



УДК 577.114.5:579.841.11:543.422.23

# АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ. 41. УТОЧНЕННЫЕ СТРУКТУРЫ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Shigella dysenteriae* ТИПОВ 4 И 5 ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

© 2008 г. А. В. Перепелов<sup>##</sup>, С. Н. Сенченкова<sup>\*</sup>, А. С. Шашков<sup>\*</sup>, Ю. А. Книрель<sup>\*</sup>, Б. Лю<sup>\*\*\*</sup>, Л. Фенг<sup>\*\*\*</sup>, Л. Ванг<sup>\*\*\*</sup>

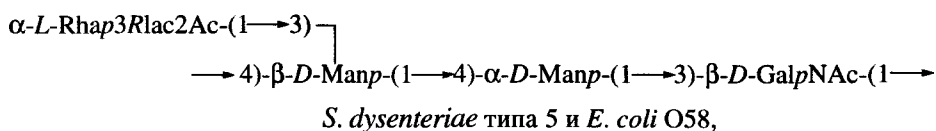
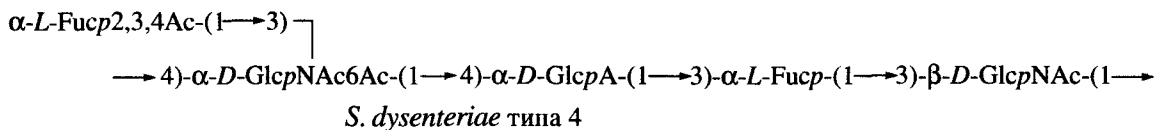
<sup>\*</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47, Российская Федерация;

<sup>\*\*</sup>Школа биологических наук и биотехнологии Нанкайского университета, Тянь-дзинь, ТЕДА, КНР;

<sup>\*\*\*</sup>Лаборатория функциональной геномики микробов колледжа ТЕДА Нанкайского университета, Тянь-дзинь, ТЕДА, КНР

Поступила в редакцию 02.08.2007 г. Принята к печати 22.08.2007 г.

Строение изученных ранее кислых О-специфических полисахаридов двух типовых штаммов бактерий *Shigella dysenteriae* уточнено с использованием современных методов спектроскопии ЯМР. Исправления коснулись конфигурации гликозидной связи остатков GlcNAc (*S. dysenteriae* типа 4) и маннозы (*S. dysenteriae* типа 5). Кроме того, у бактерии *S. dysenteriae* типа 4 локализованы сайты нестехиометрического О-ацетилирования, причем О-ацетилирование бокового остатка фукозы носит случайный характер, а у бактерии *S. dysenteriae* типа 5 уточнено положение О-ацетильной группы, присутствующей в стехиометрическом количестве. Исправленные структуры полисахаридов приведены ниже. Обнаруженная ранее идентичность структур О-специфических полисахаридов *S. dysenteriae* типа 5 и *Escherichia coli* O58 подтверждена с помощью <sup>13</sup>С-ЯМР-спектроскопии, и, следовательно, структура полисахарида *E. coli* O58 должна быть пересмотрена таким же образом.



где L-Rhap3Rlac2Ac – 2-О-ацетил-3-О-[(R)-1-карбоксиитил]-L-рамноза.

**Ключевые слова:** *Shigella dysenteriae*, О-антиген; О-специфический полисахарид, структура, спектроскопия ЯМР.

## ВВЕДЕНИЕ

Условно-патогенные бактерии *Shigella* – возбудители бактериальной дизентерии (шигеллеза) – в 1940-х годах были выделены в отдельный род, состоящий из четырех видов: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* и *S. sonnei*. В зависимости от структуры поверхностных О-антигенов три первых вида *Shigella* разделяются на серологические типы; в частности, в состав *S. dysenteriae* включено 13 типов. Считается, что антигенное разнообразие штаммов, возникшее в результате эволюции, способствует

Сообщение 40 см. [1].

Сокращения: КССВ – константа спин-спинового взаимодействия; ЛПС – липополисахарид; ОПС – О-специфический полисахарид; ДПС – О-деацетилированный полисахарид; COSY – корреляционная спектроскопия; EryA – эритроновая кислота; HMBC – гетероядерная корреляция через несколько связей; HSQC – гетероядерная спектроскопия с одноквантовым переносом когеренции; ROESY – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; TOCSY – полная корреляционная спектроскопия.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел./факс: (495) 137-61-48; эл. почта: perepel@ioc.ac.ru).

выживанию бактерий в различных экологических нишах. У шигелл, как и у других грамотрицательных бактерий, О-антигены представляют собой полисахаридные цепи (О-специфические полисахариды, ОПС) липополисахаридов (ЛПС), расположенных на внешней мембране клеточной оболочки. Они построены из линейных или разветвленных повторяющихся олигосахаридных звеньев, содержащих от четырех до шести моносахаридных остатков, и часто включают неуглеводные компоненты, такие, как аминокислоты, ацетали пировиноградной кислоты, эфиры молочной кислоты, фосфатные и О-ацетильные группы. Из 13 типов *S. dysenteriae* 11 типов, включая исследованные в настоящей работе типы 4 и 5, обладают О-антигенами, которые идентичны или близки по структуре О-антигенам различных О-серогрупп *Escherichia coli*, что обусловлено тесным генетическим родством эшерихий и произошедших от них шигелл.

Данные о структуре ОПС служат молекулярной основой для внутривидовых классификационных схем грамотрицательных бактерий, необходимых для серодиагностики и эпидемиологического мониторинга. В сочетании с генетическими данными они позволяют выяснять пути биосинтеза О-антигенов и их диверсификации в ходе эволюции бактерий. К настоящему времени изучено строение большинства О-антигенов дизентерийной палочки, однако структуры, установленные более 25 лет назад, нуждаются в пересмотре из-за недостаточной надежности аналитических методов (в основном химических), использовавшихся в то время для структурного анализа полисахаридов. Ранее были уточнены структуры ОПС бактерий *S. dysenteriae* типов 3 [1, 2] и 9 [1], а также *S. boydii* типов 4 [1] и 6 [3]. В настоящей работе приведены результаты повторного исследования ОПС двух штаммов *S. dysenteriae* типов 4 и 5 с использованием современных методов спектроскопии ЯМР, которое привело к уточнению их структур.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ОПС *S. dysenteriae* типов 4 и 5 получали мягкой кислотной деградацией ЛПС, выделенных водно-фенольной экстракцией бактериальных клеток, с последующей хроматографией на геле Sephadex G-50. Моносахаридный состав ОПС, включая абсолютные конфигурации моносахаридов, был надежно установлен при их первом исследовании в 1970-х годах, и, так как использованные тогда методы за последние десятилетия не претерпели существенных изменений и их надежность была многократно подтверждена независимыми методами, повторного определения моносахаридного состава ОПС в настоящей работе не проводилось.

ОПС были охарактеризованы данными спектров  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, которые затем были полностью расшифрованы с помощью двумерной спек-

троскопии ЯМР (табл. 1 и 2), включая эксперименты  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY, TOCSY, ROESY,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC и HMBC, по описанной методологии [4]. На основании констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) вицинальных протонов каждая из выявленных спиновых систем относилась к определенному моносахариду и по данным КССВ  $J_{1,2}$  устанавливалась конфигурация его гликозидного центра. Последующий структурный анализ ОПС, включающий определение положений заместителей моносахаридных остатков и их последовательности в повторяющемся звене, проводился с помощью спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (двумерный эксперимент ROESY) и  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -гетероядерной спектроскопии HMBC, выявляющих корреляции между связанными моносахаридными остатками.

*S. dysenteriae* типа 4. Ранее была установлена структура пентасахаридного повторяющегося звена ОПС *S. dysenteriae* типа 4, содержащего по два остатка *L*-фукозы и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина (*D*-GlcNAc), один остаток *D*-глюкуроновой кислоты (*D*-GlcA) и О-ацетильную группу, присоединенную в неизвестное положение к боковому остатку фукозы в нестехиометрическом количестве [5].

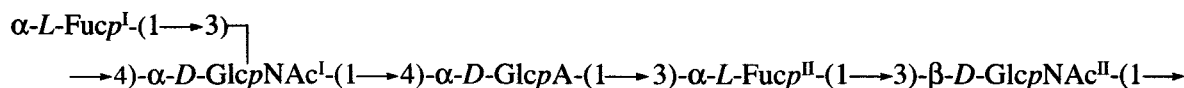
$^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр ОПС (рис. 1а) содержал серии сигналов различной интенсивности, что наряду с сигналами метильных групп  $\text{CH}_3\text{CO}_2$  в области 21.7–21.9 м.д. подтверждало его частичное О-ацетилирование. По данным спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (рис. 1б), после О-деацетилирования действием  $\text{NH}_4\text{OH}$  полисахарид стал регулярным. Спектр О-деацетилированного полисахарида (ДПС) содержал сигналы пяти аномерных атомов углерода при 99.6–102.0 м.д., двух  $\text{HOCH}_2\text{-C}$ -групп (С6 остатков GlcNAc) при 60.8 и 63.2 м.д., двух атомов углерода, связанных с азотом (С2 остатков GlcNAc), при 55.3 и 57.0 м.д., двух  $\text{CH}_3\text{-C}$ -групп (С6 остатков Fuc) при 16.5 и 16.9 м.д., одной  $\text{C-CO}_2\text{H}$ -группы (С6 остатка GlcA) при 175.7 м.д., 18 атомов углерода пиранозных циклов моносахаридов в области 68.0–81.9 м.д., а также двух *N*-ацетильных групп ( $\text{CH}_3$  при 23.5 и 23.7 м.д., CO при 175.7 и 176.2 м.д.). В  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектре ДПС присутствовали шесть сигналов в низкочастотной области при 4.55–5.17 м.д., включая сигналы пяти аномерных протонов и H5 остатка фукозы при 4.72 м.д., четыре сигнала в высокочастотной области, принадлежащие метильным группам двух остатков Fuc (H6) при 1.14 и 1.25 м.д. и двух *N*-ацетильных групп при 2.02 и 2.04 м.д., а также сигналы остальных протонов моносахаридов в области 3.31–4.31 м.д.

Полное отнесение сигналов в  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах ДПС (табл. 1 и 2) выявило спиновые системы двух остатков Fuc ( $\text{Fuc}^{\text{I}}$  и  $\text{Fuc}^{\text{II}}$ ), двух остатков GlcNAc ( $\text{GlcNAc}^{\text{I}}$  и  $\text{GlcNAc}^{\text{II}}$ ) и одного остатка GlcA, что полностью подтвердило установленный ранее состав повторяющегося звена О-антигена

[5]. Величина КССВ  $J_{1,2}$  8 Гц показала, что остаток GlcNAc<sup>II</sup> присоединен β-гликозидной связью, тогда как остальные моносахаридные остатки, характеризующиеся величинами КССВ  $J_{1,2} \sim 3$  Гц, имеют α-конфигурацию.

Сигналы C3 и C4 GlcNAc<sup>I</sup>, C4 GlcA, C3 Fuc<sup>II</sup> и C3 GlcNAc<sup>II</sup> в <sup>13</sup>C-ЯМР-спектре ДПС были смещены в слабое поле к 73.3, 79.3, 79.3, 74.6 и 81.9 м.д. соответственно по сравнению с их положением в незамещенных моносахаридах [6]. Это смещение, вызванное гликозилированием по соответствующим гидроксильным группам, позволило определить типы замещения моносахаридных остатков. Их последо-

вательность в повторяющемся звене была установлена на основании следующих корреляций между аномерными протонами и трансгликозидными связевыми атомами углерода, найденными в эксперименте НМBC: H1 Fuc<sup>I</sup>/C3 GlcNAc<sup>I</sup>, H1 GlcNAc<sup>I</sup>/C4 GlcA, H1 GlcA/C3 Fuc<sup>II</sup> и H1 Fuc<sup>II</sup>/C3 GlcNAc<sup>II</sup> при 5.11/73.3, 5.17/79.3, 5.17/74.6 и 4.97/81.9 м.д. соответственно. Спектр ROESY подтвердил полученные данные и позволил также установить недостающую связь на основании корреляции H1 GlcNAc<sup>II</sup>/H4 GlcNAc<sup>I</sup> при 4.55/3.87 м.д. Таким образом, ДПС имеет следующую структуру:



Для подтверждения этой структуры и, в частности, мест присоединения боковой и основной цепи к остатку GlcNAc<sup>I</sup>, была проведена деградация ДПС

по Смигу. При анализе полученного олигосахарида методом метилирования, включающем ГЖХ частично метилированных ацетатов полиолов, были

**Таблица 1.** Данные спектров <sup>1</sup>H-ЯМР (химические сдвиги, м. д.)

Остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6a,6b
<i>O</i> -Деацетилированный полисахарид из <i>S. dysenteriae</i> типа 4 <sup>a</sup>						
α-L-Fucp <sup>I</sup> -(1 →	5.11	3.68	3.95	3.79	4.72	1.25
→ 3,4)-α-D-GlcpNAc <sup>I</sup> -(1 →	5.17	4.13	3.91	3.87	3.72	3.72, 3.83
→ 4)-α-D-GlcpA-(1 →	5.17	3.57	3.73	3.73	4.18	
→ 3)-α-L-Fucp <sup>II</sup> -(1 →	4.97	3.88	3.89	3.91	4.31	1.14
→ 3)-β-D-GlcpNAc <sup>II</sup> -(1 →	4.55	3.80	3.63	3.31	3.44	3.59, 3.96
Олигосахарид из <i>S. dysenteriae</i> типа 4 <sup>b</sup>						
α-L-Fucp <sup>II</sup> -(1 →	5.01	3.72	3.84	3.81	4.34	1.17
→ 3)-β-D-GlcpNAc <sup>II</sup> -(1 →	4.64	3.89	3.70	3.57	3.55	3.77, 3.95
→ 4)-α-D-GlcpNAc <sup>I</sup> -(1 →	5.10	3.96	3.93	3.67	3.93	3.70, 3.83
→ 3)-EryA		4.25	3.98	3.70, 3.75		
<i>O</i> -специфический полисахарид из <i>S. dysenteriae</i> типа 5 <sup>b</sup>						
α-L-Rhap3Rlac2Ac-(1 →	4.98	5.35	3.83	3.57	4.38	1.33
→ 3,4)-β-D-Manp <sup>I</sup> -(1 →	4.67	4.16	3.81	3.96	3.45	3.73; 3.90
→ 4)-α-D-Manp <sup>II</sup> -(1 →	5.24	4.06	3.88	3.88	3.63	3.77; 3.81
→ 3)-β-D-GalpNAc-(1 →	4.50	3.76	3.67	3.40	3.40	3.58; 3.89
lac-(2 →		4.28	1.34			
<i>O</i> -Деацетилированный полисахарид из <i>S. dysenteriae</i> типа 5 <sup>b</sup>						
α-L-Rhap3Rlac-(1 →	4.93	4.12	3.67	3.57	4.28	1.29
→ 3,4)-β-D-Manp <sup>I</sup> -(1 →	4.68	4.19	3.79	3.96	3.45	3.73; 3.90
→ 4)-α-D-Manp <sup>II</sup> -(1 →	5.24	4.05	3.89	3.90	3.64	3.77; 3.81
→ 3)-β-D-GalpNAc-(1 →	4.50	3.74	3.68	3.42	3.40	3.60; 3.88
lac-(2 →		4.28	1.45			

Сигналы *N*-ацетильных групп находятся при <sup>a</sup> 2.02 и 2.04 м. д., <sup>b</sup> 2.04 и 2.06 м. д., <sup>c</sup> 2.00 м. д.

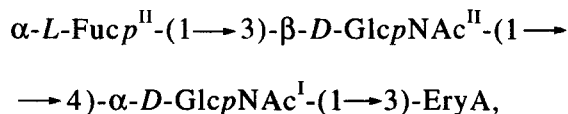
Сигнал *O*-ацетильной группы в ОПС из *S. dysenteriae* типа 5 находится при 2.18 м. д.

Таблица 2. Данные спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (химические сдвиги, м. д.)

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>O</i> -Дезацетилованный полисахарид из <i>S. dysenteriae</i> типа 4 <sup>a</sup>						
$\alpha$ -L-Fucp <sup>I</sup> -(1 →	99.7	69.2	70.7	73.3	68.0	16.9
→ 3,4)- $\alpha$ -D-GlcpNAc <sup>I</sup> -(1 →	99.6	55.3	73.3	79.3	73.3	60.8
→ 4)- $\alpha$ -D-GlcpA-(1 →	102.0	73.3	74.6	79.3	73.7	175.7
→ 3)- $\alpha$ -L-Fucp <sup>II</sup> -(1 →	101.6	68.7	74.6	73.7	68.4	16.5
→ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc <sup>II</sup> -(1 →	101.5	57.0	81.9	70.9	77.6	63.2
Олигосахарид из <i>S. dysenteriae</i> типа 4 <sup>b</sup>						
$\alpha$ -L-Fucp <sup>II</sup> -(1 →	101.5	69.4	71.0	73.3	68.4	16.6
→ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc <sup>II</sup> -(1 →	102.4	56.8	81.7	69.9	77.3	62.1
→ 4)- $\alpha$ -D-GlcpNAc <sup>I</sup> -(1 →	99.0	54.8	71.0	80.9	72.1	61.4
→ 3)-EryA	178.9	74.8	82.8	61.9		
<i>O</i> -специфический полисахарид из <i>S. dysenteriae</i> типа 5 <sup>b</sup>						
$\alpha$ -L-Rhap2Ac3Rlac-(1 →	95.7	70.7	78.9	72.7	70.0	18.1
→ 3,4)- $\beta$ -D-Manp <sup>I</sup> -(1 →	101.4	68.3	77.1	71.4	77.1	61.7
→ 4)- $\alpha$ -D-Manp <sup>II</sup> -(1 →	102.1	71.3	70.5	77.5	73.0	61.7
→ 3)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 →	101.6	56.0	81.1	73.0	77.5	63.2
lac-(2 →	181.0	76.2	20.1			
<i>O</i> -Дезацетилованный полисахарид из <i>S. dysenteriae</i> типа 5 <sup>r</sup>						
$\alpha$ -L-Rhap3Rlac-(1 →	98.0	69.1	80.6	72.4	70.0	18.1
→ 3,4)- $\beta$ -D-Manp <sup>I</sup> -(1 →	101.4	68.3	76.8	71.5	77.2	61.7
→ 4)- $\alpha$ -D-Manp <sup>II</sup> -(1 →	102.1	71.2	70.4	77.4	73.0	61.7
→ 3)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 →	101.6	56.0	81.1	72.9	77.4	63.1
lac-(2 →	181.0	75.9	20.4			

Сигналы *N*-ацетильных групп находятся при <sup>a</sup> 23.5, 23.7 (оба Me), 175.7 и 176.2 (оба CO) м. д.; <sup>b</sup> 23.3, 23.7 (Me), 175.7 и 176.2 (CO) м. д.; <sup>r</sup> 23.8 (Me) и 175.5 (CO) м. д.; <sup>r</sup> 23.7 (Me) и 175.5 (CO) м. д. Сигналы *O*-ацетильной группы в ОПС из *S. dysenteriae* типа 5 находятся при 21.7 (Me) и 174.4 (CO) м. д.

идентифицированы производные 2,3,4-три-*O*-метилфукосы (из терминального остатка Fuc), 2-дезокси-4,6-ди-*O*-метил- и 2-дезокси-3,6-ди-*O*-метил-2-(*N*-метил)ацетидамоглоукозы (из 3-замещенного и 4-замещенного остатков GlcNAc соответственно). Полное строение олигосахаридов было установлено на основании отнесения всех сигналов в его спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (табл. 1 и 2):



где EryA обозначает остаток эритроновой кислоты, образовавшийся из остатка GlcA. Структура этого олигосахаридов согласуется со строением ПС; в частности, она подтверждает, что остаток GlcNAc<sup>I</sup> замещен остатком GlcNAc<sup>II</sup> в положении 4, а не 3, как предполагалось ранее [5].

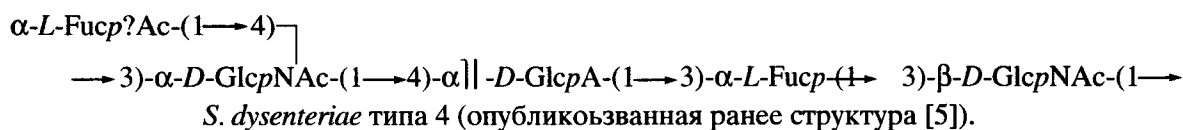
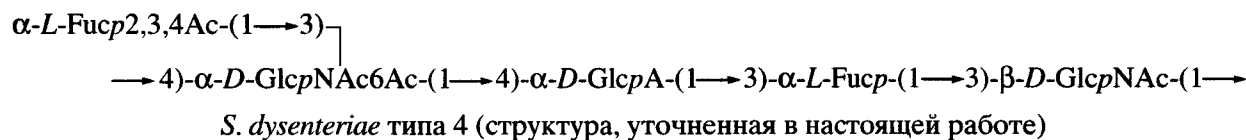
Положение *O*-ацетильных групп было установлено сравнением  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-спектров ДПС и ОПС, которое выявило смещение в слабое

поле, вследствие дезэкранирующего эффекта *O*-ацетилирования, ~50% корреляционных пиков H6a,6b/C6 GlcNAc<sup>I</sup> от 3.72, 3.83/60.8 к 4.12, 4.48/63.7 м.д. и ~15% каждого из корреляционных пиков H2/C2, H3/C3 и H4/C4 Fuc<sup>I</sup> от 3.68/69.2, 3.95/70.7 и 3.79/73.3 м.д. к 4.87/72.5, 5.03/75.2 и 5.19/76.1 м.д. соответственно. Эти данные указывали на нестехиометрическое *O*-ацетилирование остатка GlcNAc<sup>I</sup> в положении 6 и остатка Fuc<sup>I</sup> в положения 2, 3 и 4. Последнее свидетельствует о случайном характере *O*-ацетилирования бокового остатка Fuc<sup>I</sup>, как, например, это было описано для находящегося в боковой цепи остатка 6-дезокси-*L*-талозы в *O*-специфическом полисахариде *Aeromonas salmonicida* O : 34 [7].

Установленная таким образом уточненная структура ОПС *S. dysenteriae* типа 4 отличается от опубликованной структуры [5] аномальной конфигурацией остатка GlcNAc<sup>II</sup>. Сделанная ранее ошибка объясняется ненадежностью применявшегося в 1970-х годах химического метода определения конфигураций гликозидных связей (окисления хромо-

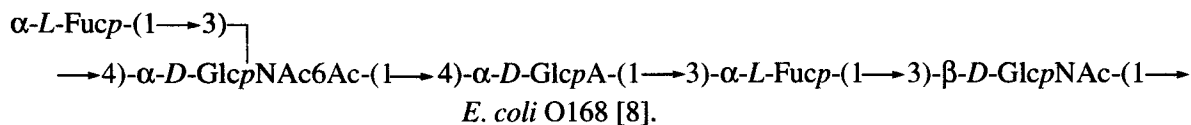
вым ангидридом) при отсутствии развитого ЯМР-спектроскопического анализа. Кроме того, исправления коснулись места присоединения боковой цепи и соответственно положения замещения остатка GlcNAc<sup>I</sup> в основной цепи. И, наконец, обнаружено, что остаток фукозы в боковой цепи *O*-ацетилирован случайным образом и что кроме него *O*-ацети-

лированным является один из остатков GlcNAc в основной цепи. Такие детали картины *O*-ацетилирования также не могли быть выяснены в ходе первого исследования ОПС, проводившегося до введения в структурный анализ углеводов методов двумерной спектроскопии ЯМР.



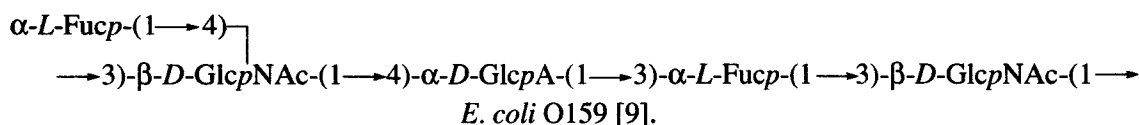
Отметим, что ОПС *E. coli* O168 имеет такое же строение углеводного скелета, что и уточненная структура ОПС *S. dysenteriae* типа 4, и отличается

только отсутствием *O*-ацетильных групп на остатке фукозы:



Кроме того, ОПС *S. dysenteriae* типа 4 и *E. coli* O168 сходны по структуре с ОПС *E. coli* O159,

имеющим следующее строение:



Описана серологическая взаимосвязь *S. dysenteriae* типа 4 и *E. coli* O159 [9]. В настоящее время нами исследуются генетические основы структурного родства *O*-антигенов *S. dysenteriae* типа 4, *E. coli* O168 и O159.

***S. dysenteriae* типа 5.** В тетрасахаридном повторяющемся звене ОПС *S. dysenteriae* типа 5 ранее были идентифицированы два остатка *D*-Man, по одному остатку *D*-GlcNAc и *L*-Rhap3Rlac (3-*O*-[(*R*)-1-карбоксийэтил]-*L*-рамноза, рамнолактоиловая кислота), а также *O*-ацетильная группа [10, 11]. <sup>13</sup>C-ЯМР-спектр ОПС (рис. 2а) отвечал регулярному полимеру и содержал сигнал при 21.7 м.д., что подтверждало наличие *O*-ацетильной группы в стехиометриче-

ском количестве. В <sup>13</sup>C-ЯМР-спектре ДПС (рис. 2б) присутствовали сигналы четырех аномерных атомов углерода при 98.0–102.1 м.д., трех OCH<sub>2</sub>-групп (C6 Man и GlcNAc) при 61.7–63.1 м.д., одного атома углерода, связанного с азотом (C2 GlcNAc), при 56.0 м.д., двух C-CH<sub>3</sub>-групп (C6 Rha и C3 lac) при 18.1 и 20.4 м.д., одной CO<sub>2</sub>H-группы (C1 lac) при 181.0 м.д., 16 атомов углерода моносахаридных пиранозных циклов и C2 lac в области 68.3–81.1 м.д., а также одной *N*-ацетильной группы (CH<sub>3</sub> при 23.7 м.д., CO при 175.5 м.д.). <sup>1</sup>H-ЯМР-спектр ДПС содержал сигналы четырех аномерных протонов в области 4.50–5.24 м.д., двух метильных групп (H6 Rha и H3 lac) при 1.29 и 1.45 м.д., остальных про-

тонов моносахаридов и H2 Iac в области 3.40–4.28 м.д., а также одной N-ацетильной группы при 2.00 м.д.

Сигналы в  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах ДПС (табл. 1 и 2) были отнесены с помощью двумерных экспериментов ЯМР. Спектр TOCSY содержал корреляционные пики аномерного протона со всеми протонами спиновой системы остатка GlcNAc и с протоном H2 остатков с манно-конфигурацией (Man<sup>I</sup>, Man<sup>II</sup> и Rha). Наблюдались также корреляции H2 с протонами H3–H5 обоих остатков Man и корреляции H6 с протонами H2–H5 остатка Rha. Идентификация спиновой системы Man<sup>I</sup> была завершена по корреляциям H5/H6b и H6b/H6a в спектре ROESY, а Man<sup>II</sup> – на основании корреляционного пика C6/H6a,6b в спектре HSQC.

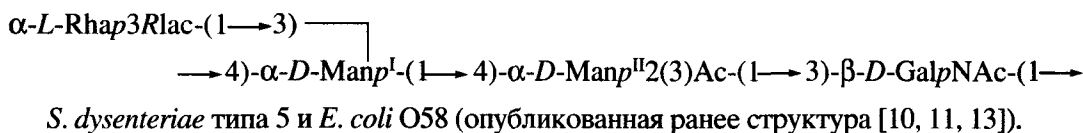
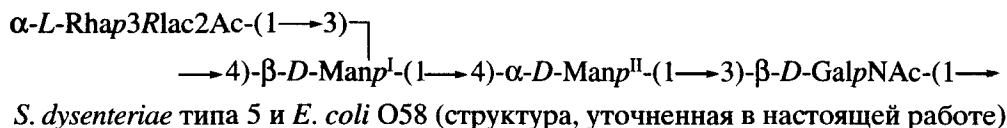
Смещение в слабое поле в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре ДПС сигналов C3 Rha, C3 и C4 Man<sup>I</sup>, C4 Man<sup>II</sup> и C3 GlcNAc к 80.6, 76.8, 71.5, 77.4 и 81.1 м.д. соответственно по сравнению с их положением в незамещенных моносахаридах [6] позволило определить положения замещения сахарных остатков. Последовательность моносахаридов в повторяющемся звене была установлена на основании следующих корреляций между аномерными и трансгликозидными протонами при связевых атомах углерода в спектре ROESY: H1 Rha/H3 Man<sup>I</sup>, H1 Man<sup>I</sup>/H4 Man<sup>II</sup>, H1 Man<sup>II</sup>/H3 GlcNAc и H1 GlcNAc/H4 Man<sup>I</sup> при 4.93/3.79, 4.68/3.89, 5.24/3.68 и 4.50/3.96 м.д. соответственно. Последовательность соединения моносахаридных остатков и локализация остатка молочной кислоты Iac при O3 остатка Rha подтверждена следующими корреляционными пиками, найденными в эксперименте HMBC: H1 Rha/C3 Man<sup>I</sup>, H1 Man<sup>I</sup>/C4 Man<sup>II</sup>, H1 Man<sup>II</sup>/C3 GlcNAc, H1 GlcNAc/C4 Man<sup>I</sup> и H2 Iac/C3 Rha при 4.93/76.8, 4.68/77.4, 5.24/81.1, 4.50/71.5 и 4.28/80.6 м.д. соответственно.

Эксперимент HMBC позволил определить также аномерную конфигурацию моносахаридных

остатков. Так,  $\alpha$ -конфигурация пиранозных остатков Rha и Man<sup>II</sup> была определена на основании интенсивных корреляционных пиков H1/C3,5, возникающих благодаря благоприятной для их проявления величине двугранных углов H1–C1–C2–C3 и H1–C1–O5–C5, близких к 180°. Для  $\beta$ -пираноз (Man<sup>I</sup> и GlcNAc) соответствующие углы близки к 45°, что исключает появление заметных констант  $^3J_{\text{H,C}}$ .  $\alpha$ -Конфигурация Rha и Man<sup>II</sup> была подтверждена положением сигналов C5 при 70.0 и 73.0 м.д., а  $\alpha$ -конфигурация GlcNAc и Man<sup>I</sup> – химическими сдвигами сигналов C5 при 77.4 и 77.2 м.д. соответственно (сравни с лит. данными [6]).

Сравнение  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-спектров ОПС и ДПС позволило установить положение O-ацетильной группы. Обнаруженное смещение в слабое поле корреляционного пика H2/C2 Rha от 4.12/69.1 м.д. в спектре ДПС к 5.35/70.7 м.д. в спектре ОПС, вызванное дезэкранирующим эффектом O-ацетильной группы, указывало на стехиометрическое O-ацетилирование остатка Rha в положение 2. Этот вывод подтверждался сильнополюсным сдвигом на –2.3 и –1.7 м.д. сигналов C1 и C3 Rha, характерным для  $\beta$ -эффектов 2-O-ацетилирования [12].

На основании этих данных уточнена структура ОПС *S. dysenteriae* типа 5, которая отличается от ранее опубликованной структуры [10, 11] аномерной конфигурацией остатка Man<sup>I</sup> и положением O-ацетильной группы. Причины ошибок, сделанных при первом исследовании ОПС типа 5 в 1970-х годах, те же, что и в случае ОПС типа 4 (см. предыдущую секцию). Согласно лит. данным [13], основанным на химическом исследовании, структуры ОПС *S. dysenteriae* типа 5 и *E. coli* O58 идентичны, что подтверждается также проведенным нами сравнением их спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР. В связи с этим структура ОПС *E. coli* O58 должна быть пересмотрена таким же образом, что и структура ОПС *S. dysenteriae* типа 5:



Данные о генетической основе родства O-антигенов *S. dysenteriae* типа 5 и *E. coli* O58 будут опубликованы позднее.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выращивание бактерий и выделение липополисахаридов.** Бактерии *S. dysenteriae* типов 4

(штамм G1021) и 5 (штамм G1213) получены из Института медицинских и ветеринарных наук (Аделаида, Австралия). Культуры бактерий выращивали до начала логарифмической фазы роста в ферментере “BIOSTAT C-10” (Германия) в условиях постоянной аэрации при 37°C и pH 7.0. Клетки промывали и высушивали как описано [14]. ЛПС выделяли водно-фенольной экстракцией клеток по методу

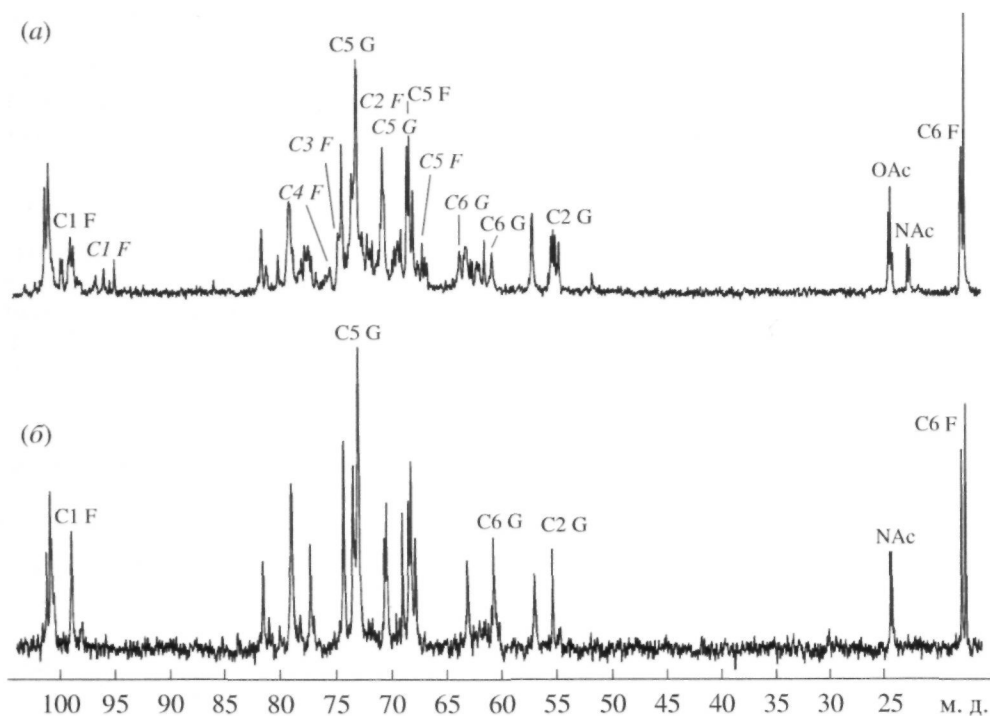


Рис. 1. Фрагменты спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР O-специфического полисахарида (а) и O-деацетилизованного полисахарида (б) из *S. dysenteriae* типа 4. Обозначения F и G относятся к остаткам Fuc<sup>I</sup> и GlcNAc<sup>I</sup>, F и G – к O-ацетилированным остаткам Fuc<sup>I</sup> и GlcNAc<sup>I</sup> соответственно.

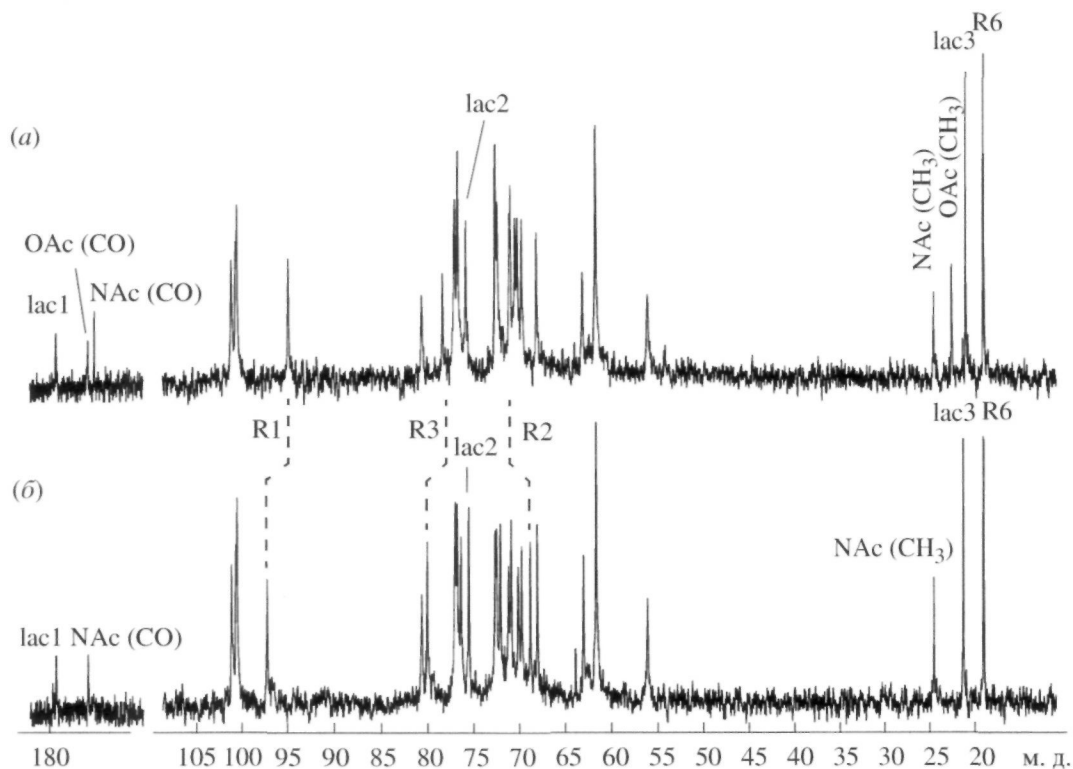


Рис. 2. Фрагменты спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР O-специфического полисахарида (а) и O-деацетилизованного полисахарида (б) из *S. dysenteriae* типа 5. Обозначения R и lac относятся к остаткам рамнозы и молочной кислоты соответственно.

Вестфалю [15], нуклеиновые кислоты и белки осаждали подкислением экстракта до pH 2 водной 50%-ной трихлоруксусной кислотой при охлаждении до 4°C и интенсивном перемешивании, осадок отделяли центрифугированием, супернатант диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали. Выход ЛПС составил 10 и 8% от веса сухих клеток соответственно.

**Деграцию липополисахаридов** из *S. dysenteriae* типов 4 (134 мг) и 5 (100 мг) проводили водной 2% АсОН при 100°C до образования осадка липида А (2 ч), который отделяли центрифугированием (13000 g, 20 мин). Супернатант фракционировали гельпроницающей хроматографией на колонке (56 × 2.6 см) с гелем Sephadex G-50 (S) (Amersham Biosciences, Швеция) в 0.05 М пиридиний-ацетатном буфере pH 4.5, контролируя элюцию с помощью дифференциального рефрактометра (Knauer, Германия). О-специфические полисахариды (ОПС) получены с выходом 18 и 26% от веса ЛПС соответственно.

**О-Дезацетилирование ОПС** из *S. dysenteriae* типа 4 (24 мг) и *S. dysenteriae* типа 5 (26 мг) проводили нагреванием раствора в водном 12.5% NH<sub>4</sub>ОН (37°C, 16 ч). Хроматографией на геле Sephadex G-50 (S), как описано выше, и последующей лиофилизацией получены О-дезацетилированные полисахариды (ДПС) (19 и 21 мг соответственно).

**Деграцию по Смиту ДПС** из *S. dysenteriae* типа 4 (18 мг) проводили окислением 0.1 М раствором NaO<sub>4</sub> (2 мл) в темноте (20°C, 72 ч) с последующим восстановлением избытком NaBH<sub>4</sub>, обессоливанием диализом против дистиллированной воды и гидролизом водной 2% АсОН (100°C, 2 ч). Олигосахаридную фракцию (6 мг) выделяли хроматографией на колонке (90 × 2.5 см) с гелем TSK HW-40 (S) в водной 1% АсОН, обрабатывали водным 12.5% NH<sub>4</sub>ОН (37°C, 16 ч) для разрушения лактона эритроновой кислоты, обессоливали на геле TSK HW-40 (S) и получили целевой олигосахарид (4 мг).

**Метилирование олигосахаридов** из *S. dysenteriae* типа 4 (1 мг) проводили обработкой CH<sub>3</sub>I в диметилсульфоксиде в присутствии метилсульфинилметанида натрия [16]. Частично метилированные ацетаты полиолов получали гидролизом метилированного полимера 2 М CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (120°C, 2 ч) с последующим восстановлением NaDH<sub>4</sub> и ацетилированием смесью пиридин-Ас<sub>2</sub>O (1 : 1, 100°C, 1 ч) и анализировали методом ГЖХ-МС на приборе HP 5989A (Hewlett-Packard, США), оснащенном колонкой HP-5ms (Hewlett-Packard) в градиенте температуры от 160 до 290°C (10°C/мин).

**Спектры ЯМР** снимали на спектрометре DRX-500 (Bruker, Германия) в растворе в 99.96% D<sub>2</sub>O при 30°C для *S. dysenteriae* типа 4 и 40°C для *S. dysenteriae* типа 5 (внутренний стандарт – ацетон, δ<sub>H</sub> 2.225 м.д., δ<sub>C</sub> 31.45 м.д.). Образцы предварительно лиофилизировали из D<sub>2</sub>O. Двумерные спектры снимали, используя стандартное математическое обеспечение

компании “Bruker”; для сбора и обработки данных использовали программу XWINNMR 2.6. Время смешивания в экспериментах TOCSY и ROESY составляло 100 и 200 мс соответственно. Эксперименты НМВС были оптимизированы для КССВ J<sub>HC</sub> 8 Гц.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа финансирована РФФИ (грант № 05-04-48992), Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ РФ (МК-157.2007.4), Фондом содействия отечественной науке (грант для Перепелова А.В.), Муниципальным фондом науки и технологии Тянь-дзиня (грант 05FZZDSH00800) и Государственным фондом естественных наук Китая (программы 30530010 и 20536040).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Perepelov A.V., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Liu B., Feng L., Wang L., Knirel Y.A.* // Russ. J. Bioorgan. Chemistry. 2008. V. 34. P. 110–117 (Перепелов А.В., Сенченкова С.Н., Шапков А.С., Лю Б., Фенг Л., Ванг Л., Книрель Ю.А. // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. С. 121–128).
2. *Jonsson K.H., Weintraub A., Widmalm G.* // Carbohydr. Res. 2006. V. 341. P. 2986–2989.
3. *Senchenkova S.N., Feng L., Yang J., Shashkov A.S., Cheng J., Liu D., Knirel Y.A., Reeves P., Jin Q., Ye Q., Wang L.* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 2551–2554.
4. *Duus J.O., Gotfredsen C.H., Bock K.* // Chem. Rev. 2000. V. 100. P. 4589–4614.
5. *Дмитриев Б.А., Львов В.Л., Кочетков Н.К., Гофман И.Л.* // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. С. 1226–1233.
6. *Jansson P.-E., Kenne L., Widmalm G.* // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. P. 169–191.
7. *Knirel Y.A., Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Merino S., Tomas J.M.* // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 1381–1386.
8. *Perepelov A.V., Liu B., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Feng L., Knirel Y.A., Wang L.* // Carbohydr. Res. 2007. In press.
9. *Linnerborg M., Weintraub A., Widmalm G.* // Eur. J. Biochem. 1999. V. 266. P. 246–251.
10. *Kochetkov N.K., Dmitriev B.A., Backinowsky L.V.* // Carbohydr. Res. 1976. V. 51. P. 229–237.
11. *Dmitriev B.A., Backinowsky L.V., Knirel Y.A., Kochetkov N.K., Hofman I.L.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 78. P. 381–387.
12. *Jansson P.-E., Kenne L., Schweda E.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1987. P. 377–383.
13. *Dmitriev B.A., Knirel Y.A., Kochetkov N.K., Jann B., Jann K.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 79. P. 111–115.
14. *Robbins P.W., Uchida T.* // Biochemistry. 1962. V. 1. P. 323–335.
15. *Westphal O., Jann K.* // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
16. *Conrad H.E.* // Methods Carbohydr. Chem. 1972. V. 6. P. 361–364.



