



**ЖУРНАЛ
ВСЕСОЮЗНОГО
ХИМИЧЕСКОГО
ОБЩЕСТВА
ИМ. Д. И. МЕНДЕЛЕЕВА**

**ТОМ
XVI**

**НОМЕР ПОСВЯЩЕН
ХИМИИ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

2

1971

СОДЕРЖАНИЕ

Развитие биоорганической химии в Советском Союзе за последнее десятилетие —
[М. М. Шемякин] 122

Полный синтез гена аланиновой транспортной рибонуклеиновой кислоты из дрожжей —
Х. Г. Корана 145

Молекулярные основы энзиматического катализа —
Д. Е. Кошланд 158

Новые пути синтеза тетрациклина —
Д. Г. Р. Бартон 165

Химическая топография боковых цепей в ферментах —
Ф. Б. Штрауб 174

Клеточная стенка микобактерий —
Э. Ледерер 180

Применение магнитного кругового дихроизма в органической химии —
К. Джерасси, Э. Баниенберг, Д. Элдер 197

СЪЕЗДЫ И КОНФЕРЕНЦИИ

III Европейский симпозиум по ингибиторам коррозии —
И. Л. Розенфельд 214

ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ВСЕСОЮЗНОГО ХИМИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА им. Д. И. МЕНДЕЛЕЕВА

Об участии научно-технической общественности в химизации сельского хозяйства —
С. И. Вольфович 217

Итоги конкурса Центрального правления Всесоюзного химического общества им. Д. И.
Менделеева за 1969 год—
В. И. Семишин 221

* *
*

К 70-летию со дня рождения М. А. Лимоника 230

**НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ РАБОТЫ
ЧЛЕНОВ ВСЕСОЮЗНОГО ХИМИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА им. Д. И. МЕНДЕЛЕЕВА**

(краткие сообщения) 231

...

Клеточная стенка микобактерий*

Э. ЛЕДЕРЕП

(Институт химии природных соединений; Жиф-сюр-Иветт,
Институт биохимии, факультет наук, Орсей, Франция)

В этой лекции мы попытаемся суммировать наши современные знания о химии очень сложных и интересных природных макромолекул, а именно, клеточных стенок микобактерий и родственных организмов**.

«Очень сложных» потому, что, как мы увидим далее, они содержат липиды, пептиды и углеводы.

«Интересных», так как их изучение требует рассмотрения множества вопросов новейшей структурной химии и новых биосинтетических путей, а также потому,

что многие патогенные эффекты туберкулезных микробов и родственных организмов обусловлены веществами, содержащимися в клеточных стенках.

Мы будем рассматривать не только нерастворимые макромолекулярные, жесткие клеточные стенки и их ковалентную химическую структуру, но также и серию растворимых липидов, которые, по-видимому, расположены во внутренней или внешней частях клеточной стенки, таких, как воск D, корд фактор и сульфолипиды. Мы начнем с химического изучения различных структур и покажем, что наиболее точным и удобным методом изучения этих сложнейших объектов является масс-спектрометрия; завершится эта лекция беглым обзором биологических свойств клеточных стенок микобактерий.

Опыты на животных показали, что препараты, приготовленные из клеточных стенок микобактерий, имеют интересные свойства, включающие адьювантную активность и способность стимулировать неспецифичной резистентности, которые могут быть использованы не только против бактериальных и вирусных инфекций, но

также против некоторых видов лейкемии и рака.

I. ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ СТенок МИКОБАКТЕРИЙ:

ПЕПТИДОГЛИКАН — ГЛИКОЛИПИДНЫЙ КОМПЛЕКС

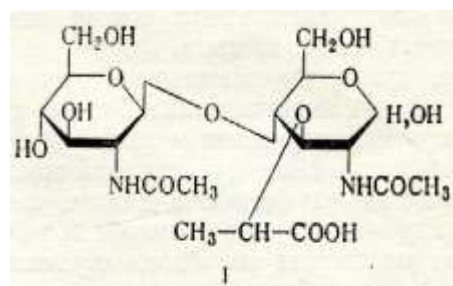
Клеточная стенка микобактерий содержит два основных компонента: пептидогликан и гликолипид (Котани и др.¹, Такея и др.², Мисаки и др.³, Канетсуна⁴).

I) Пептидогликан (мукопептид или муреин***)

Здесь мы можем различить гликановый остов, содержащий повторяющиеся дисахаридные звенья и остаток пептида.

а) Дисахаридные звенья

В классических работах Хьюзена⁵⁻⁶, Жинлоза⁷, Парка⁸, Салтона⁹ и Стромингера¹⁰ показано, что клеточные стенки всех исследованных бактерий содержат пептидогликан, имеющий гликановый остов из повторяющихся дисахаридных звеньев,

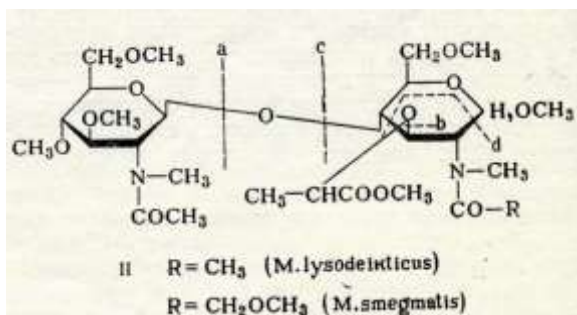


структуры (I), где N-ацетил-D-глюкозамин связан в β -положении 1—>4 с N-ацетил-D-мурамовой кислотой.

Единственные найденные до сих пор исключения состоят в том, что в стенках клеток *Staphylococcus aureus* N-ацетилмурамовая кислота 6-0-ацетилована¹¹ и что в спорах некоторых бактерий мурамовая кислота образует лактамы¹².

Дисахаридное звено клеточных стенок микобактерий до сих пор не было детально изучено; когда Ж.-Ф. Пети и А. Адам в Орсее впервые выделили его из *M. smegmatis* обычными энзиматическими приемами⁶, оказалось, что значение R_f этого звена отличается от R_f классического дисахарида (I). Оно содержало N-ацетилглюкозамин и мурамовую кислоту, на основании чего было предположено, что различие обусловлено заместителями в остатке мурамовой кислоты.

Эта проблема была разрешена¹⁴ сравнением масс-спектров полностью метилированного дисахарида *M. smegmatis* и соединения (I).

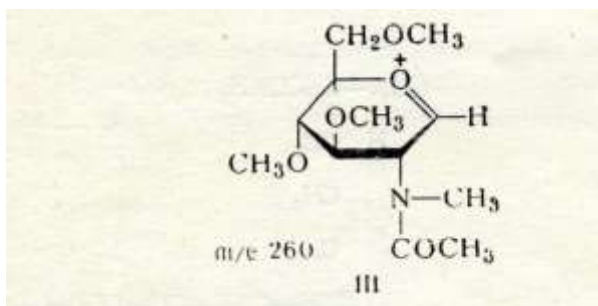
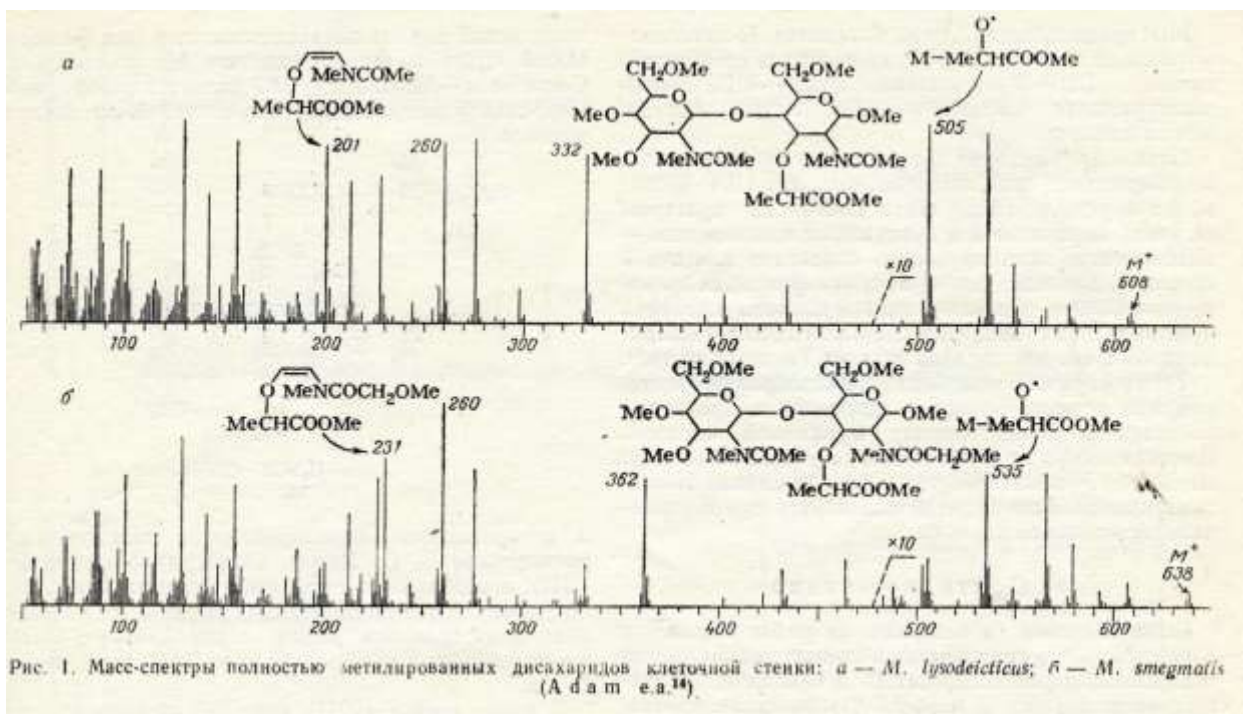


Масс-спектры двух полностью метилированных дисахаридов (II) очень похожи (рис. 1); некоторые пики имеют одинаковое значение т/е, а другие в спектре дисахарида из *M. smegmatis* смещены на 30 массовых единиц в сторону больших масс. Разрыв (а) гликозидной связи (II) приводит в обоих случаях к оксониевому иону (III) с т/е 260, что подтверждает концевое положение 1 N-ацетилглюкозамина в обоих дисахаридах. Разрыв (б) приводит в обоих случаях к интенсивным пикам при М-103, подтверждая наличие остатка молочной кислоты в боковой цепи. Разрыв (с) дает пики с т/е 332 или 362.

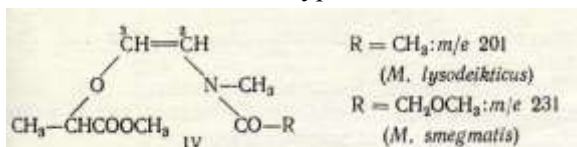
*Перевод с английского Н. С. Вульфсона.

** Используются следующие сокращения: DAP — 2,6-диаминопимелиновая кислота; Muc —• остаток миколовой кислоты; Mur — остаток мурамовой кислоты; D-Araç —■ D-арабинофураноза; D-Galp — D-галактопираноза; GlcNAc — N-ацетилглюкозамин; MurNGluc — N-гликолилмурамовая кислота.

***Термины «пептидогликан», «мукопептид» и «муреин» являются синонимами.



■ Очень важен разрыв (d), приводящий к фрагменту (IV), содержащему C(2)- и C(3)-атомы остатка мурамовой кислоты

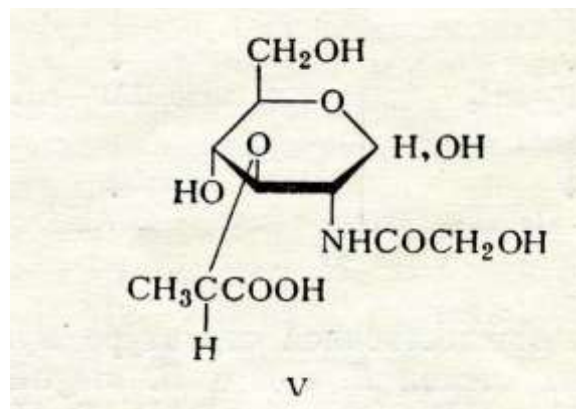


с их заместителями; пик с т/е 201 происходит из известной структуры (I), тогда как пик с т/е 231 показывает, что в дисахариде из *M. smegmatis* C₂-атом содержит на 30 массовых единиц (т. е. на одну OMe-группу) больше.

Поскольку масс-спектрометрия полностью дейтерометилированных продуктов показала отсутствие метоксильных групп в исходных дисахариде, можно заключить, что C₂-атом мурамовой кислоты содержит N-гликолильную группу вместо N-ацетильной.

Гликолиевая кислота была идентифицирована химически; была также синтезирована¹⁵ N-гликолилмурамовая

кислота (V), оказавшаяся идентичной по значению R_f- и масс-спектру (после исчерпывающего метилирования) с образцом дисахариде, выделенного из *M. smegmatis* энзиматическим гидролизом кишечным соком *Helix pomatia*⁴.



Предварительные исследования¹⁶ различных актиномицет показали, что N-гликолилмурамовая кислота (V) имеется во всех исследованных микобактериях, в штаммах *Nocardia*¹⁷ (и, возможно, также в *Micromonospora*¹⁸), но отсутствует в *Corynebacteria* и *Streptomyces*. Ее наличие может быть использовано как таксономный критерий.

Мы предположили¹⁴, что биосинтез N-гликолилмурамовой кислоты (V) осуществляется следующим путем: UDP-N-ацетилглюкозамин—HJDP-N-ацетилмурамовая кислота* → URD-N-гликолилмурамовая кислота.

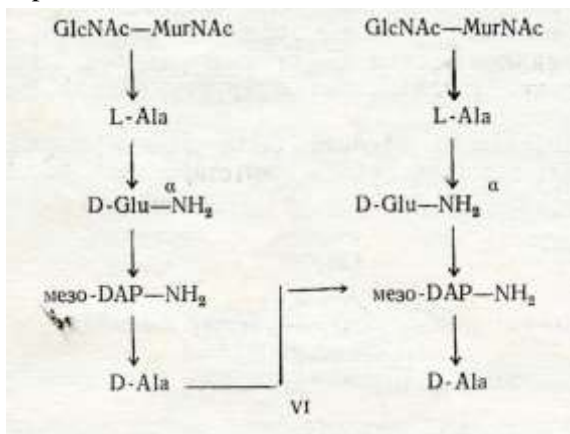
Пети и др.¹⁹ недавно получили экспериментальное подтверждение этой гипотезы, выделив UDP-N-гликолилмурамил (Ala, Glu, DAP) из культуры *M. phlei*, выращенной в присутствии циклосерина — антибиотика, ингибирующего биосинтез клеточной стенки и приводящего к аккумулярованию производных UDP-N-ацетилмурамовой кислоты в клетках чувствительных бактерий²⁰. Аналогичный эксперимент был совсем недавно описан Такаяма и др.²¹.

Таким образом, микобактерия «изобрела» оксигенез, при помощи которого гидроксил направленно вводится в N-ацетогруппу мурамовой кислоты. Близкая аналогия встречается у высших животных: Шуп и др.²² показали, что в печени свиньи N-ацетилнейраминавая кислота окисляется до N-гликолилнейраминавой кислоты.

в) Пептидное звено

Было известно (в основном из работ У-орка²³ и Камминза²⁴⁻²⁵), что клеточная стенка микобактерии и коринобактерии содержит D- и L-аланин, D-глут-аминовую кислоту и мезо-2,6-диаминопимелиновую кислоту.

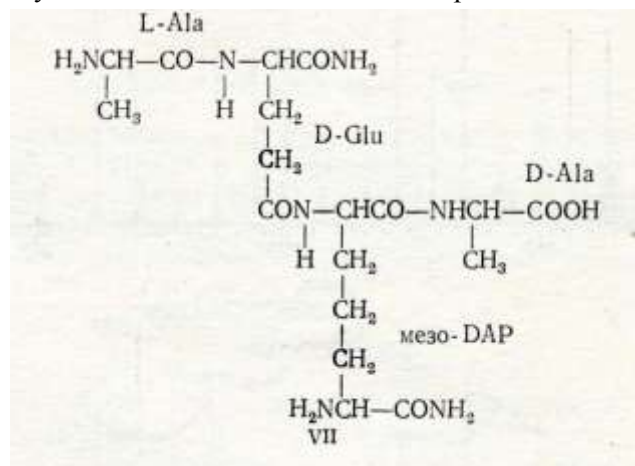
Позже Като и др.²⁶ установили строение (VI) для мукопептида клеточной стенки *C. Diphtheriae*,



оказавшуюся тождественной структуре мукопептидов клеточных стенок *E. coli* и *B. megaterium*, а именно: L-Ala—y-D-Glu—мезо-DAP—D-Ala (Ван Хайгенурт и др.²⁷), за исключением того, что карбоксильные группы Glu и DAP амидированы.

Таксономное рассмотрение и недавняя работа Миглиора и Жолле²⁹ по воску D (см. ниже) говорят в защиту аналогичной структуры пептидного звена клеточной стенки микобактерий.

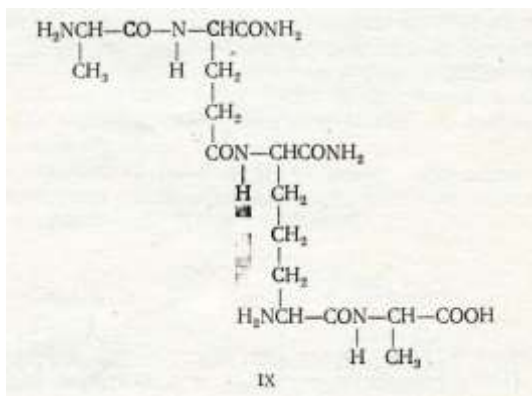
Ж. Вьетзербин-Ф-альцпан и Ж-Ф. Пети энзиматическим гидролизом выделили тетрапептид клеточной стенки *A4. smegmatis* и тщательно его очистили; химический анализ показал наличие в нем у-глутамовой связи и что N-концевая Ala является L, C-концевая—Ala-D и что DAP является мезоформой; масс-спектрометрическое изучение N-ацетилированного



и исчерпывающе метилированного тетрапептида, проведенное Б. С. Да-сом, подтвердило строение³¹ (VII), в особенности последовательность аминокислот, присутствие двух амидных групп и их положение; подтвердилась также связь L-Ala—y-D-Glu в α-положении к карбоксилу - мезо-DAP, связанный с D-Ala.

В масс-спектре (VIII) (рис. 2), полученного из (VII) N-ацетилированием и исчерпывающим метилированием по

методике, разработанной в нашей лаборатории для определения последовательности аминокислотных остатков в пептидах 32-36, молекулярный ион имеет т/е 683. Пик с т/е 484 обусловлен фрагментом, а, что подтверждает строение (VII) и исключает изомерное строение (IX).

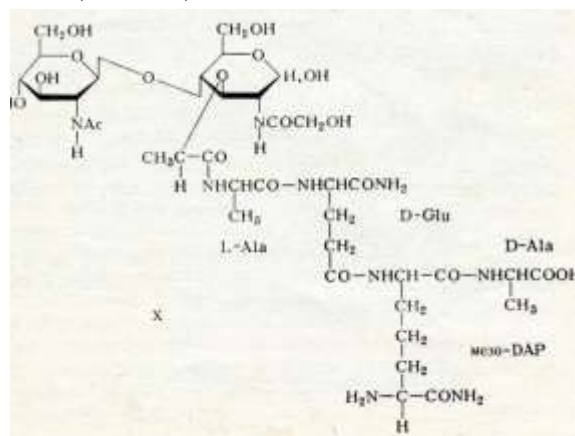


Имеется последовательность пиков с т/е 128, 298 и 567.

Тот же диамирированный тетрапептид (VII) был выделен из *B. CG*, *M. phlei* и *S. fermentans* и идентифицирован масс-спектрометрически³¹.

Моноамирированный тетрапептид после N-ацетилирования и исчерпывающего метилирования дал масс-спектр с молекулярным ионом при т/е 670 и последовательностью пиков с т/е 128, 285 и 554, показывающей, что одна амидная группа находится в остатке мезо-DAP. Аналогично было установлено строение двух моноамирированных трипептидов Ala—Glu—DAP. Особенно полезной масс-спектрометрия оказалась для определения положения амидных групп.

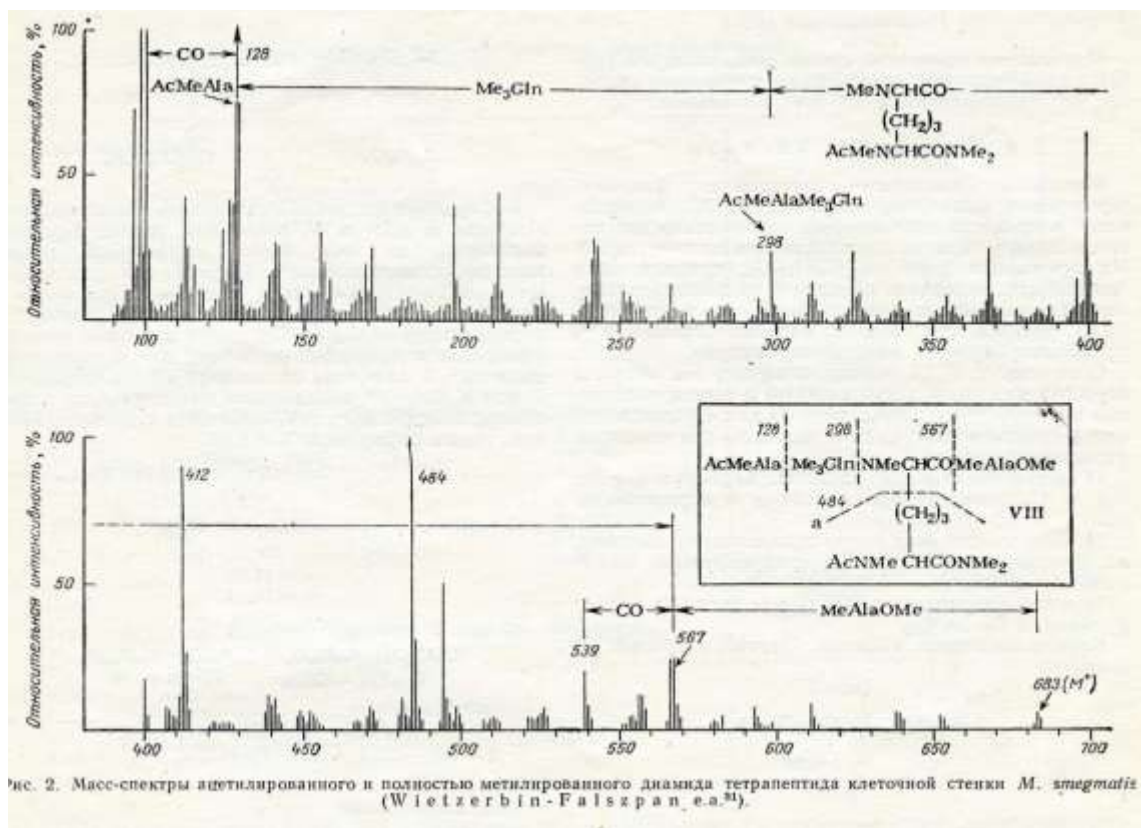
Таким образом, для пептидогликанового мономера микобактерий мы можем предположить строение (X); в полимере C-концевой карбоксил D-Ala связан с одной из аминогрупп мезо-DAP другой гликановой цепи (как в VI).



Так как тетрапептид (VII) был выделен действием энзима *Mycobacter. Al1*, который не гидролизует связи D-Ala—мезо-DAP, можно предположить, что в клеточной стенке пептид (VII) находится как таковой, т. е. он не связан поперечными связями с другими пептидными цепями; он может образовываться при действии автолитических энзимов, необходимых для регулирования роста клетки.

Единственной еще неизвестной стереохимической деталью строения (VII) является то, какие из асимметрических центров мезо-DAP связаны с Glu и D-Ala (карбоксил другого амид нрав ан). По аналогии с пептидогликаном *E. coli* можно ожидать, что первый будет L, а второй — D, давая таким образом чередующуюся структуру L, D, L, D, которая, вероятно, играет биологическую роль (Ж. М. Хьюзен, частное сообщение).

- - Микобактерии должны содержать небольшие количества N-ацетилмурамовой кислоты¹³.



2) Гликолипидное звено

Мукопептид клеточной стенки микобактерий связан с гликолипидом, содержащим миколовые кислоты, этерифицированные арабиногалактаном.

а) Миколовые кислоты

Миколовые кислоты — «монстровые» микобактериальные молекулы, открытые Р. Ж. Андерсоном³⁷ в процессе классических систематических исследований в области химии липидов микобактерий. Их суммарная формула $C_{88}H_{176}O_4$, предложенная Андерсоном, оказалась недалеко от действительности. Точные молекулярные формулы и строение были установлены совсем недавно Этемади³⁸⁻⁴⁰, применившим метод масс-спектрометрии.

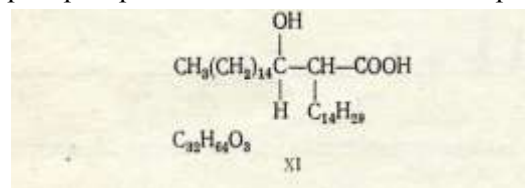
Совместно с Ж. Асселино, которому мы обязаны первыми важными достижениями в химии миколовых кислот⁴¹⁻⁴², мы определяем их как а-разветвленные β-оксикислоты⁴³. Сейчас известны три основные разновидности:

1) корипомиколовые кислоты, варьирующие от C28 до C40, найденные в основном в коринобактериях;

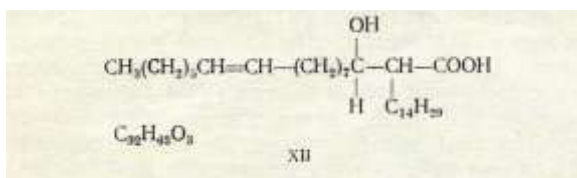
2) нокардовые (или нокардомиколовые) кислоты, варьирующие от C40 до C_∞, продуцируемые штаммами нокардия;

3) микобактериальные миколовые кислоты, варьирующие от C60 до C90.

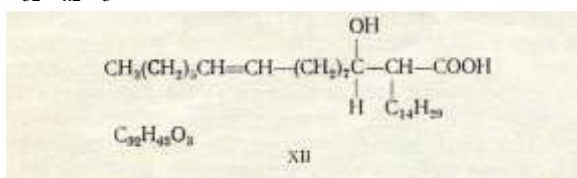
Кориномиколовые кислоты. Первой открытой⁴⁴ и наиболее широко распространенной в природе



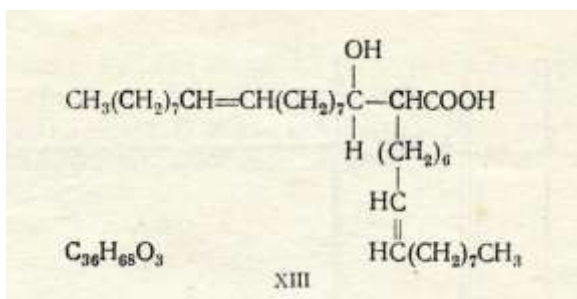
является кориномиколовая кислота $C_{32}H_{64}O_3$ (XI), недавно найденная также в *Nocardia asteroides* в виде эфира трегалозы и в *M. smegmatis* в виде эфира глюкозы⁴⁵, *N. asteroides* была найдена также мононенасыщенная кориномиколовая кислота $C_{32}H_{12}O_3$,



широко распространенной в природе является кориномиколовая кислота $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_3$ (XI), недавно найденная также в *Nocardia asteroides* в виде эфира трегалозы и в *M. smegmatis* в виде эфира глюкозы^{45,3}, *А*-А. asteroides* была найдена также мононенасыщенная кориномиколовая кислота $\text{C}_{32}\text{H}_{62}\text{O}_3$



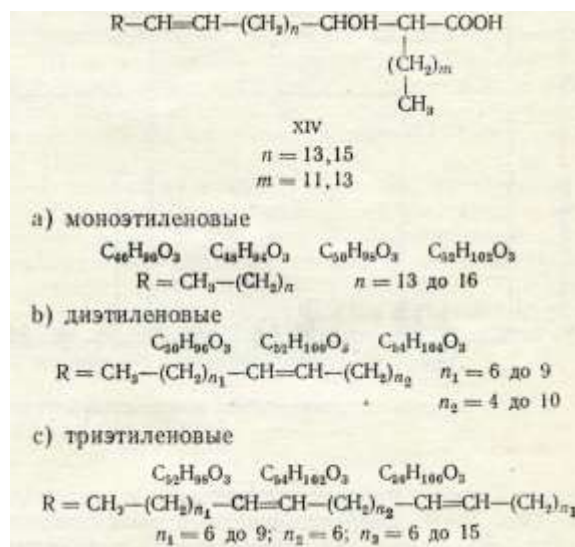
(XII)⁴⁶ в виде эфира трегалозы⁴⁵. Недавно Уэлби-Гьюос и др.⁴⁷ в *S. hofmannii*, Ионеда и др.⁴⁵ в *N. asteroides* и Оказаки и др.⁴⁸ в *Brevibacterium thiovaginalis** нашли «коринмиколедиеновые» кислоты, имеющие по одной ненасыщенной связи в каждом звене. Наиболее важная из них, $\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{O}_3$, имеет строение (XIII)⁴⁷⁻⁴⁸.



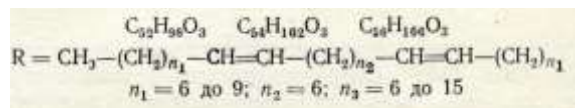
Нокардовые кислоты.

Эти кислоты были открыты Мичелом и др.⁴⁹ в *N. asteroides*, точное строение некоторых из них было установлено позже масс-спектрометрически⁵⁰. Недавно из различных штаммов нокардия были выделены нокардовые кислоты (названные также нокардомиколовыми⁴²), варьирующие от C_{40} до C_{60} среди них были идентифицированы насыщенные, моно-, ди- и триеновые кислоты⁵¹. У всех этих соединений α -цепь

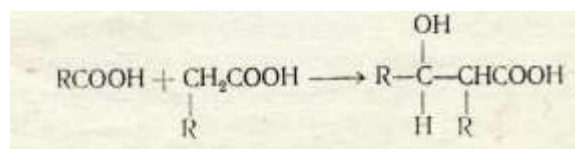
насыщена. Борде и Мичел⁵¹ предложили для этих трех видов нокардовых кислот из *N. asteroides* строение (XIV) (см. также формулы XIX и XX).



Миколовые кислоты микобактерий. Мы не будем детально описывать химию этих соединений, которые варьируют в пределах C_{60} — C_{90} ; некоторые типичные строения показаны в табл. 1 и формулах (XVI), (XVII) и (XXV) (обзоры см.³⁹⁻⁴²).



Биосинтез миколовых кислот был изучен в нашей лаборатории Гастамбидом⁵⁵ и Этемади^{56,57}; он осуществляется конденсацией одной длинной цепи молекулы с другой в α -положении.



- - Организм, явно не относящийся к микобактериям

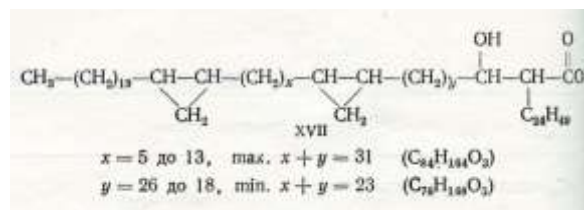
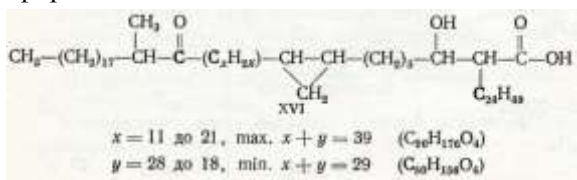
Предположительная формула (XV) (принятая Ацумой и др.⁶³) была предложена Мисаки и Юкавой⁶²; она хорошо согласуется с недавними работами Амар-Некеш и Уилкаса⁶⁵.

с) Структура гликолипида*

Как показано формулой (XV), миколовая кислота связана по карбоксилу с 5-ОН-группой одной из молекул D-арабинофуранозы; впервые это было установлено Ацумой и Ямамурой⁶⁶, которые выделили миколяты арабинофуранозы и арабинобиозы из «связанных липидов» штамма человеческого происхождения (Аояма Б).

Ачария и др.⁶⁷ изучили строение миколятов арабинофуранозы с помощью масс-спектрометрии истощающе ацелированных соединений, выделенных из клеточных стенок штамма BCG и M. kansasii (рис. 3).

В области высоких массовых чисел найдены две серии пиков, отличающихся на 100 массовых единиц, обусловленных присутствием ацильных остатков, отвечающих миколовым кислотам (XVI) и (XVII), строение которых было установлено ранее масс-спектрометрией метиловых эфиров.

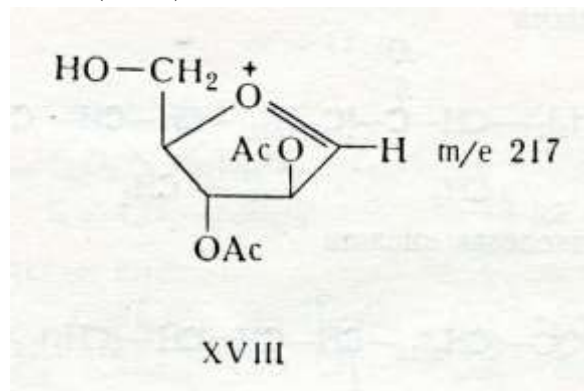


Пики, соответствующие ацилу (XVI), находятся при т/е 1444, 1416 и 1388 и возникают, по-видимому, в результате потери двух молекул уксусной кислоты (120 массовых единиц) истощающе ацелированным соединением, приведенным на рис. 3. Ионы, соответствующие ацилу (XVII), находятся при т/е 1344, 1316 и 1288.

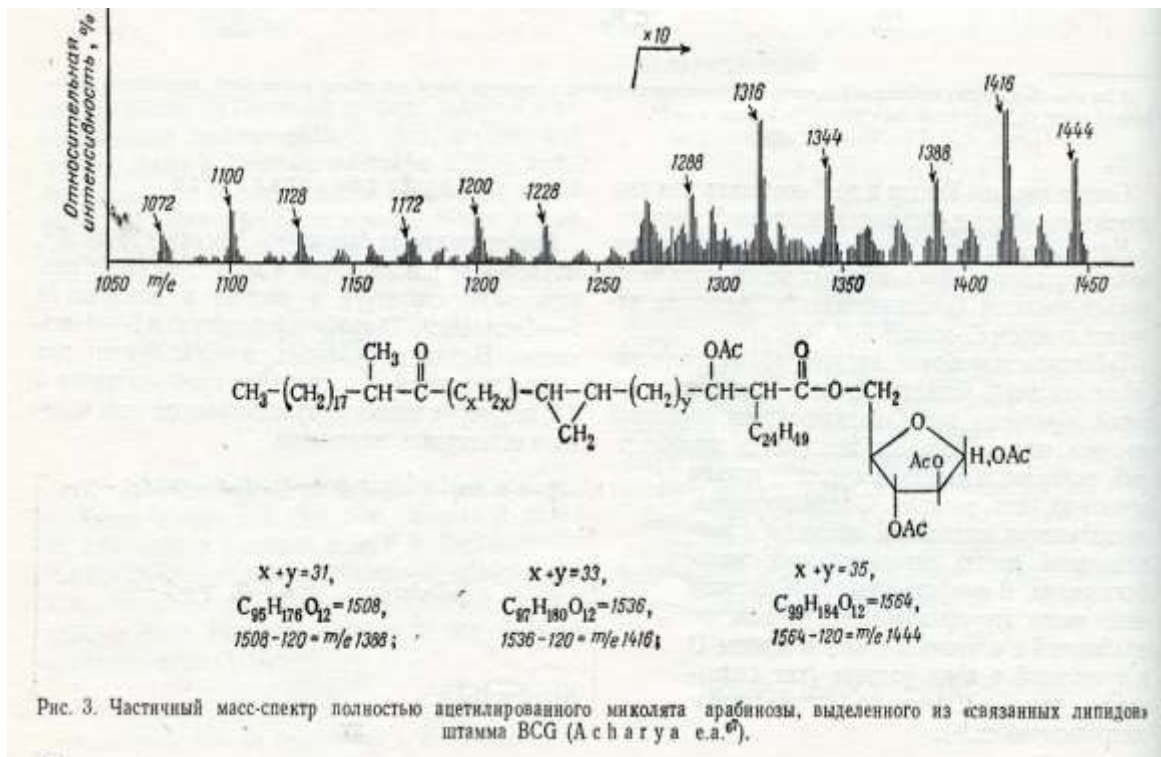


соответствующие (XVI), дают (после потери одного H) пики с т/е 1228, 1200 и 1172; аналогичные ионы, происходящие из ацила (XVII), дают пики с т/е 1128, 1100 и 1072.

Небольшой пик при т/е 217 (не указанный на рис. 3) может быть обусловлен оксониевым ионом (XVIII).



- - некоторые авторы используют название липополисахарид

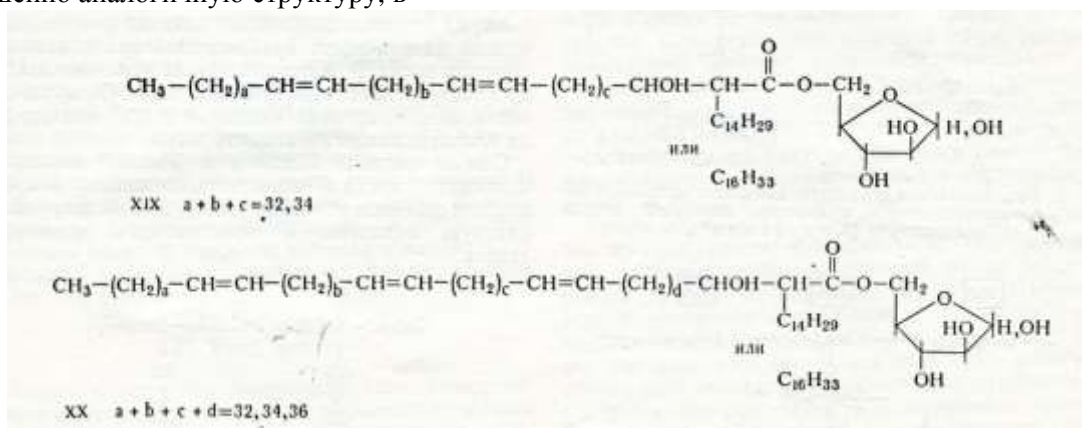


Недавно Канецуна и др.⁶⁸, Уилкас и др.^{64,65} выделили аналогичные препараты миколятов арабинозы и арабинобиозы.

Можно с уверенностью сказать, что в клеточных стенках микобактерий, так же, как и в воске D (см. ниже), липидные звенья состоят исключительно из миколевых кислот, этерифицированных 5-ОН-группами О-арабинофуранозы.

Клеточная стенка штаммов *Nocardia* имеет совершенно аналогичную структуру, в

которой микобактериальные миколевые кислоты заменены нокардовыми кислотами. Совсем недавно Ланиэль и Асселино⁶⁹ идентифицировали нокардаты арабинозы в «связанных липидах» *N. brasiliensis*; масс-спектрометрия исчерпывающе метилированных гликолипидов показала, что они являются эфирами арабинозы и нокардовых кислот $\text{C}_{56}\text{H}_{106}\text{O}_3$, $\text{C}_{56}\text{H}_{108}\text{O}_3$, $\text{C}_{58}\text{H}_{110}\text{O}_3$ и $\text{C}_{60}\text{H}_{114}\text{O}_3$. Для нокардатов арабинозы Даниэлем и Асселино⁶⁹ были предложены строения (XIX) и (XX).



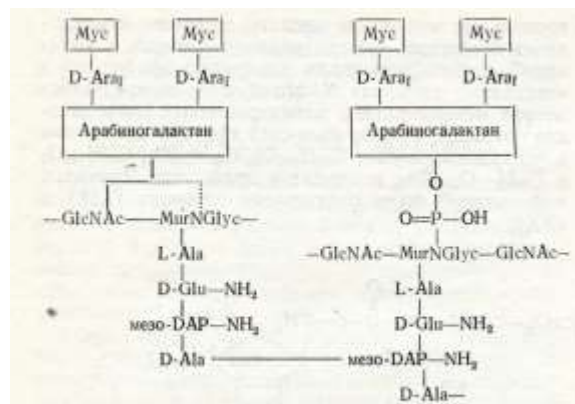
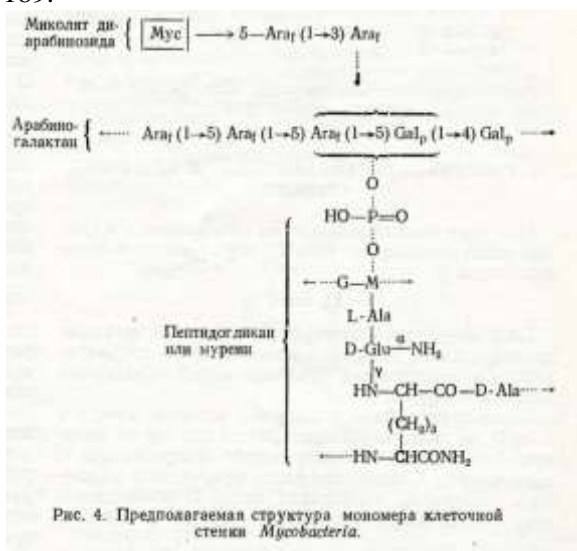
Ионеда и др.⁴⁵ нашли, что в одном штамме *Nocardia asteroides* только клеточная стенка содержит нокардовые кислоты (C_{50} — C_{58}), в то время как свободные липиды содержат кориномиколевые кислоты (C_{28} — C_{36}).

3) Пептидогликан—гликолипидный комплекс

Природа связи гликолипида с пептидогликаном до сих пор не совсем ясна. Лью и Готшлих⁷⁰ показали, что в *M. butylicum* имеется 6-фосфат мурамовой кислоты; последующие авторы подтверждали присутствие мурамилфосфата во всех исследованных микобактериях^{28,29,71}, это позволяет предположить, что может иметь место

фосфодиэфирная связь гликановой цепи с арабиногалактаном, но точного экспериментального доказательства этому еще нет. Предполагая возможность фосфодиэфирного моста, мы можем предположить для пептидогликангликолипидного «комплекса» клеточной стенки микобактерии строение, показанное на рис. 4, Канецуна⁷¹ получил некоторые свидетельства в пользу другой, гликозидной связи между гликолипидом и, возможно, глюкозамин муконептида, и предложил строение, показанное на рис. 5.

Молекулярный вес «мономера», изображенного на рис. 4, составляет около 3200. Мисаки и др.³ нашли, что молекулярный вес арабиногалактана штамма BCG приблизительно 3000, полагая, что только одна из 8—10 молекул мурамовой кислоты фосфорилирована, можно предположить (весьма гипотетично) схему «декамера», показанную на рис. 6 (стрелки указывают на возможные способы образования воска D при энзиматическом гидролизе, что будет пояснено позже, стр. 189.



II. ГЛИКОЛИПИДЫ, СОЕДИНЕННЫЕ С КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ

Под этим наименованием мы объединяем следующие типы соединений: воск D, корд фактор и сульфолипиды.

1) Воск D

Воск D — это нерастворимая в ацетоне фракция хлороформного экстракта микобактерий, предварительно обезжиренного исчерпывающей обработкой спиртом и эфиром⁴².

Было предпринято множество попыток очистить воск D, но гомогенный препарат до сих пор не получен. Чаще всего его загрязняют фосфолипиды и корд фактор. Отмеченное ранее присутствие маннозы в различных препаратах воска D объясняется тем, что он загрязнен фосфолипидами (Уилкас и др.⁷⁵).

Препараты воска D «нечеловеческих штаммов» микобактерий представляют собой гликолипиды, не содержащие азота, а именно — миколяты арабино- галактана.

Препараты воска D человеческих штаммов *M. tuberculosis* и *M. kansasii* являются

пептидогли-колипидами, а именно — миколятами арабиногалактана, связанного с обычным мукопептидом (Жолле и др.^{29,73,74}, Уилкас и др.^{72,75}) (см. также⁶¹). Эти последние препараты воска D имеют интереснейшую иммунологическую активность (см. ниже).

Ацума (частное сообщение) показал иммунологическую идентичность арабиногалактана клеточных стенок и воска D, а параллельные изучения арабиногалактана клеточной стенки и воска D вирулента человеческого штамма Уилкасом и др.⁷² подтвердили близкую аналогию этих структур.

Совсем недавно Миглиор и Жолле³⁰ выделили мукопептид воска D человеческого штамма и предложили для него строение (XXI), демонстрирующее близкую аналогию с мукопептидом клеточной стенки.



Связанный воск D. Андерсон³⁷ нашел, что часть липидов микобактерий может быть выделена только после гидролиза нерастворимого бактериального осадка 0,1 н. соляной кислотой; эти «связанные липиды» химически очень похожи на препараты воска D «нечеловеческих штаммов» (т. е. они являются миколятами арабиногалактана, не содержащими азота).

Котати и др.⁷⁶ и Канецуна⁷¹ выделили «связанный воск D» из клеточной стенки микобактерий обработкой лизоцимом и энзимами *Streptomyces*. Эти препараты содержат миколят арабиногалактана, связанный с мукопептидом, и поэтому сходны с мукопептидом, содержащимся в препарате воска D, полученном экстракцией хлороформом из человеческих штаммов A4, tuberculosis и *M. kansasii*.

Таким образом, так называемые «связанные липиды», выделенные слабокислым гидролизом, вероятно, являются ни чем иным, как миколятами арабиногалактана

клеточной стенки, в то время как «связанный воск D», выделенный энзиматическим гидролизом, может быть рассмотрен как «мономер» клеточной стенки.

Биогенез воска D. Вероятно, растворимые в хлороформе фракции воска D являются либо олигомерами (или частями олигомеров) клеточной стенки, еще не использованными в полимеризации, либо продуктами автолиза, выделенными из клеточной зующих полимер по различным связям и приводящих к сложной смеси аналогов⁷¹.

Стрелки на рис. 6 показывают, как могут образовываться такие фракции воска D; действие фосфодиэстеразы (E) приводит к липорастворимому арабиногалактан-миколяту (воск D «нечеловеческих» штаммов), в то время как действие лизоцима (L) и D-аланинэндопептидазы (A) приводит к фракциям воска D, содержащим мукопептид, таким, какие были найдены в человеческих штаммах и в *M. kansasii*.

Недавно Дэвид и др.⁷⁷ сообщили, что синтез воска D в *M. tuberculosis* ингибируется циклосерином. Это открытие находится в соответствии с общими путями биосинтеза клеточных стенок и воска D и согласуется с последовательностью:

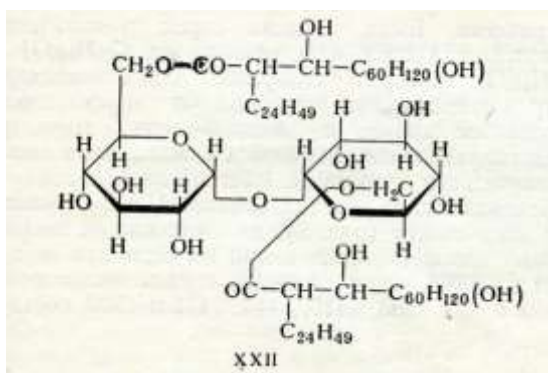
UDP-мукопептид—«клеточная стенка—гмвоск D

Воск D из штаммов нокардии. Совсем недавно Даниэль и Асселино⁶⁹ выделили из *N. brasiliensis* фракцию воска D, гидролиз которой приводит к нокардовым кислотам, галактозе, арабинозе, а также к Ala, Glu и DAP.

2) Корд фактор

Корд фактор — это токсический гликолипид, открытый Блохом⁷⁸ в экстрактах петролейным эфиром вирулентных, кордобразующих микобактерий. (Обзоры по строению, синтезу и биологической активности см^{79, 80}.)

Нолл и др.⁸¹ показали, что корд фактор является б,б-димиколятом трегалозы, и, так как в то время точное строение миколевых кислот еще не было установлено, для корд фактора была предположена формула (XXII).



С тех пор из бактериальных липидов была выделена целая серия природных диэфиров трегалозы; сведем их в порядке возрастания молекулярного са входящего в них ацильного радикала.

В *M. fortuitum* Вилкас и др.^{82,83} нашли дипальмит трегалозы и ее диэфир, масс-спектр которого однозначно показал, что молекула трегалозы заменена несимметрично, оба ацильных радикала (в большинстве случаев пальмитиновой и туберкуло-еариновой кислот) находятся у одного и того же остатка глюкозы. Из *Corinebacterium diphtheriae* Йоиеда и др.⁸⁴ выделили токсичный гликолипид, содержащий трегалозу и две молекулы C_{32} кислот - кориномиколовую (XI) и кориномиколовую (XII). В этом случае трегалоза также этерифицирована по 6,6'-положениям, что подтверждено исчерпывающим метили- рованием.

S. hofmanii содержит диэфир трегалозы и C_{3e} -кориномиколедиеновой кислоты (XIII)⁴⁷.

■ Совсем недавно мы заинтересовались строением корд фактора штаммов *Nocardia*, которое было до тех пор не известно. Мы ожидали найти диэфиры нокардовых кислот, и в действительности из *N. rhodochrous* был выделен диэфир трегалозы, содержащий нокардовые кислоты от C_{40} до C_{4b} ; однако в случае штамма *N. asteroides* ацильные группы выделенного корд фактора оказались смесью кориномиколовых, кориномиколовых и кориномиколедиеновых кислот⁴⁵ от C_{28} до C_{36} .

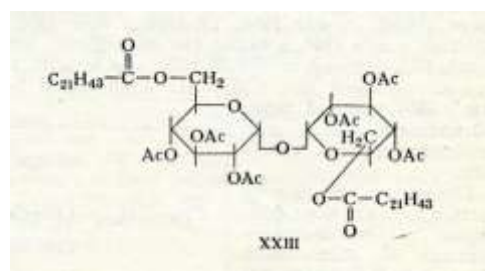
Таким образом, этот гликолипид структурно близок продуцируемому *Corinebacteria*. Нас заинтересовало, может ли этот конкретный штамм продуцировать также нокардовые кислоты; детальный масс-спектрометрический анализ показал, что в

свободных липидах содержатся только кориномиколовые кислоты, в то время как омыление клеточной стенки дает нокардовые кислоты, варьирующие от C_{50} до C_{56} . Это показывает, что нокардовые кислоты специфически используются для образования гликолипидов клеточной стенки⁴⁵ (что согласуется с наблюдениями Бордэ и др.⁸⁵).

Масс-спектрометрия диэфиров трегалозы.

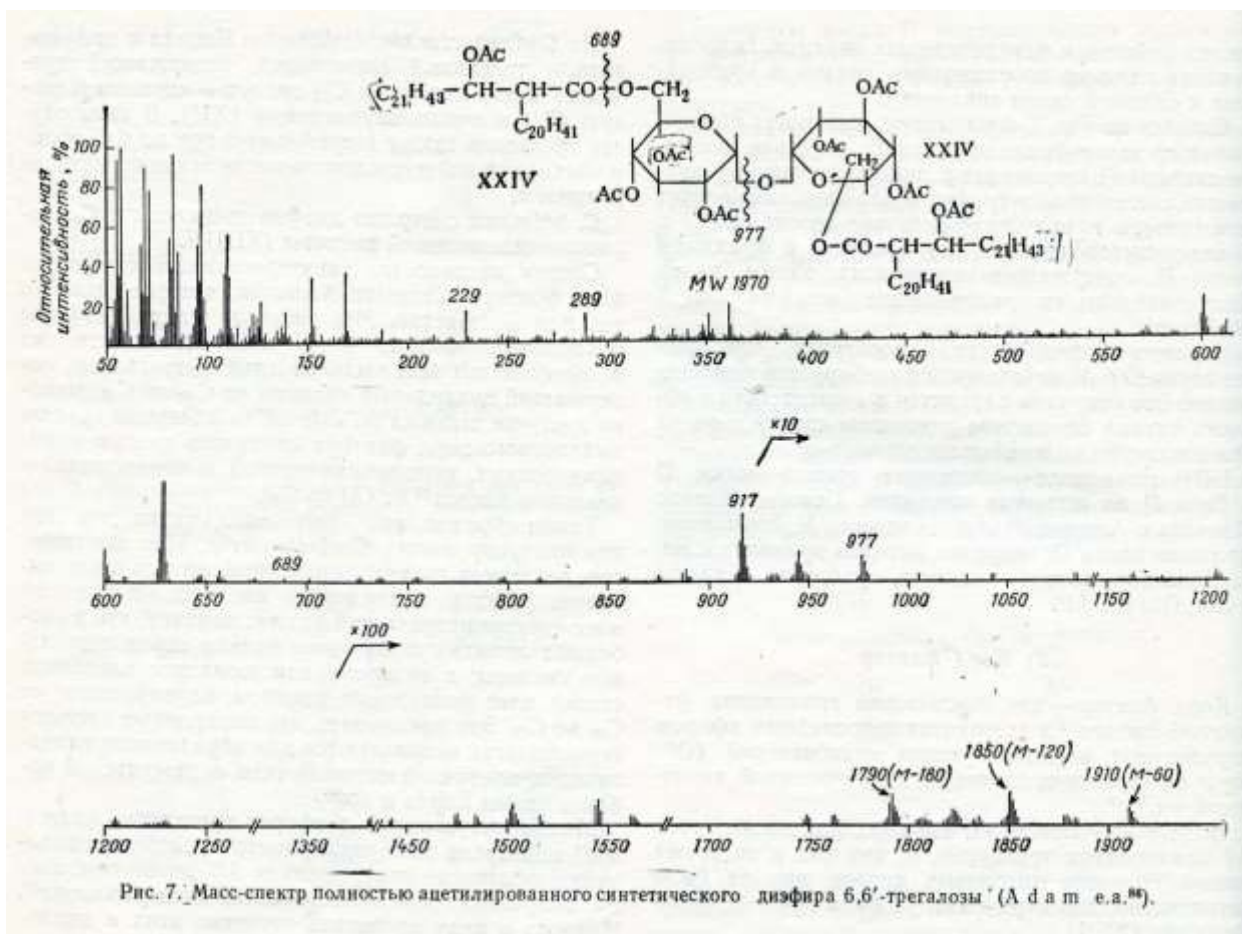
Адам и др.⁸⁶ подвергли масс-спектрометрическому исследованию некоторые синтетические 6,6'-диацилтрегалозы, полученные для биологических экспериментов⁸⁷. Имелось в виду проверить строение этих и аналогичных природных соединений и посмотреть, как широко может быть использована масс-спектрометрия в области высокомолекулярных соединений.

Исчерпывающе ацелированная синтетическая 6,6'-диэйкозаноилтрегалоза (XXIII) давала молекулярный ион при m/e 12'38, а расщепление гликозидной связи приводило к оксониевому иону с m/e 611.



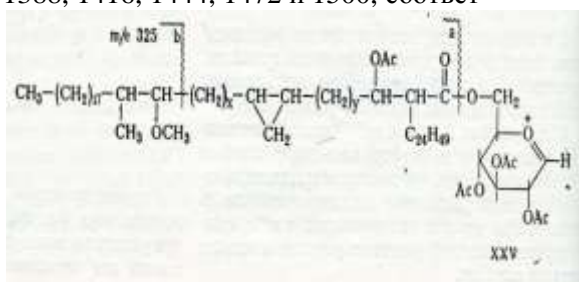
Масс-спектрометрия исчерпывающе ацелированного корд фактора *S. diphtheriae* обнаружила три различные молекулы: диэфир трегалозы, содержащий два насыщенных C_{32} ацильных радикала, другой диэфир, содержащий два ненасыщенных C_{32} ацильных радикала, и третий - содержащий один насыщенный и один ненасыщенный ацильный радикал (молекулярные ионы при m/e 1630 1632 и 163488).

Синтетическая 2,3,4,2',3',4'-гексаацетил-6,6'-ди-(а-эйкозанил - β-цетокситетракозаноил) - трегалоза⁸⁷ (XXIV) (рис. 7) не дает молекулярного иона, но дает пики (M-60) с m/e 1910, (M-120) с m/e 1850 и (M-180) с m/e 1790, а также пик оксониевого иона с m/e 977, который теряет 60 массовых единиц, давая интенсивный пик с m/e 917 и ацильный ион (m/e 689), который, теряя 60 массовых единиц, дает интенсивный пик с m/e 629.



Перед тем как приступить к анализу корд факторов человеческого штамма *M. tuberculosis*, Адам и др.⁸⁶ синтезировали метиловые эфиры миколовых кислот,

Исчерпывающе ацелированный корд фактор дал масс-спектр (рис. 8), не содержащий молекулярных ионов (которые могли бы быть при т/е от 2776 до 3000), но содержащий серию гомологичных пиков с т/е 1388, 1416, 1444, 1472 и 1500, соответ-



ствующим оксониевым ионам (XXV) (после потери одного атома водорода*).

Пики с т/е от 1072 до 1240 обусловлены соответствующими ацильными ионами

входящих в его состав, и исследовали их масс-спектрометрически. Была найдена серия гомологичных миколовых кислот в интервале от $C_{78}H_{154}O_4$ до $C_{90}H_{178}O_4$, которые содержат одну метильную, одну гомологического ряда миколовых кислот (фрагментация а), после потери одной молекулы уксусной кислоты; пик с т/е 325 соответствует $C_{22}H_{45}O$ (фрагментация Б); идентификация пиков с т/е 1530, 1242, 417 и 418 описана в литературе⁸⁶.

Некоторые замечания о биологических свойствах корд фактора. В течение нескольких первых лет после открытия корд фактора в основном изучались его токсические свойства. Экспериментальные попытки выработать иммунитет против корд фактора, т. е. создать «анти корд факторы», оказались безуспешными. Однако недавно Беккерканст и др.⁸⁹ показали, что при некоторых экспериментальных условиях (в присутствии минерального масла) инъекции мыши от 10 до 20 мг корд фактора вызывают гранулему в легких и местный иммунитет.

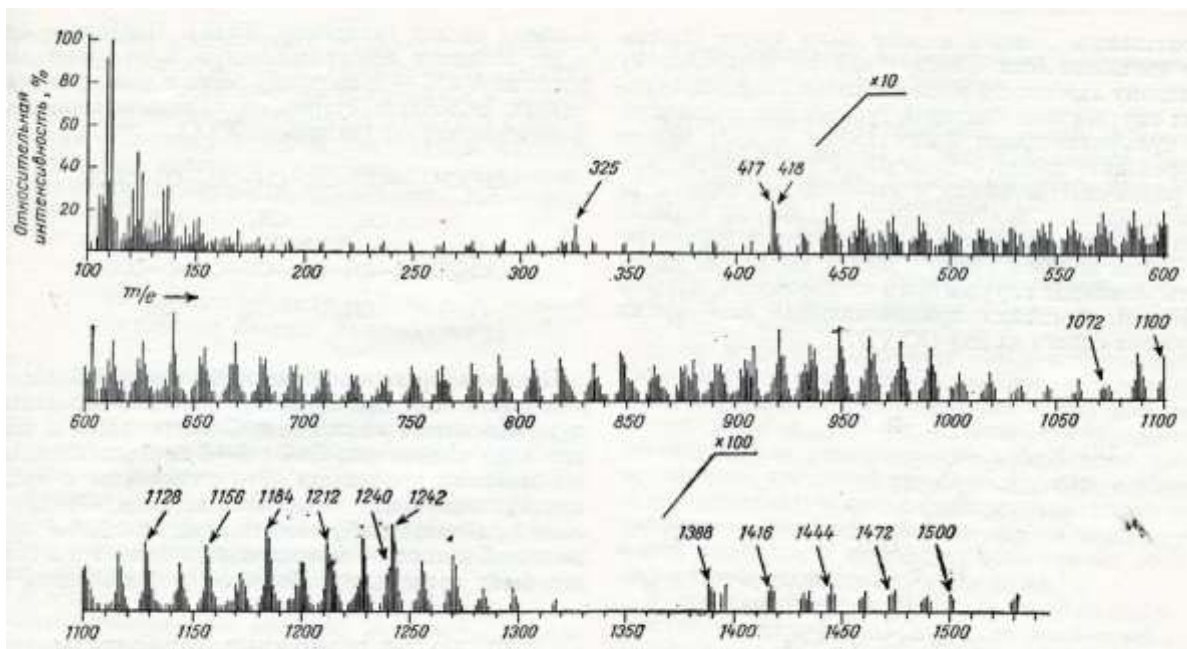


Рис. 8. Масс-спектр полностью ацетилированного корд фактора человеческого штамма *M. tuberculosis* (А d a m e.a.⁸⁸).

Като⁹⁰ изучил действие корд фактора на митохондрию *in vivo* и *in vitro* и нашел, что он вызывает структурный распад митохондриальной мембраны и понижение степени митохондриального дыхания и фосфорилирования.

BCG (и другие микобактерии) повышает восприимчивость подопытных животных к эндотоксинам грамм-отрицательных бактерий. Из опытов Сатера⁹¹ видно, что только один корд фактор имеет это (довольно нежелательное) свойство; бактерии, предварительно обезжиренные ацетоном, теряют его (будучи инъецированы в физиологическом растворе; неопубликованные опыты, проведенные совместно с Л. Чэйдид и А. Ламенсанс).

Недавно диэфиры трегалозы были найдены также в микроорганизмах, не относящихся к микобактериям; так, Оказаки и др.⁴⁸ нашли диэфир трегалозы и C₃₆-кориномиколедиеновой кислоты (XIII) в *Brevibacterium thiovaginalis*, а диэфиры трегалозы частично неуставленной структуры были найдены недавно Сузуки и др.⁹² в бактериях, выращенных на парафине в качестве единственного источника углерода (*Arthrobacter paraffineus* и др.).

Эти авторы пишут: «Липиды трегалозы, будучи добавлены к смеси н-парафина и воды, проявляют заметную активность как поверхностно-активные вещества. Возможно, что эти липиды играют значительную роль в использовании парафина этими микроорганизмами». Кроме того, отмечается аналогия с потребляющими углеводороды дрожжами (*Torulopsis*), в которых, как было опубликовано, содержатся липиды софорозы, способствующие диспергированию н-парафина в водном растворе питательной среды.

Таким образом, видно, что детергентные свойства диэфиров трегалозы используются бактериями для абсорбции липидов.

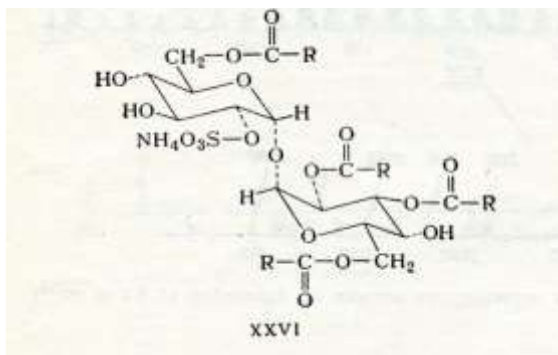
3) Сульфолипиды

В 1959 г. Миддлбрук и др.⁹³ описали выделение анионного серосодержащего липида из вирулентного человеческого штамма *M. tuberculosis*. По предварительным данным можно было предположить, что цитохимически фиксируемая по нейтральному красному активность жизнеспособных кордобразующих вирулентных бактерий туберкулеза обусловлена сульфолипидами;

* - Диэфиры трегалозы и миколовых кислот, содержащих циклопропановое звено, дают «оксониевые ионы» с четными массовыми числами, в то время как другие диэфиры (как синтетические, так и выделенные из *M. butyricum*), не содержащие циклопропановых звеньев, дают нормальные оксониевые ионы с нечетными массовыми числами⁸⁷.

Гангадхарам и др.⁹⁴ нашли корреляцию между содержанием сульфоллипидов в 12 различных штаммах и степенью их заразности для морских свинок, тем самым подтвердив возможную роль этих липидов в патогенезе туберкулеза.

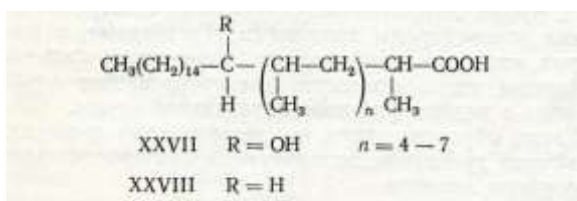
Совсем недавно Горен⁹⁵ описал выделение смеси сульфоллипидов вирулентного человеческого штамма Н₃₇Rv и определил принципиальные особенности строения одного из них (XXVI).



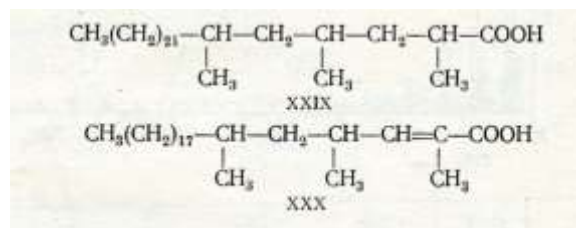
Трегалоза этерифицирована четырьмя ацильными радикалами и одной молекулой серной кислоты, причем последняя находится у гидроксила в положении 2 глюкозного остатка, содержащего жирно-ацильную группу у гидроксила в положении 6. Другой остаток глюкозы имеет три ацильные группы в положениях 2, 3 и 6.

Горен⁹⁵ показал, что по крайней мере три из четырех ацильных радикалов сульфоллипида различны (кислоты А, В и С); было найдено, что кислота В является пальмитиновой.

Более тщательное изучение строения ацильных радикалов масс-спектрометрическим методом⁹⁶ привело к идентификации кислот А и С. Кислота С является смесью гомологичных кислот, представляющих собой тип оксикислот (XXVII), которые имеют повторяющуюся последовательность метильных групп. Масс-спектрометрия показала присутствие кислот, содержащих 31, 34, 37 и 40 атомов углерода.



После элиминирования гидроксильной группы из кислоты С было получено соединение, метиловый эфир которого оказался идентичным метиловому эфиру кислоты А; таким образом, последняя имеет строение (XXVIII), сходное со строением микоцерозиновых кислот (например, XXIX). Последние, однако, являются левовращающими, в то время как кислоты А и С — правовращающие и имеют стереохимию, подобную стереохимии правовращающих фтиеновых кислот (например, XXX).



Принимая во внимание наличие серии гомологичных кислот С31, С34, С37 и С40, наиболее вероятный путь биосинтеза кислот А и С заключается в конденсации пальмитоил-СоА с 5—8 последовательными звеньями пропионата. Это согласуется с предшествующими исследованиями Гастамбид-Одъера в нашей лаборатории⁹⁷, показавшими включение пропионовой кислоты в микоцерозиновые кислоты (как это было предсказано Полгером и Робинсоном⁹⁸).

III. ДРУГИЕ ВОЗМОЖНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ МИКОБАКТЕРИЙ

Напрашивается вопрос: все ли компоненты клеточной стенки нами перечислены? Вероятно, нет. Вероятно, может быть добавлен ряд других типов соединений: **микозиды, глюкан и липопептиды** (или липопротеины). Тейхоевые кислоты в микобактериях пока не найдены.

Микозиды: специфические гликолипиды микобактериального происхождения^{98,3}, были открыты Смитом, Рэндэллом и Мак-Леннаном^{99, 100}. Об их биологических свойствах еще ничего не известно, но Фреган и др.¹⁰¹ наблюдали четкую разницу в структуре поверхностей колоний штаммов, содержащих и не содержащих микозиды; можно предположить, что микозиды также расположены на поверхности клеток.

После наших обзоров по химии этих соединений^{61,102} новых данных не было получено.

Глюкан описан несколькими авторами; он располагается, вероятно, на клеточной стенке или внутри нее^{62,65}.

Липопептиды. В гидролизатах клеточных стенок был найден ряд «немукопептидных» аминокислот. Они могут быть выделены в отдельные фракции после ацетоллиза или действия энзима *Mucobacter Ali* и, видимо, являются частью липопептида (или пептидолипида), который, вероятно, соединен с клеточной стенкой способом, описанным Брауном и Зиглином¹⁰³ для муреин-липопротеида клеточной стенки *E. coli* (Пети и др., Уилкас и др., данные не опубликованы).

В настоящее время трудно согласовать ту упрощенную картину клеточной стенки, которую мы даем здесь, с результатами Имаеда и др.¹⁰⁴ по электронной микроскопии, согласно которым имеется три слоя: наружный слой, состоящий из липополисахаридов, содержащих глюкозу, галактозу и арабинозу, средний слой, являющийся липосахарид — липид — протеиновым комплексом, и внутренний слой, содержащий липополисахарид — мукопептидный комплекс, который состоит из фибрилл, содержащих включения миколовых кислот — полисахаридов в мембранный арабиногалактан — муко- пептидный слой.

См. также Уиндер и Руней¹⁰⁵.

IV. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК МИКОБАКТЕРИЙ

Изучение химии бактериальных клеточных стенок ведется весьма активно во многих лабораториях, что обусловлено их огромным значением. Однако клеточные стенки микобактерий имеют еще одно интересное свойство: они вызывают у подопытных животных ряд биологических изменений, которые ведут к увеличению производства антител и, в общем, к увеличению резистентности к инфекциям, вызываемым не только микобактериями, но также и агентами, не родственными микобактерии.

Эти биологические эффекты дополнительно стимулируют наши исследования и открывают интересные возможности клинических применений; вкратце они описаны ниже.

1) Выработка специфического иммунитета против туберкулеза

Анакер и др.¹⁰⁶ в серии статей описали выработку иммунитета против туберкулезной инфекции у подопытных животных, вызванную обработанными маслом клеточными стенками микобактерий. Недавно, однако, они показали¹⁰⁷, что их препараты клеточной стенки могут быть дезактивированы экстракцией органическими растворителями и обработкой щелочью или липазой; эти инактивированные препараты, соединенные с фракцией воска D, вновь приобретают защитные свойства.

■ Неизвестно, насколько специфичной является иммунизация, описанная Анакером и др.^{106,107}.

2) Адьювантная активность

Адьювант Фрейнда¹⁰⁸ (клетки микобактерии в воде в виде масляной эмульсии, содержащей антиген в водной фазе) широко известен иммунологам^{109, 110}. Мукопептидсодержащие фракции воска D человеческих штаммов и *M. kansasii* могут заменить целую микобактерию в адьюванте Фрейнда^{111,112}. Эти наблюдения позволяют изучить специфику действия адьюванта; можно сделать вывод о необходимости присутствия как мукопептида, так и миколовых кислот с длинной цепью. Структуры, приведенные на рис. 4 или рис. 5, возможно, удовлетворяют минимальным требованиям для адьювантной активности.

Современный обзор по механизму адьювантного действия см. Параф¹¹³.

3) Стимулирование неспецифической резистентности к инфекциям

Антибактериальное действие. Дюбо и др.^{114,115} показали, что инъекция неповрежденных клеток микобактерий мыши может выработать иммунитет к гетерологическим инфекциям.

Говард и др.¹¹⁶ показали, что на мышах ВСГ вызывает эффект стимулирования фагоцитозной активности ретикулоэндотелиальной системы и таким образом повышает резистентность к инфекции *Salmonella enteridis*.

Вейсс и др.^{117,118} показали, что эта гетерологическая иммуногенность ВСГ сохранялась у нерастворимого осадка, полученного после экстракции метанолом. Фокс и др.¹¹⁹ исследовали стимулирование неспецифичной резистентности к инфекции сырым препаратом клеточной стенки из *M. phlei*, а Мисаки и др.³ показали, что мукопептидный препарат ВСГ оказывает защитное действие против стафилококковой инфекции у мышей, которое так же высоко, как и у неповрежденных клеток ВСГ.

В сотрудничестве с Чедид и А. Ламенсанс из Института Пастера мы получили аналогичные результаты: различные более или менее очищенные препараты клеточной стенки микобактерий являются активными в отношении стимулирования резистентности мышей к инфекции *Klebsiella pneumoniae* (табл. 2).

Таблица 2
Действие ВСГ и препаратов клеточной стенки на инфекции, вызванные *Klebsiella pneumoniae*

Интъекционный материал	Доза, μ г	Время жизни в днях	Выжившие после 30 дней/общее количество животных
Физиологический раствор	—	1,6	0/50
<i>S. enteridis</i> (эндотоксин)	1	5,7	0/10
BCG	100	13,8	2/10
Обработанная ацетоном BCG	100	11	1/10
<i>M. smegmatis</i> , необработанные клеточные стенки	100	7,3	0/10
<i>M. tuberculosis</i> , очищенные клеточные стенки	100	15,2	0/10
<i>M. kansasii</i> , обработанная ацетоном	100	14,2	2/10
<i>M. kansasii</i>	100	10,7	1/10
<i>M. kansasii</i> , очищенные клеточные стенки	100	20,4	5/10

Соединения вводились в мышь внутривенно, за 24 ч до внутривенного введения 10⁸ бактерий. Л. Чедид и А. Ламенсанс, неопубликованные эксперименты.

Противовирусное и противоопухолевое действие. Горке и др.¹²⁰ показали, что предварительная обработка мышей полным адьювантом Фрейнда или адьювант-активным препаратом воска D сокращает время продуцирования интерферона после инъекции вируса и таким образом оказывает положительный эффект на вирусные инфекции.

Многие авторы изучили благоприятное действие вакцины ВСГ при вирусной

лейкемии (Лемонд и др.^{121,122}, Ламенсанс и др.¹²³) и при вирусных опухолях (Берман и др.¹²⁴).

Гальперн и др.¹²⁵ показали, что на крысах ВСГ подавляет рост трансплантированной опухоли (типичная эпителиома Т-8) и развитие асцита Эрлиха у мышей (Биози и др.¹²⁶). Олд и др.¹²⁷ сообщили, что вакцина ВСГ подавляет рост саркомы, вызванной метилхолантреном.

Сошлемся на недавние работы по влиянию ВСГ на изменение опухоли, вызванной аденовирусом типа 12 у мышей (Сьегрен и Анкерст¹²⁸). «В данной работе показано, что при помощи ВСГ можно получить эффективную защиту против некоторых типов опухолей путем неспецифического стимулирования иммунологической чувствительности организма. Этот эффект достигается в относительно поздней стадии скрытого периода развития опухоли».

Это подтверждается неопубликованными опытами Чедида и Ламенсанса (Институт Пастера), которые показали благоприятное действие препаратов клеточной стенки (полученных А. Адамом и Ж. Ф. Пети в Орсее) на время выживания мыши, которая была заражена лимфатической лейкемией (табл. 3) или асцитом Эрлиха (табл. 4).

Таблица 3
Действие ВСГ и клеточных стенок *M. kansasii* на лимфатическую лейкемию мышей

Интъекционный материал	Доза, μ г	Время жизни, в днях	Выжившие после 30 дней/общее число животных
Физиологический раствор	—	25,5	0/10
BCG	10	41,4	3/10
	30	49,2	4/9
	100	43,9	3/9
Очищенные клеточные стенки <i>M. kansasii</i> *	10	38,6	1/10
	30	50,6	5/10
	100	53,6	8/10

Гибрид (C₂₇B^{1/6})(AK)F₂ мыши; интраперитонеальные инъекции ВСГ или клеточных стенок, за 8 дней до интраперитонеальной инокуляции 10⁸ клеток.
* Приготовлены А. Адамом и Дж. Ф. Пети.
Л. Чедид и А. Ламенсанс, неопубликованные эксперименты.

Таблица 4
Действие ВСГ, *M. kansasii* и их клеточных стенок на выживание мышей, инокулированных асцитом Эрлиха

Интъекционный материал	Доза, μ г	Время жизни, в днях	Выжившие после 60 дней/общее число животных
Физиологический раствор	—	21,5	0/67
<i>S. enteridis</i> (эндотоксин)	10	29,5	1/7
	100	29	1/10
BCG (убитые фенолом)	100	47,7	5/19
	300	49,5	22/46
	1000	47,4	4/9
Экстрагированная ацетоном BCG	300	40,5	2/8
	1000	52,7	4/7
<i>M. kansasii</i> (убитые фенолом)	300	41,2	2/19
<i>M. kansasii</i> необработанные клеточные стенки*	300	54,9	7/10
	1000	57,6	8/10

Гибрид (C₂₇B^{1/6})(AK)F₂ мыши.
Обработка: интраперитонеальная инъекция, за 14 дней до интраперитонеальной инокуляции 10⁸ клеток.
* Приготовлены А. Адамом и Дж. Ф. Пети.
Л. Чедид и А. Ламенсанс, неопубликованные эксперименты.

Клинические опыты успешного применения VCG при лечении острой лимфобластической лейкемии были опубликованы Матэ и др.¹²⁹.

Возможно, что по крайней мере часть из этих эффектов неповрежденных клеток VCG обусловлена гликолипид — мукопептидным комплексом, обсужденным ранее; аналогичные опыты с *C. parvum*, содержащим «ретикулостимулин», находятся в согласии с этим предположением*.

Задача химиков. Не может быть сомнений в том, что клетки микобактерий в целом, равно как и некоторые их фракции, стимулируют ретикулоэндотелиальную систему и что это свойство может найти ценное применение для лечения человеческих болезней.

Однако сами клетки микобактерий проявляют ряд нежелательных побочных

Мы делаем вывод, что структуры типа (X) или приведенные на рис. 4 и 5 необходимы для полной адьювантной активности. Будут ли полностью активны мономеры или только олигомеры, или полимеры? Отвечать на этот вопрос еще рано.

И еще вопрос: можно ли получить фракции, имеющие только адьювантную активность и не имеющие «ретикулостимулиновой» активности и наоборот? Предварительные эксперименты Ж. Чэдида и А. Ламенсанса с препаратами, полученными А. Адамом и Ж. Ф. Пети, показывают, что это, вероятно, возможно.

- Обработка: интраперитонеальная инъекция, за 14 дней до интраперитонеальной инокуляции 105 клеток.

* Приготовлены А. Адамом и Дж. Ф. Пети, Л. Чедид и А. Ламенсанс, неопубликованные эксперименты.

Прево и др.¹³⁰ сообщили, что анаэробные *S. razvum* обладают сильной «ретикулостимулиновой» активностью; клеточные стенки этого штамма также активны¹³¹; их мукопептиды содержат Ь,1-диаминоггимелиновую кислоту¹³².

действий, таких, как повышение чувствительности к туберкулину и эндотоксинам, образование гранулемы и т. д. Возникает вопрос, возможно ли выделить фракции микобактерий, обладающие только желательными эффектами?

Сейчас слишком рано давать ответ на этот вопрос; первоочередная задача заключается в выявлении наименьшей химической структуры, ответственной за «желательное действие» (адьювантная активность и (или) стимулирование ретикулоэндотелиальной системы)].

В настоящий момент это представляется возможным только для адьювантной активности, так как известно, что активные препараты воска D содержат мукопептид и миколовые кислоты. Еще нет данных о структурной специфичности арабиногалактового звена.

Задачей химика является разложение клеточных стенок микобактерий мягкими, преимущественно энзиматическими методами, выделение простейших типов молекул, обладающих той или иной «желательной активностью». Конечно, эта работа должна проводиться в тесном контакте с компетентными биологами. В то же время должны быть синтезированы модельные соединения с тем, чтобы, наконец, получить активные соединения полным синтезом. Это может потребовать нескольких лет напряженной работы; но перспективы успеха кажутся заманчивыми и усилия будут вознаграждены.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. Kotani, T. Kitaura, T. Hirano, A. Tanaka, *Biken's J.*, **2**, 129 (1959).
2. K. Takeya, K. Hisatsune, Y. Inoue, *J. Bacteriol.*, **85**, 24 (1963).
3. A. Masaki, S. Yukawa, K. Tsuchiya, T. Yamasaki, *J. Biochem.*, **59**, 388 (1966).
4. F. Kanetsuna, *Biochem. Biophys. Acta*, **158**, 130 (1968).
5. J. M. Ghuysen, J. L. Strominger, D. J. Tipper, *Bacterial Cell Wall*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, in *Comprehensive Biochemistry*, **26 A**, 53 (1968).
6. J. M. Ghuysen, *Bacteriol. Rev.*, **32**, 426 (1968).
7. R. W. Jeanloz, *Pure Appl. Chem.*, **14**, 57 (1967).
8. J. T. Park, M. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **179**, 585 (1949).
9. M. R. J. Salton, *The Bacterial Cell Wall*, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1964.
10. J. L. Strominger in I. C. Gunsalus, R. Y. Stanier (Eds.) *The Bacteria*, **111**, 413 (1962) Academic Press, New York.
11. D. J. Tipper, J. M. Ghuysen, J. L. Strominger, *Biochemistry*, **4**, 468 (1965).
12. A. D. Warth, J. L. Strominger, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **64**, 528 (1969).
13. J. F. Petit, A. Adam, J. Wietzerbin-Falszpan, E. Lederer, J. M. Ghuysen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **35**, 478 (1969).
14. A. Adam, J. F. Petit, J. Wietzerbin-Falszpan, P. Sinay, D. W. Thomas, E. Lederer, *FEBS Letters*, **4**, 87 (1969).
15. P. Sinay, Abstracts of Papers, 158th Am. Chem. Soc., National Meeting, New York, September, 1969.
16. I. Azuma, D. W. Thomas, A. Adam, J. M. Ghuysen, R. Bonaly, J. F. Petit, E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 444 (1970).
17. M. Guinand, M. J. Vacheron, G. Michel, *FEBS Letters*, **6**, 37 (1970).
18. E. Vilkas, J. C. Massot, E. Zissmann, *FEBS Letters*, **7**, 77 (1970).
19. J. F. Petit, A. Adam, J. Wietzerbin-Falszpan, *FEBS Letters*, **6**, 55 (1970).
20. J. L. Strominger, E. Ito, R. N. Threnn, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 998 (1960).
21. K. Takayama, H. L. David, L. Wang, D. S. Goldman, *Biochem. Biophys. Comm.*, **39**, 7 (1970).
22. H. J. Schoop, R. Schauer, Faillard, *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 155 (1969).
23. D. S. Hoare, E. Work, *Biochem. J.*, **65**, 441 (1957).
24. C. S. Cummins, M. Harris, *J. Gen. Microbiol.*, **18**, 173 (1958).
25. C. S. Cummins, *J. Gen. Microbiol.*, **28**, 35 (1962).
26. K. Kato, J. L. Strominger, S. Kotani, *Biochemistry*, **7**, 2762 (1968).
27. J. van Heijenoort, L. Elbaz, P. Dezé-lée, J. F. Petit, E. Bricas, J. M. Ghuysen, *Biochemistry*, **8**, 207 (1969).
28. G. Cunto, F. Kanetsuna, T. Imaeda, *Biochim. Biophys. Acta*, **192**, 358 (1969).
29. D. Migliore, P. Jollés, *FEBS Letters*, **2**, 7 (1968).
30. D. Migliore, P. Jollés, *C. R. Acad. Sci.*, **269**, série D, 2268 (1969).
31. J. Wietzerbin-Falszpan, B. C. Das, I. Azuma, A. Adam, J. F. Petit, E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (in press).
32. B. C. Das, S. D. Géro, E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **29**, 211 (1967).
33. D. W. Thomas, B. S. Das, S. D. Géro, E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **32**, 519 (1968).
34. E. Vilkas, E. Lederer, *Tetrahedron Letters*, **3089** (1968).
35. E. Lederer, *Pure Appl. Chemistry*, **17**, 489 (1968).
36. D. W. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **32**, 483 (1968); *FEBS Letters*, **5**, 53 (1969).
37. R. J. Anderson, *Harvey Lectures*, **35**, 271 (1939); *Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe*, **3**, 145 (1939); *Chem. Rev.*, **29**, 225 (1941).
38. A. H. Etémadi, R. Okuda, E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. France*, 868 (1964).
39. A. H. Etémadi, Thèse de Doctorat ès-Sciences Physiques Paris, 1965; *Exposés Annuels de Biochimie Médicale*, **28**, 77 (1967).
40. A. H. Etémadi, A. M. Miquel, E. Lederer, M. Barbier, *Bull. Soc. Chim. France*, 3274 (1964).
41. J. Asselineau, Thesis Dr. ès-Sciences, University of Paris, 1950; Ed. Arnette, 1951.
42. J. Asselineau, *The Bacterial Lipids*, Hermann Paris and Holden-Day San Francisco, 1966.
43. J. Asselineau, E. Lederer, *Nature*, **166**, 782 (1950); *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 126 (1951).
44. E. Lederer, J. Pudles, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 1003 (1951).
45. T. Itoneda, E. Lederer, J. Rozanis, *Chem. Phys. Lipids* (in press).
- 45a. P. J. Brennan, D. P. Lehane, D. W. Thomas, *Europ. J. Biochem.*, **13**, 117 (1970).
46. J. Pudles, E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 163 (1953).
47. M. Welby-Gieusse, M. A. Lanéelle, J. Asselineau, *Europ. J. Biochem.*, **13**, 164 (1970).
48. H. Okazaki, H. Sugino, T. Kanzaki, H. Fukuda, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 764 (1969).
49. G. Michel, C. Bordet, E. Lederer, *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 3518 (1960).
50. A. N. Etémadi, C. Bordet, G. Michel, E. Lederer, *Bull. Soc. Chim. France*, 234 (1965).
51. C. Bordet, G. Michel, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **51**, 527 (1969).
- 51a. J. Krembel, A. N. Etémadi, *Tetrahedron Letters*, 1113 (1969).
52. A. H. Etémadi, *C. R. Acad. Sci.*, **263**, sér. D, 1257 (1966).
53. J. Markovits, F. Pinte, A. H. Etémadi, *C. R. Acad. Sci.*, **263**, sér. C 960 (1966).
- 53a. D. E. Minnikin, R. Polgar, *Chem. Comm.*, **312**, 1172 (1967).
- 53b. C. Asselineau, H. Montrosier, J. C. Promé, *Bull. Chim. Soc. France*, 592 (1969).
54. C. Asselineau, G. Tocanne, J. F. Tocanne, *Bull. Soc. Chim. France*, 1455 (1970).
55. M. Gastambide, E. Lederer, *Nature*, **184**, 1563 (1959); *Biochem. Ztschr.*, **333**, 285 (1960).
56. A. H. Etémadi, E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 160 (1965); *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 107 (1963).
57. E. Waczkak, A. H. Etémadi, *C. R. Acad. Sci.*, **261**, 2771 (1965).
58. F. G. A. Winder, P. Collins, S. A. Rooney, *Biochem. J.*, **117**, 27p (1970).
59. G. Jauréguiberry, M. Lenfant, B. C. Das, E. Lederer, *Tetrahedron supp.* **8**, part. 1, 27 (1966).
60. W. Hofheinz, H. Grisebach, *Z. Naturforsch.*, **20b**, 43 (1965).
61. E. Lederer, *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 294 (1967).
62. A. Masaki, S. Yukawa, *J. Biochem. (Tokyo)*, **59**, 511 (1966).
63. I. Azuma, Y. Yamamura, A. Masaki, *J. Bacteriol.*, **98**, 331 (1969).
64. C. Amar-Nacasz, E. Vilkas, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **51**, 613 (1969).
65. C. Amar-Nacasz, E. Vilkas, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **52**, 145 (1970).
66. I. Azuma, Y. Yamamura, *J. Biochem.*, **52**, 200 (1962); **53**, 275 (1963).
67. N. P. V. Acharya, M. Senn, E. Lederer, *C. R. Acad. Sci.*, ser. C, **264**, 2173 (1967).
68. F. Kanetsuna, T. Imaeda, G. Cunto, *Biochim. Biophys. Acta*, **173**, 344 (1969).

69. M. A. Lanéelle, J. Asselineau, FEBS Letters, 7, 64 (1970).
70. I. Y. Liu, E. C. Gotschlich, J. Biol. Chem., 242, 471 (1967).
71. F. Kanetsuna, Biochim. Biophys. Acta (in press).
72. J. Markovits, E. Vilkas, Biochim. Biophys. Acta, 192, 49 (1969).
73. P. Jollés, D. Samour, E. Lederer, Arch. Biochem. Biophys. suppl., 283 (1962).
74. P. Jollés, D. Samour-Migliore, H. de Wijs, E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta, 83, 361 (1964).
75. E. Vilkas, J. M. Delauné, C. Amar-Nacasch, Biochim. Biophys. Acta, 158, 147 (1968).
76. S. Kotani, S. Hashimoto, T. Matsumbara, K. Kato, K. Harada, J. Kogami, T. Kitaura, A. Tanaka, Biken J., 6, 181 (1963).
77. H. L. David, D. S. Goldman, K. Takayama, Infection and Immunity, 1, 74 (1970).
78. H. Bloch, J. Exp. Med., 91, 197 (1950); 92, 507 (1950).
79. H. Noll, Adv. Tuberc. Res., 7, 149 (1956).
80. E. Lederer, A. Stoll, Festschrift, Basel, 1957, S. 384.
81. H. Noll, H. Bloch, J. Asselineau, E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta, 20, 299 (1956).
82. E. Vilkas, A. Rojas, Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 689 (1964).
83. E. Vilkas, A. Adam, M. Senn, Chem. Phys. Lipids, 2, 11 (1968).
84. T. Yoneda, M. Lenz, J. Pudles, Biochem. Biophys. Res. Comm., 13, 110 (1963).
85. C. Bordet, M. J. Vacheron, G. Michel, FEBS Letters, 5, 253 (1969).
86. A. Adam, M. Senn, E. Vilkas, E. Lederer, Europ. J. Biochem., 2, 460 (1967).
87. G. Brochére-Ferréol, J. Polonsky, Bull. Soc. Chim. France, 714 (1958).
88. M. Senn, T. Itoneda, J. Pudles, E. Lederer, Europ. J. Biochem., 1, 333 (1967).
89. A. Becerkunst, I. S. Levij, E. Yarkoni, E. Vilkas, A. Adam, E. Lederer, J. Bacteriol., 100, 95 (1969).
90. M. Kato, K. Fukushi, Am. Rev. Resp. Dis., 100, 42 (1969); M. Kato, Am. Rev. Resp. Dis., 100, 47 (1969).
91. E. Suter, E. M. Kirsanow, Immunology, 4, 354 (1961).
92. T. Suzuki, K. Tanaka, I. Matsubara, S. Kinoshita, Agr. Biol. Chem., 33, 1619 (1969).
93. G. Middlebrook, C. M. Coleman, W. B. Schaefer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45, 1809 (1959).
94. P. R. S. Gangadharam, M. L. Cohn, G. Middlebrook, Tubercle, 44, 452 (1963).
95. M. B. Gorer, Biochim. Biophys. Acta (in press).
96. M. B. Gorer, O. Brokl, B. C. Das, E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta (in press).
97. M. Gastambide-Odier, J. M. Delauné, E. Lederer, Biochim. Biophys. Acta, 70, 670 (1963).
98. N. Polgar, R. Robinson, Chem. a. Ind., 685 (1961).
- 98a. D. W. Smith, H. M. Randall, A. P. MacLennan, E. Lederer, Nature, 186, 887 (1960).
99. D. W. Smith, H. M. Randall, M. Gastambide-Odier, A. L. Koevoet, Ann. N. Y. Acad. Sci., 69, 145 (1957).
100. D. W. Smith, H. M. Randall, A. P. MacLennan, R. K. Putney, S. V. Rao, J. Bacteriol., 79, 217 (1960).
101. B. B. Fregnan, D. W. Smith, H. M. Randall, J. Bacteriol., 82, 517 (1961).
102. E. Lederer, Pure Appl. Chem., 17, 489 (1968).
103. V. Braun, U. Sieglin, Europ. J. Biochem., 13, 336 (1970).
104. T. Imaeda, F. Kanetsuna, B. Galindo, J. Ultrastructure Res., 25, 46 (1968).
105. F. G. Winder, S. E. Rooney, Biochem. J., 117, 355 (1970).
106. R. L. Anacker, W. R. Barclay, W. Brehmer, G. Goode, R. N. List, E. Ribí, D. F. Tarmina, Am. Rev. Resp. Diseases, 99, 242 (1969).
107. R. L. Anacker, W. D. Bickel, W. Brehmer, M. Niwa, E. Ribí, D. F. Tarmina, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 130, 723 (1969).
108. J. Freund, The mode of action of immunologic adjuvants, Advan. Tuberc. Res., 7, 130 (1956).
109. R. G. White, in «Molecular and cellular basis of antibody formation», Prague, 1964, p. 71.
110. R. G. White, in «Modern Trends in Immunology», R. Cruickshank & D. M. Weir Editors, Butterworths London, 2, 28 (1967).
111. R. G. White, L. Bernstock, R. G. S. Johns, E. Lederer, Immunology, 1, 54 (1958).
112. R. G. White, P. Jollés, D. Samour, E. Lederer, Immunology, 7, 158 (1964).
113. A. Paraf, Ann. Inst. Pasteur, 118, 419 (1970).
114. R. J. Dubos, R. W. Schaedler, J. Exp. Med., 106, 703 (1957).
115. C. A. Williams, R. J. Dubos, J. Exp. Med., 110, 981 (1959).
116. J. G. Howard, G. Biozzi, B. N. Halpern, C. Stiffel, D. Mouton, Brit. J. Exp. Path., 40, 281 (1959).
117. D. W. Weiss, R. S. Bonhag, J. A. Parks, J. Exp. Med., 119, 53 (1964).
118. C. B. Steinkuller, L. G. Krigbaum, D. W. Weiss, Immunology, 16, 255 (1969).
119. A. E. Fox, G. I. Evans, F. J. Turner, B. S. Schwartz, A. Blaustein, J. Bacteriol., 92, 1 (1966).
120. D. S. Gorbé, J. Asso, A. Paraf, Ann. Inst. Pasteur, Paris, 115, 446 (1968).
121. P. Lemonde, M. Clode, Proc. Soc. Biol. Med., 111, 739 (1962).
122. P. Lemonde, M. Clode-Hyde, Cancer Res., 26, 585 (1966).
123. A. Lamensans, M. F. Mollier, M. Laurent, Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol., 13, 871 (1968).
124. L. D. Berman, A. Allison, H. G. Pereira, Int. J. Canc., 2, 539 (1967).
125. B. N. Halpern, G. Biozzi, C. Stiffel, D. Mouton, C. R. Soc. Biol., 153, 919 (1959).
126. G. Biozzi, C. Stiffel, B. N. Halpern, D. Mouton, C. R. Soc. Biol., 153, 987 (1969).
127. L. D. Old, B. Benacerraf, D. A. Clarke, E. Carswell, E. Stockert, Cancer Res., 21, 1281 (1961).
128. H. O. Sjögren, J. Ankerst, Nature, 221, 863 (1969).
129. G. Mathé, J. L. Amiel, L. Schwarzenberg, M. Schneider, A. Cattani, J. R. Schtumberger, M. Haytt, F. de Vassal, Rev. Française Etudes Clin. Biol., 13, 454 (1968).
130. A. R. Prévot, B. Halpern, G. Biozzi, C. Stiffel, D. Mouton, J. C. Morard, Y. Bouthiller, C. Decreusefond, Compt. Rend., 257, 13 (1963).
131. A. R. Prévot, T. Nguyen-Dang, H. Tournot, Compt. Rend., 267, sér. D, 1061 (1968).
132. T. Nguyen-Dang, Compt. Rend., 269, sér. D, 1455 (1969).