. Methods Carbohydr. Chem., 1972, v. 6, p. 361–364.
10. Jansson P. E., Kenne L., Liedgren H., Lindberg B., Lönngren J. Chem. Commun. Univ. Stockholm, 1976, v. 8, p. 5–20.
11. Dmitriev B. A., Backinovsky L. V., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hoffman I. L. Eur. J. Biochem., 1977, v. 78, № 2, p. 381–387.
12. Cyr N., Perlin A. S. Can. J. Chem., 1979, v. 57, p. 2504–2511.
13. Шапков А. С., Гуляев Н., Свиридов А. Ф., Горин С. Е. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1639–1646.
14. Shashkov A. S., Evstigneev A. Yu., Derevitskaya V. A. Carbohydr. Res., 1979, v. 72, № 1, p. 215–217.
15. Bock K., Pedersen C. Adv. in Carbohydr. Chem. and Biochem., 1983, v. 41, p. 27–66.
16. Jann B., Jann K. In: Surface carbohydrates of procariotic cell/Ed. Sutherland I. W. Acad. Press, 1977, p. 447–487.
17. Nghien H.-O., Stanb A. M., Galanos C., Lüderitz O. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 3, p. 431–436.
18. Jann K., Westphal O. In: The Antigens/Ed. Sela M. Acad. Press, 1975, v. III, p. 1–125.
19. Ørskov I., Ørskov F., Jann B., Jann K. Bacteriol. Rev., 1977, v. 41, p. 667–710.
20. Kenne L., Lindberg B., Petersson K., Katzenellenbogen E., Romanovska E. Eur. J. Biochem., 1978, v. 91, № 2, p. 279–284.
21. Ouchterlony Ö., Nilsson L.-Å. In: Handbook of experimental immunology/Ed. Weir D. M. Osney Mead, Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1969, p. 19.17–20.
22. Herbert W. J. In: Handbook of experimental immunology/Ed. Weir D. M. Osney Mead, Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1969, p. 20.3–6.
23. Jonsson S., Kronvall G. Eur. J. Immunol., 1974, v. 4, № 1, p. 20–24.
24. Grabar P., Williams C. Biochim. et biophys. acta, 1963, v. 10, p. 193–201.
25. Ruitenberg E. J., Streeberg P. A., Bros B. J. M., Buys J. J. Immunol. Methods, 1976, v. 10, p. 67–83.
26. Лебедева М. Н. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. М.: Медицина, 1973, с. 138.

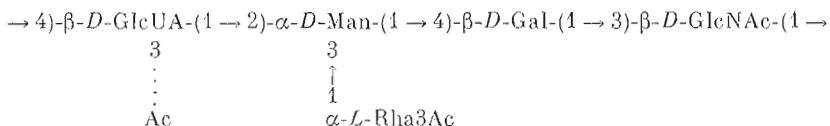
Поступила в редакцию  
27.XI.1985

SOMATIC ANTIGENS OF *SHIGELLA* AND *ESCHERICHIA COLI*.  
 STRUCTURE ELUCIDATION OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE FROM  
*SHIGELLA BOYDII*, TYPE 12, AND INVESTIGATION  
 OF ITS SEROLOGICAL PROPERTIES IN COMPARISON WITH O-SPECIFIC  
 POLYSACCHARIDE FROM *E. COLI* 07

L'VOV V. L., LAPINA E. B., BELAYA O. F., PLUZHNIKOVA G. N.,  
 SHASHKOV A. S., DMITRIEV B. A.

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

The structure of the O-specific polysaccharide of the somatic antigen (lipopolysaccharide) of *Shigella boydii*, type 12, was established by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR, methylation analysis and partial acid hydrolysis methods. The polysaccharide consists of pentasaccharide repeating units of the following structure:



The amount of O-acetyl groups was far less than stoichiometric, only about 2 for 3–4 repeating units. Nevertheless, the results of serological studies revealed 3-O-acetyl- $\alpha$ -L-rhamnose residue to be the major immunodominant group. In spite of the presence of similar trisaccharide fragments, the lipopolysaccharide and polysaccharide from *Shigella boydii* type 12 gave no crossreaction with lipopolysaccharide and polysaccharide from *Escherichia coli* 07. The possible reasons of the absence of serological relatedness between the *Sh. boydii*, type 12, and *E. coli* 07 cells were discussed.