



УДК 547.458.02+577.11

## АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ

9\*. ИДЕНТИФИКАЦИЯ 2-АМИНО-2-ДЕЗОКСИ-*D*-ГАЛАКТУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ  
В СОСТАВЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ГЕКСОЗАМИНОГЛИКАНА *SHIGELLA*  
*DYSENTERIAE* ТИП 7Дмитриев В. А., Данишин В. М., Енурель Ю. А.,  
Кочетков Н. К., Гофман И. Л.Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва

В составе специфического полисахарида соматического антигена *Shigella dysenteriae* тип 7 идентифицированы 2-амино-2-дезоксид-галактуронозная кислота, 2-амино-2-дезоксид-глюкоза и глицин в соотношении 2 : 1 : 1.

В работе по иммунохимическому исследованию соматических антигенов бактерий группы *Shigella dysenteriae* были рассмотрены данные по хемотипированию и серологическим характеристикам липополисахаридов (ЛПС) всех 10 серологических типов [2]. В ходе установления химического строения специфических полисахаридных цепей ЛПС *Sh. dysenteriae* в их составе были обнаружены кислые сахара — глюкуронозная кислота [1, 3], 4,6-О-карбокситетрагалактоза [4], а также новый класс кислых сахаров [5, 6], получивших название «гликолактиловые кислоты».

В настоящей работе мы приводим данные по определению мономерного состава специфической цепи ЛПС *Sh. dysenteriae* тип 7, главным компонентом которого оказался редко встречающийся в природе кислый сахар — 2-амино-2-дезоксид-галактуронозная кислота.

Антигенный ЛПС был выделен из сухих бактериальных клеток *Sh. dysenteriae* тип 7 экстракцией водным фенолом при нагревании и очищен ультрацентрифугированием при 105000 *g*. В соответствии с данными серологических тестов ЛПС обладал высокой типовой специфичностью. Минимальная активная доза ЛПС в реакции пассивной гемагглютинации с антисывороткой к живой культуре составила 3,2 мкг/мл, а в случае гретой (100°) и автоклавированной (120°) культур — 6,25 мкг/мл. После гидролиза ЛПС 1% уксусной кислотой, отделения липида и гель-хроматографии углеводной фракции на сефадексе G-50 выделен полисахарид, выходящий с холостым объемом колонки, и олигосахарид «кора». Полисахарид ингибировал реакцию пассивной гемагглютинации с антисывороткой к живой культуре в дозе 0,8 мкг/мл и, следовательно, обуславливал типовую специфичность бактерии. Олигосахаридная фракция «кора» была серологически неактивна и далее не исследовалась.

\* Сообщение 8 см. [1].

В ИК-спектре полисахарида наряду с полосами гидроксильных групп имелаь очень слабая полоса свободной карбоксильной группы ( $1730\text{ см}^{-1}$ ) и интенсивные полосы вторичных амидных групп ( $1650$  и  $1570\text{ см}^{-1}$ ). Из данных спектра ПМР следовало, что полисахарид содержит N-ацетильные группы ( $2,0\text{—}2,1$  м.д.), C-метильные группы (дублетный сигнал при  $1,1$  м.д., составивший по интенсивности  $\sim 20\%$  от сигнала N-ацетильных групп); в области аномерных протонов ( $4,7\text{—}5,4$  м. д.) спектр было трудно интерпретировать. По данным электрофореза на бумаге и ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, полисахарид был гомогенным и проявлял кислотные свойства.

Определение моносахаридного состава полисахарида с помощью кислотного гидролиза или формолиза оказалось безуспешным, так как гидролиз осложнялся глубокой деструкцией вещества. Анализ гидролиза с помощью углеводного анализатора показал отсутствие нейтральных сахаров, тогда как аминокислотный анализатор позволил обнаружить сложную смесь аминосоединений. Расщепление полисахарида, не сопровождающееся столь значительной деструкцией мономерных единиц, было осуществлено только с помощью метанолиза. В результате метанолиза полисахарида с последующим N-ацетилированием образовавшейся смеси метилгликозидов и их кислотным гидролизом были получены обнаруженные с помощью аминокислотного анализатора глицин, глюкозамин и неизвестное аminosоединение в соотношении  $\sim 1 : 1 : 2$ . Нейтральные сахара и уроновые кислоты, как следовало из данных анализа полученного гидролизата с помощью углеводного анализатора и электрофореза на бумаге (рН 4,5), в составе полисахарида практически отсутствовали. На отсутствие в составе полисахарида остатков уроновых кислот указывал также и тот факт, что после восстановления продуктов метанолиза боргидридом натрия и последующего кислотного гидролиза в смеси по-прежнему не обнаруживались нейтральные сахара.

Глицин был выделен из гидролизата продуктов метанолиза полисахарида с помощью препаративной хроматографии на бумаге, а глюкозамин и неизвестное аminosоединение были далее разделены с помощью препаративного электрофореза на бумаге в щелочном буфере. Выделенные глицин и глюкозамин были идентифицированы сопоставлением с известными образцами с помощью хроматографии на бумаге и аминокислотного анализатора. Глюкозамин обладал положительным вращением и, следовательно, относился к *D*-ряду.

Выделенное неизвестное аminosоединение обнаружилось на бумаге реагентами на восстанавливающие сахара и диольные группировки, давало положительную реакцию с нингидрином, при электрофорезе в щелочном буфере двигалось к аноду и обладало положительным оптическим вращением. Из приведенных данных вытекало, что исследуемое аminosоединение имеет углеводную природу и, по-видимому, является аминуроновой кислотой.

Идентификацию неизвестной аминуроновой кислоты было удобно осуществить путем ее восстановления по карбоксилу до соответствующего аминосахара. Мы попытались провести это превращение двумя способами: а) получением метилового эфира полисахарида действием diazometана в диметилсульфоксиде, его восстановлением боргидридом натрия и метанолизом; б) метанолизом полисахарида с последующим восстановлением боргидридом натрия. В обоих случаях заключительными стадиями превращения были N-ацетилирование и кислотный гидролиз N-ацетиламиносахаров. В полученной после такой обработки смеси наряду с глицином, глюкозамином и аминуроновой кислотой в обоих случаях был идентифицирован галактозамин. Превращение аминуроновой кислоты в галактозамин протекало с переменным выходом, который не превышал  $25\%$  при работе по схеме а и  $50\%$  при работе по схеме б. Превращение по схеме а осложнялось, как выяснилось, тем, что в полисахариде только  $\sim 35\%$

карбоксильных групп находится в свободном состоянии. Это следовало как из данных потенциметрического титрования полисахарида раствором щелочи, так и из данных ИК-спектров его метилового эфира (отсутствие возрастания интенсивности карбоксильной полосы после получения метилового эфира полисахарида).

В связи с этим для идентификации и определения содержания аминокислоты в специфическом полисахариде мы применили другую схему, которая включала постановку триметилсилильной защиты на продукт метанолиза с последующим восстановлением алюмогидридом лития и кислотным гидролизом. Единственными продуктами проведенных реакций оказались 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкоза и галактозамин в соотношении 1 : 2, идентификация которых была осуществлена с помощью аминокислотного анализатора, а также независимым путем — дезаминированием в 2,5-ангидрогексозы и последующим анализом соответствующих им полных ацетатов полиолов методом ГЖХ-масс-спектрометрии [7, 8].

Таким образом, из приведенных данных следовало, что аминокислотная кислота, входящая в состав специфического полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 7, является галактозаминоразветвленной кислотой, а ее положительное оптическое вращение свидетельствовало о принадлежности к *D*-ряду. *D*-Конфигурация галактозаминоразветвленной кислоты была подтверждена также с помощью ферментативного окисления полученного галактозамина *D*-галактозооксидазой, хотя определение полноты окисления оказалось невозможным, поскольку заведомый образец *D*-галактозамина окислился ферментным препаратом незначительно. Тем не менее полученные результаты свидетельствуют о том, что по меньшей мере основная часть галактозаминоразветвленной кислоты принадлежит к *D*-ряду.

Из совокупности приведенных результатов следовало, что в состав повторяющегося звена антигенного полисахарида *Sh. dysenteriae* тип 7, при условии, что структура последнего регулярна, входят два остатка 2-амино-2-дезоксид-*D*-галактоуроновой кислоты, по одному остатку 2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы и глицина, а также остатки уксусной кислоты. Отсутствие в полисахариде свободных аминогрупп (отрицательная реакция с нингидрином) и вытекающее из данных спектра ПМР наличие *N*-ацетильных групп указывают на то, что число остатков уксусной кислоты на повторяющееся звено не менее 3 и они присоединены к аминогруппам.

Сведений о последовательности компонентов в полимерной цепи, а также о характере замещения моносахаридных остатков получить не удалось, так как при попытке метилирования по Хакомори полисахарид претерпевал полную дегградацию. Возможно, что щелочная дегградация протекает по схеме  $\beta$ -элиминации, чему способствует наличие в полисахариде замещенных карбоксильных групп. Интересно, что *L*-альтروزаминоразветвленная кислота, входящая в состав специфического полисахарида *Sh. sonnei*, также в значительной мере замещена по карбоксилу [9].

В заключение следует отметить, что гексозаминоразветвленные кислоты в самое последнее время были обнаружены в составе экзоцеллюлярных полисахаридов некоторых бактерий и грибов [10, 11]. Кроме того, они входят в состав Vi-антигена грамотрицательных бактерий [12] и общего антигена энтеробактерий (антиген Кунина) [13]. В составе антигенных ЛПС они обнаружены в *Pseudomonas aeruginosa* (*L*-галактозаминоразветвленная кислота) [14] в *Shigella sonnei* (*L*-альтрузаминоразветвленная кислота) [15], а также в *Pseudomonas viridis* [16] и *Citrobacter intermedium* [17] (галактозаминоразветвленная кислота).

### Экспериментальная часть

Нисходящую хроматографию на бумаге FN-11 выполняли в системе этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 18 : 3 : 1 : 4, обнаружение аminosахаров и аминокислот осуществляли раствором нингидрина, а сахаров — периодатом и щелочным раствором

нитрата серебра. Ионообменную хроматографию сахаров выполняли на анализаторе углеводов Technicon SC-2 и на анализаторе аминокислот BC-200 (последовательное элюирование цитратными буферными растворами с рН 3,25 (0,06 М, 5 мин), 4,25 (0,06 М, 10 мин) и 6,25 (0,105 М, 50 мин)); ГЖХ — на приборе Руч Unicam, серия 104 на колонке с ECNSS-M (колонка А) и SE-30 (колонка В). Гель-хроматографию проводили на колонке (67 × 3,5 см) с сефадексом G-50 в пиридин-ацетатном буфере при рН 4,5 (10 мл уксусной кислоты и 4 мл пиридина на 1 л воды). Ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе осуществляли в градиенте раствора хлористого натрия 0—0,5 М в 0,01 М  $\text{NaHPO}_4$ .

Спектр ПМР снимали на приборе Varian XL-100 в  $\text{D}_2\text{O}$  при 90°, ИК-спектр — на приборе UR-20 в таблетке с КВг. Электрофорез на бумаге выполняли в 0,025 М пиридин-ацетатном буфере, рН 4,5 (буфер А) и в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония, рН 9 (буфер В) при градиенте потенциала 25 В/см. ГЖХ-масс-спектрометрию проводили на приборе Varian MAT-111 Spot (колонка В); потенциометрическое титрование полисахарида 0,05 н. растворов КОН — на приборе Titrator II Radiometer Copenhagen. Растворы упаривали в вакууме при температуре  $\leq 40^\circ$ . Серологические тесты осуществляли по методике [18].

*Выделение специфического полисахарида.* Сухие клетки *Sh. dysenteriae* тип 7, штамм 408, экстрагировали 45% фенолом при 70°, нуклеиновые кислоты осаждали цетавлоном и ЛПС переосаждали спиртом из водного раствора NaCl по стандартной методике [19], выход ЛПС составил 1,5% на сухие клетки.

ЛПС (850 мг) нагревали 1,5 ч с 1% уксусной кислотой, осадок липида отделяли центрифугированием, супернатант лиофилизovali и хроматографировали на колонке с сефадексом G-50, получали 110 мг (12,9% на ЛПС) полисахарида, выходящего с холостым объемом колонки и 220 мг фракции следующего за ней олигосахаридного «кора».

*Определение мономерного состава полисахарида.* Полисахарид (12 мг) подвергали метанолизу (1 н. HCl в абс. метаноле, 20 ч, 100°), продукт лиофилизovali из бензольно-метанольной смеси, растворяли в водном метаноле, обрабатывали уксусным ангидридом в условиях N-ацетилирования (рН 8—9,4 ч). Смесь упаривали, гидролизovali (2 н. HCl, 100°, 2 ч), многократно упаривали с водой. Исследование смеси при помощи БХ показало наличие трех пятен: двух, соответствующих глицину и глюкозамину, и одного пятна с  $R_{\text{ГЛЮК}}$  0,78. Зоны, соответствующие всем пятнам, элюировали: глицин и глюкозамин идентифицировали на анализаторе аминокислот. Выделенный таким путем глюкозамин имел  $[\alpha]_D +64^\circ$ . ( $[\alpha]_D$  2-амино-2-дезоксид-*D*-глюкозы  $+72^\circ$ .)

Неизвестный аминсахар очищали препаративным электрофорезом на бумаге (буфер В), получали однородное, по данным аминокислотного анализа, вещество. Удельное вращение этого вещества с определением его концентрации по Моргану — Эльсону с учетом равенства соответствующих экстинкций галактозаминуриновой кислоты и глюкозамина [20] дало величину  $+42^\circ$  (2-амино-2-дезоксид-*D*-галактуроновая кислота имеет  $+84^\circ$  [21]).

*Восстановление продукта метанолиза полисахарида алюмогидридом лития.* Полисахарид (8,5 мг) после метанолиза и упаривания растворяли в 0,2 мл безводного пиридина, к прозрачному раствору прибавляли 100 мкл бистриметилсилилтрифторацетамида (Regis Chemical Co), встряхивали 2 ч. Смесь упаривали, остаток растворяли в 2 мл эфира (перегнан над  $\text{LiAlH}_4$ ), прибавляли  $\sim 40$  мг  $\text{LiAlH}_4$ , встряхивали 2 ч. После разложения избытка  $\text{LiAlH}_4$  осадок растворяли в 0,5 н. HCl, соли Al осаждали раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Осадок отделяли, фильтрат упаривали, проводили N-ацетилирование и гидролиз, как описано выше, и затем определяли состав смеси на аминокислотном анализаторе. Смесь содержала только глюкозамин и галактозамин в соотношении  $\sim 1 : 2$ .

Пробу этой смеси дезаминировали по методу [7, 8]. При анализе смеси по ГЖХ (185°, колонка А) в ней обнаружены полные ацетаты 2,5-ангидроманнита и 2,5-ангидроталлита, что подтверждено сопоставлением с заводскими образцами. При исследовании смеси по ГЖХ-масс-спектрометрии (колонка Б) в масс-спектрах обоих компонентов обнаружены характеристические пики с  $m/e$  259, 170, 139, 110, 97 [22].

*Ферментативное окисление галактозамина.* В качестве субстрата использовали смесь, полученную в результате метанолиза 250 мкг полисахарида и последующего боргидридного восстановления (соотношение глюкозамина и галактозамина  $\sim 1 : 1$ ). В качестве ферментной системы брали 0,25 ед. акт. *D*-галактозооксидазы (Sigma, 2,5 ед. в 0,1 мл), избыток пероксидазы (Reanal) и 200 мкг *o*-ди-анизидина в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 8,6). Окисление галактозамина наблюдали по возрастанию оптической плотности раствора при 435 нм [23]. Количественное определение производили по калибровочному графику, построенному для окисления в этих условиях заводского *D*-галактозамина. Количество галактозамина в смеси, рассчитанной из предположения о количественном превращении 50% аминокислотной группы образца в галактозамин, составило 68 мкг. В смеси определено 32 мкг галактозамина.

*Определение свободных карбоксильных групп полисахарида титрованием щелочью.* Полисахарид (11 мг) растворяли в 1 мл воды и титровали 0,05 М раствором КОН. На титрование до достижения рН 8 пошло 11 мкмоль щелочи, тогда как по расчету для повторяющегося звена, содержащего 2 остатка галактозаминуриновой кислоты, 1 остаток глюкозамина, 1 остаток глицина и 3 ацетата ( $M$  694), должно пойти 32 мкмоль.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев Б. А., Львов В. Л., Рамос Э. Л., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1978) Биорган. химия, 4, 760—766.
2. Dmitriev B. A., Backinowsky L. A., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1973) Eur. J. Biochem., 40, 355—359.
3. Дмитриев Б. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1977) Биорган. химия, 3, 1226—1233.
4. Дмитриев Б. А., Книрель Ю. А., Виноградов Е. В., Кочетков Н. К., Гофман И. Л. (1978) Биорган. химия, 4, 40—46.
5. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Lvov V. L. (1977) Carbohydr. Res., 54, 253—259.
6. Kochetkov N. K., Dmitriev B. A., Backinowsky L. V. (1976) Carbohydr. Res., 51, 229—237.
7. Дмитриев Б. А., Бакшиновский Л. В., Книрель Ю. А., Львов В. Л., Кочетков Н. К. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2335—2337.
8. Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Lvov V. L., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1975) Eur. J. Biochem., 50, 539—547.
9. Romanowska E., Lugowski C., Mulszyk M. (1974) Ж. гиг., эпидем., микробиол. и иммунол., 18, 388—394.
10. Hannesian S., Haskell T. H. (1964) J. Biol. Chem., 239, 2758—2764.
11. Watson P. R., Sanford P. A., Barton K. A., Jeanes A., Cadmus M. C. (1976) Carbohydr. Res., 46, 259—265.
12. Heyns K., Kiessling G. (1967) Carbohydr. Res., 3, 340—353.
13. Männel D., Mayer H. (1978) Eur. J. Biochem., 86, 361—370.
14. Wilkinson S. G. (1977) Biochem. J., 161, 103—109.
15. Kontrohr T. (1977) Carbohydr. Res., 58, 498—500.
16. Weckesser J., Drews G., Roppel J., Mayer H., Fromme I. (1974) Arch. Mikrobiol., 101, 233—245.
17. Raff R. A., Wheat R. W. (1968) J. Bacteriol., 2035—2043.
18. Dmitriev B. A., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. (1976) Eur. J. Biochem., 66, 559—566.
19. Westphal O., Jann K. (1965) in: Methods Carbohydr. Chem., 5, 83—91.
20. Brownlee S. T., Wheat R. W. (1966) Anal. Biochem., 14, 414—420.
21. Heyns K., Beck M. (1957) Chem. Ber., 90, 2443—2447.
22. Erbing Ch., Lindberg B., Svensson S. (1973) Acta chim. scand., 27, 3699—3704.
23. Amaral D., Kelly-Falcoz F., Horecker B. L. (1966) in: Methods in Enzymology, IX, 87—91.

Поступила в редакцию  
21.VII.1978

ANTIGENIC POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. 9. IDENTIFICATION  
OF 2-AMINO-2-DEOXY-D-GALACTURONIC ACID IN O-SPECIFIC  
HEXOSEAMINOGLYCAN OF *SHIGELLA DYSENTERIAE* TYPE 7

DMITRIEV B. A., DASHUNIN V. M., KNIREL Yu. A.,  
KOCHETKOV N. K., HOFMAN I. L.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

In the specific polysaccharide of somatic antigen from *Shigella dysenteriae* type 7 2-amino-2-deoxy-D-galacturonic acid, 2-amino-2-deoxy-D-glucose and glycine in 2 : 1 : 1 ratio were identified.

---