

Рис. 1. Спектр ПМР специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 4

глютинации с антисывороткой к живой культуре в дозе 12,5 мкг/мл и, следовательно, являясь типоспецифическим, но был неактивен в реакции с антисывороткой против гретых клеток. Олигосахаридная фракция (кор и продукты расщепления специфической цепи) была серологически неактивна 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, $[\alpha]_D +4^\circ$ (с 0,8; вода). В его ИК-спектре имелись полосы поглощения сложноэфирной (1730, 1250 см^{-1}) и ацетамидной (1640, 1560 см^{-1}) групп, а в спектре ПМР (рис. 1) — сигналы С-метильных групп в виде двух наложившихся дублетов (δ 1,16 м.д., J 4,5 Гц, 6-Н), N-ацетильной группы (δ 1,99 м.д., 6-Н), O-ацетильной группы (δ 2,10 м.д., 3-Н) и пяти аномерных протонов (δ 4,98 м.д., 1-Н и 5,16 м.д., 4-Н).

Из физико-химических характеристик следовало, что полисахарид, по-видимому, построен из пентасахаридных звеньев, в состав которых входят два остатка N-ацетилгексозамина, два остатка 6-дезоксигексозы, один остаток кислого моносахарида и одна O-ацетильная группа.

В гидролизате полисахарида с помощью углеводного и аминокислотного анализаторов, хроматографии и электрофореза на бумаге были идентифицированы фукоза, глюкуроновая кислота, глюкозамин и небольшое количество глюкозы и галактозы. Количественное содержание идентифицированных сахаров приведено в таблице.

Для одновременного количественного определения нейтральных сахаров и глюкозамина гидролизат полисахарида был подвергнут дезаминированию азотистой кислотой и восстановлен натрийборгидридом. Количественное определение полученных полиолов методом ГЖХ [3] дало результаты, хорошо согласующиеся с данными таблицы.

Таким образом, из приведенных выше данных следовало, что повторяющимся звеном полисахарида является пентасахарид, построенный из остатков фукозы, N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты в соотно-

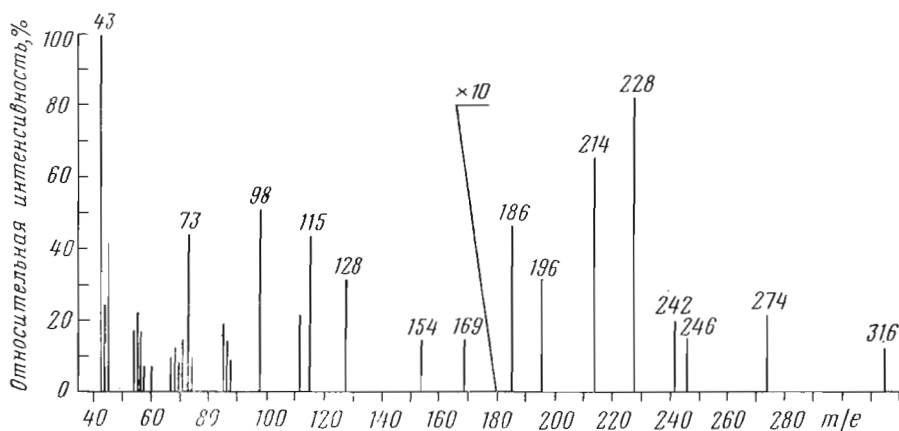


Рис. 2. Масс-спектр 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксид-3,4-ди-О-ацетил-6-О-метил- α , β -метил-D-глюкопиранозид из специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 4

шении 2 : 2 : 1, тогда как глюкоза и галактоза, обнаруженные в небольших количествах, — компоненты кора. Абсолютная конфигурация сахаров была определена следующим образом: L-фукоза и D-глюкозамин были выделены хроматографией на бумаге и идентифицированы по величине оптического вращения; D-конфигурация глюкуроновой кислоты следовала из идентификации в гидролизате восстановленного по карбоксильным группам полисахарида D-глюкозы с помощью D-глюкооксидазы. Данные моносахаридного состава восстановленного полисахарида, полученного по модифицированному методу [3], приведены в таблице.

Для выяснения характера замещения моносахаридных остатков в цепи специфический и восстановленный полисахариды были подвергнуты метилированию с последующей идентификацией частично метилированных сахаров методом ГЖХ-масс-спектрометрии. Часть метилированного специфического полисахарида гидролизовали и идентифицировали частично метилированные нейтральные сахара в виде соответствующих ацетатов полиолов, используя данные по их фрагментации [4]. При этом в качестве главных компонентов были обнаружены 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4-три-О-метил-фуцит и 1,3,5-три-О-ацетил-2,4-ди-О-метил-фуцит в соотношении 1 : 1. Следовательно, один из остатков фукопиранозы замещен в положение 3, а другой не замещен и представляет собой невосстановливающий конец боковых цепей. При исследовании восстановленного полисахарида методом метилирования наряду с ацетатами частично метилированных фуцитов в эквивалентном количестве был идентифицирован 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метил-сорбит. Следовательно, глюкуроновая кислота, из которой в процессе восстановления образовалась глюкоза, замещена в полисахариде в положение 4.

Другая порция метилированного полисахарида была подвергнута метанолизу с последующим ацетилированием и частично метилированные производные глюкозамина были идентифицированы в виде соответствующих гликозидов. Анализ показал наличие 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксид-3-О-ацетил-4,6-ди-О-метил- α , β -метил-глюкопиранозид, время удерживания и масс-спектр которого совпали с таковыми для заведомого образца [5]. Кроме того, был идентифицирован 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксид-3,4-ди-О-ацетил-6-О-метил- α , β -метил-глюкопиранозид, масс-спектр которого (рис. 2) был аналогичен спектру соответствующего галактопроизводного [6].

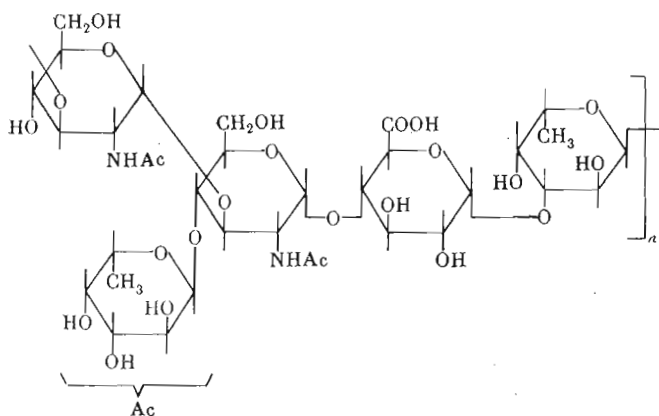
Таким образом, один из остатков N-ацетилглюкозамина замещен в положение 3, а другой — в положения 3 и 4.

Количественный моносахаридный состав полисахаридов, % по весу

Полисахариды	Глюкозамин	Фукоза	Глюкоза	Гликуроновая кислота
Кислый	32,5	28,6	5,6	18,1
Нейтральный	31,3	35,1	24,9	<1

Из данных анализа методом метилирования следовало, что полисахарид разветвлен, причем в узле разветвления находится остаток N-ацетилглюкозамина, а на конце боковых цепей — остаток фукозы.

Для выяснения последовательности моносахаридных остатков в полисахаридной цепи был применен парциальный гидролиз (0,3 н. HCl, 100°, 30 мин). Из гидролизата с помощью ионообменной хроматографии были выделены три кислых олигосахарида (схема), индивидуальных по данным



- GlcUA (1 → 3) Fuc (1)
- GlcNAc (1 → 4) GlcUA (1 → 3) Fuc (2)
- GlcNAc (1 → 3) GlcNAc (1 → 4) GlcUA (1 → 3) Fuc (3)
- ↓
- GlcNAc (1 → 3) GlcNAc (1 → 4) GlcUA (1 → 3) Fuc-ol (4)
- Fuc (1 → 3) GlcNAc (1 → 3) GlcNAc (1 → 2)-Erythritol (5)
- Fuc (1 → 4) 2,5-Anhydro-Man-ol (6)
- Glc (1 → 3) Fuc (1 → 4) 2,5-Anhydro-Man-ol (7)

электрофореза и хроматографии на бумаге. Восстанавливающий конец олигосахарида определяли по исчезновению соответствующего сахара после окисления бромом, а моносахаридный состав — с помощью анализа гидролизата методом ГЖХ, хроматографии и электрофореза на бумаге. Результаты установления строения кислых фрагментов полисахаридной цепи показали, что наиболее подвижный олигосахарид представляет собой глюкуронозилфукозу (дисахарид 1), следующий по подвижности — трисахарид 2, содержащий эквивалентные количества фукозы, N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, а наименее подвижный — тетрасахарид 3, построенный из N-ацетилглюкозамина, глюкуроновой кислоты и фукозы в соотношении 2 : 1 : 1.

Для выяснения характера замещения остатков N-ацетилглюкозамина олигосахарид 3 был восстановлен натрийборгидридом и полученный оли-

госахарид 4 исследован методом метилирования с последующим анализом метилированных производных N-ацетилглюкозамина в виде ацетатов метилгликозидов с помощью ГЖХ-масс-спектрометрии. При этом были идентифицированы 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксиглюкозил- α , β -метил-глюкопиранозид и 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксиглюкозил- α , β -ди-O-метил- α , β -метил-глюкопиранозид в соотношении 1:1. Масс-спектры полученных метил-глюкозаминидов были идентичны спектрам соответствующих глюкозаминидов, описанных нами при установлении строения специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 2 [6]. Таким образом, из данных парциального гидролиза следовало, что в полисахариде два остатка N-ацетилглюкозамина соединены последовательно и что, как минимум, три сахара, а именно -GlcNAc-GlcUA-Fuc-, находятся в главной цепи.

Дальнейшую информацию о расположении моносахаридных остатков в цепи получили с помощью распада по Смуту восстановленного полисахарида. Поскольку характер замещения моносахаридов был уже известен, ожидалось, что окислению подвергнутся концевая фукоза и остаток глюкопиранозы, находящийся в цепи. Восстановленный полисахарид окислили периодатом и восстановили боргидридом натрия. Окисленный полимер выделили гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-25 и подвергли мягкому кислотному гидролизу. Полученный олигосахарид 5 (см. схему) выделили гель-хроматографией на сефадексе G-15 и очистили хроматографией на бумаге. Гидролизат олигосахарид 5 дезаминировали и исследовали методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов. При этом идентифицированы эритрит, фуцит и 2,5-ангидро-маннит, соответствующий остатку глюкозамина, в соотношении 1:1:2. Метилирование олигосахарид 5 с последующим метанолизом и ацетилированием привело к идентификации методом ГЖХ-масс-спектрометрии 2-(N-метил)ацетамидо-2-дезоксиглюкозил- α , β -метил-глюкопиранозид. Из приведенных данных следовало: 1) олигосахарид 5 имеет линейную структуру, приведенную на схеме; таким образом, в главной цепи специфического полисахарида имеется последовательность из четырех моносахаридных остатков -Fuc-GlcNAc-GlcNAc-GlcUA-, 2) боковая цепь представлена только остатком фукозы, присоединенным к одному из остатков N-ацетилглюкозамина в положение 4.

Для идентификации места присоединения боковой цепи применили метод избирательного расщепления полисахарида по гексозаминидным связям с помощью реакции N-дезацетилирования с последующим дезаминированием [7]. Однако N-дезацетилирование восстановленного полисахарида гидразином в присутствии гидразинсульфата протекало только на 30—35%, хотя этот метод давал отличные результаты в случае других гексозаминогликанов. Поэтому был использован недавно предложенный метод щелочного омыления в DMSO [8]. N-Дезацетилирование в DMSO сопровождалось значительной деструкцией полимера, но тем не менее привело к модифицированному полисахариду, движущемуся при электрофорезе на бумаге к катоду в виде одной гомогенной зоны. При дезаминировании полученного полисахарида, содержащего свободные аминогруппы, азотистой кислотой происходила полная деполимеризация цепи и образовывались три олигосахариды, которые после восстановления боргидридом натрия были выделены хроматографией на бумаге и имели подвижности 0,89; 0,64 и 0,43 относительно фукозы. Гидролизат каждого из полученных олигосахаридов был исследован методом ГЖХ. Наиболее подвижный олигосахарид 6 оказался дисахаридом фукозил-2,5-ангидро-маннитом и соответствовал в полисахариде фрагменту, представляющему остаток N-ацетилглюкозамина с присоединенной к нему фукозой. Олигосахарид 7 имел наименьшую подвижность и представлял собой трисахарид глюкозил-фукозил-2,5-ангидро-маннит.

Идентификация этих олигосахаридов строго доказывала, что боковая цепь в полисахариде присоединена к остатку N-ацетилглюкозамина, соседнему с глюкуроновой кислотой, как показано на схеме.

Олигосахарид с R_f 0,64 образовывался в незначительном количестве и представлял собой дисахарид глюкозил — фуцит.

Образование в результате реакции дезаминирования небольших количеств олигосахаридов, не содержащего остатка 2,5-ангидро-маннозы, наблюдалось нами ранее в случае 1 → 3-замещенных гексозаминогликанов [5] и объяснялось механизмом реакции дезаминирования, включающим в качестве побочного направления атаку атомом C4 по атому C2 в диазотий-катионе с последующим сужением цикла и превращением остатка глюкозамина в производное 2-C-формил-2-дезоксирибофуранозы.

Для определения конфигурации гликозидных связей был использован метод окисления ацетилированных гликозидов хромовым ангидридом [9, 10]. При окислении хромовым ангидридом ацетата восстановленного полисахарида оказалось, что все моносахаридные остатки устойчивы и, следовательно, связаны α-гликозидными связями. Этот вывод подтверждается данными спектра ПМР восстановленного полисахарида, в котором сигналы всех пяти аномерных протонов лежат в области $\delta \sim 5$ м.д. [11, 12].

Невыясненным пунктом в структуре специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 4 остается положение O-ацетильной группы. Однако этот вопрос в данном случае не может быть решен с помощью известного в химии углеводов метода [13], так как последний включает жесткую щелочную обработку продукта взаимодействия полисахарида с метилвиниловым эфиром. При такой обработке полисахариды, содержащие остатки 4-O-замещенных уроновых кислот и 3-O-замещенных моносахаридов, должны претерпевать полную деструкцию вследствие β-элиминации. Тем не менее можно предположить, что O-ацетильная группа присоединена к остатку концевой фукозы. Это предположение основано на том факте, что при периодатном окислении полисахарида остаток концевой фукозы окисляется медленно, тогда как на предварительно омыленном полисахариде такое окисление протекает быстро.

Таким образом, на основании всех приведенных выше данных повторяющемуся звену специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 4 может быть приписана структура кислого разветвленного пентасахаридов, представленная на схеме.

В предыдущем сообщении [1] отмечалось, что специфические полисахаридные цепи соматических антигенов *Sh. dysenteriae* в соответствии со своей химической природой образуют две группы — кислую и нейтральную. Более того, серотипы, отнесенные к той или иной группе на основании химических критериев, попадали в ту же группу и на основании своих серологических свойств. Так, антигены серотипов с кислыми полисахаридными цепями термолабильны и этим напоминают капсульные антигены типа В, тогда как антигены с нейтральными цепями термостабильны.

Результаты, полученные в настоящей работе, подтверждают эту концепцию, связывающую проявление биологической функции с химическим строением специфического участка молекулы антигена. Специфический полисахарид *Sh. dysenteriae* тип 4 по своей химической природе кислый и, кроме того, содержит кислотоллабильные гликозидные связи, а сам антиген термолабилен. Наиболее вероятно, что термолабильность этого антигена обусловлена процессом автогидролиза специфической полисахаридной цепи.

Экспериментальная часть

Специфический липополисахарид получен из сухих бактериальных клеток *Sh. dysenteriae* тип 4, штамм 4780, экстракцией водным фенолом с последующим отделением нуклеиновых кислот по стандартной методике

[2]. Получение и выделение специфического полисахарида, его характеристика физико-химическими методами, определение моносахаридного состава, исследование методами метилирования и окисления хромовым ангидридом, а также серологические тесты выполнены, как описано в [13]. Количественные определения сахаров осуществлены по стандартным методикам: глюкуроновая кислота определена по реакции с карбазол-серной кислотой [14], фукоза — по реакции с цистеин-серной кислотой [15], *D*-глюкоза — по реакции с *D*-глюкозооксидазой [16].

Парциальный гидролиз специфического полисахарида. 40 мг специфического полисахарида гидролизовали 30 мин 10 мл 0,3 н. HCl при 100°, остаток после упаривания сушили в вакууме над гидроокисью натрия, в небольшом количестве воды наносили на колонку (10 × 0,8 см) с дауэксом 1 × 8 в ацетатной форме, колонку промывали 50 мл воды, а затем элюировали кислые олигосахариды в линейном градиенте уксусной кислоты (конечная концентрация кислоты 10%, общий объем элюента 200 мл), поддерживая скорость элюции 3 мл/ч и собирая фракции по 1,5 мл. Контроль за разделением осуществляли с помощью электрофореза на бумаге. Выделенные таким образом олигосахариды индивидуальны по данным хроматографии на бумаге в системе этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 18 : 3 : 1 : 4 (система А).

Получение восстановленного по карбоксильным группам полисахарида. К 100 мг специфического полисахарида в 5 мл DMSO прибавляли эфирный раствор диазометана до появления исчезающей желтой окраски, через 30 мин эфир упаривали, остаток диализовали 3 дня против дистиллированной воды и после лиофилизации получали 95 мг метилового эфира полисахарида, нейтрального по данным электрофореза на бумаге. Полученный таким образом полисахарид растворяли в 3 мл насыщенного водного раствора H_3BO_3 , к смеси при перемешивании небольшими порциями прибавляли в течение 1 ч 30 мг боргидрида натрия, реакционную смесь подщелачивали 1 н. раствором NaOH до pH 9—9,5, через 16 ч раствор подкисляли CH_3COOH до pH 5 и наносили на колонку с сефадексом G-50. Фракции, выходящие со свободным объемом, объединяли, лиофилизовали и получали 83 мг восстановленного по карбоксилу полисахарида, $[\alpha]_D^{+11}$ (с 1,4; вода). Полисахарид нейтрален по данным электрофореза на бумаге, и его гидролизат не содержит кислых компонентов.

Распад по Смитчу. 25 мг восстановленного полисахарида окисляли в течение 120 ч в темноте 0,1 М водным раствором периодата натрия (5 мл), к раствору прибавляли 100 мг $NaBH_4$, через 16 ч реакционную смесь подкисляли концентрированной CH_3COOH до pH 5 и фракционировали на колонке с сефадексом G-50. Фракции, выходящие со свободным объемом, объединяли и после лиофилизации получали 20 мг окисленного полисахарида, который далее обрабатывали в течение 48 ч при комнатной температуре 10 мл 0,5 н. раствора HCl. Гидролизат лиофилизовали, остаток хроматографировали на колонке с сефадексом G-15 (130 × 1,8 см), собирая фракции по 5 мл. Фракции, соответствующие олигосахаридным компонентам, объединяли, упаривали и подвергали препаративной хроматографии на бумаге в системе А, выделяя основной компонент, имеющий R_f 1,24 относительно лактозы.

Избирательное расщепление восстановленного полисахарида методом N-деацетилирования-дезаминирования. К охлажденной до 0° смеси 40 мг восстановленного полисахарида в 4 мл воды и 400 мг тиофенолята натрия прибавляли 20 мл 2 М метилсульфиниланиона, полученного по методике [17]. Реакционную смесь нагревали 16 ч в запаянной ампуле при 100°, фильтровали, диализовали 3—4 дня против дистиллированной воды, лиофилизовали, дополнительно очищали гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-50 и получали 15 мг N-деацетилированного полисахарида, имеющего R_f 0,4 относительно глюкозамина. Модифицированный полисахарид растворяли в 0,6 мл воды, обрабатывали 40 мин 1 мл 33% водного

раствора CH_3COOH и 1 мл 5% водного раствора нитрита натрия при 20° , реакционную смесь перемешивали с 3 мл катионита КУ-2 (H^+ -форма), смолу отфильтровывали, фильтрат лиофилизovali, растворяли в 1 мл воды, восстанавливали 20 мг NaBH_4 в течение 16 ч и после обычной обработки получали смесь гликозилполиолов, которую подвергали разделению с помощью препаративной хроматографии на бумаге в системе А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев В. А., Книрель Ю. А., Шеремет О. К., Кочетков Н. К., Гофман И. [Л. (1977) Биоорган. химия, **3**, 1219—1225.
2. Westphal O., Jann K. (1965) in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler R. L., Wolfrom M. L., eds.), vol. 5, pp. 83—94, Acad. Press, New York — London.
3. Дмитриев В. А., Бакновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хм., **10**, 2335—2338.
4. Bjordal H., Lindberg B., Svensson S. (1967) *Carbohydr. Res.*, **5**, 433—440.
5. Dmitriev V. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **66**, 559—566.
6. Dmitriev V. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L., Capek K. (1977) *Eur. J. Biochem.*, in press.
7. Dmitriev V. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. (1975) *Carbohydr. Res.*, **40**, 365—372.
8. Erbing C., Granath K., Kenne L., Lindberg B. (1976) *Carbohydr. Res.*, **47**, C5 — C7.
9. Angyal S. J., James K. (1970) *Carbohydr. Res.*, **12**, 124—131.
10. Hoggman J., Lindberg B., Svensson S. (1972) *Carbohydr. Res.*, **26**, 661—666.
11. Bebault G. M., Choy J. M., Dutton G. G. S., Funnell N., Steffen A. M., Jang M. T. (1973) *J. Bacteriol.*, **113**, 1345—1347.
12. Hellerquist C. G., Lindberg B., Svensson S., Holme T., Lindberg A. A. (1968) *Carbohydr. Res.*, **8**, 43—45.
13. Dmitriev V. A., Backinowsky L. V., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **50**, 539—547.
14. Bitter T., Muir H. M. (1962) *Anal. Biochem.*, **4**, 330—334.
15. Dische Z. (1962) in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler R. L., Wolfrom M. L., eds.), vol. 1, pp. 501—503, Acad. Press, New York — London.
16. Kruger L., Lüderitz O., Strcminger J. L., Westphal O. (1962) *Biochem. Z.*, **335**, 548—558.
17. Conrad H. E. (1972) in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler R. L., FcMiller J. N., eds.), vol. 6, pp. 361—364, Acad. Press, New York — London (Методы исследования углеводов (1975) с. 276—278, «Мир», М.).

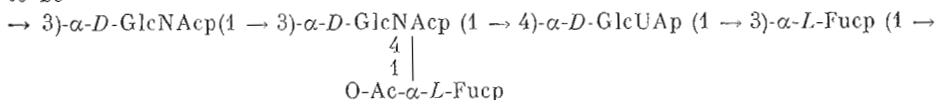
Поступила в редакцию
23.III.1977

ANTIGENIC POLYSACCHARIDS OF BACTERIA. VI. THE STRUCTURE OF O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE CHAIN OF *SHIGELLA DYSENTERIAE* TYPE 4 LIPOPOLYSACCHARIDE

DMITRIEV V. A., L'VOV V. L., KOCHETKOV N. K.,
HOFFMAN I. L.

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

On mild acid hydrolysis of lipopolysaccharide from *Shigella dysenteriae* type 4, followed by fractionation of the «degraded polysaccharide» on Sephadex G-50 column the specific polysaccharide was obtained. It consists of 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucose, *L*-fucose and *D*-glucuronic acid in the 2 : 2 : 1 ratio. Each repeating unit of the polysaccharide contains one O-acetyl group. Methylation analysis indicated that the specific polysaccharide represents a branched chain with *L*-fucose terminal residues. The sequence of monosaccharide units was inferred from the structure of a series of oligosaccharides obtained on partial hydrolysis, Smith degradation, and selective cleavage of glucosidic bonds by *N*-deacetylation-deamination method. The configurations of glucosidic linkages were determined using chromic anhydride oxidation method. On the basis of presented data, the structure of the chemical repeating unit of the polysaccharide was concluded to be



Serological properties of *Sh. dysenteriae* antigens are discussed in relation to chemical structure of their specific polysaccharides.