



УДК 577.114.5:579.841.11:543.422.23

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ. 42. СТРУКТУРЫ О-ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ ДВУХ ШТАММОВ *Shigella dysenteriae* ТИПА 8

© 2008 г. А. В. Перепелов^{*,#}, С. Н. Сенченкова^{*}, А. С. Шашков^{*}, Ю. А. Книрель^{*},
Б. Лю^{**,***}, Л. Фенг^{**,***}, Л. Ванг^{**,***}

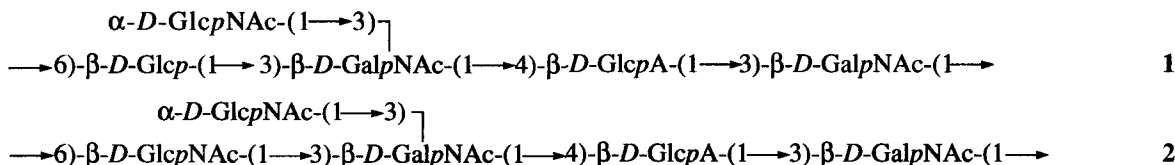
^{*}Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва,
Ленинский просп., 47, Российская Федерация;

^{**}Школа биологических наук и биотехнологии Нанкайского университета, Тянь-дзинь, КНР;

^{***}Лаборатория функциональной геномики микробов Нанкайского университета, Тянь-дзинь, КНР

Поступила в редакцию 26.09.2007 г. Принята к печати 15.10.2007 г.

Строение изученного ранее О-полисахарида (О-антигена) бактерии *Shigella dysenteriae* типа 8 (штамм 599) уточнено с использованием современных методов спектроскопии ЯМР (структура 1). Исправления коснулись положения остатка Glc (в основной, а не в боковой цепи), места его замещения и конфигурации гликозидной связи остатка GlcNAc. Обнаружено, что второй исследованный представитель *S. dysenteriae* типа 8 (штамм G1221) продуцирует другой структурный вариант О-полисахарида, содержащий остаток GlcNAc вместо остатка Glc в основной цепи (структура 2). Эти данные могут привести к разделению *S. dysenteriae* типа 8 на два подтипа.



Ключевые слова: *Shigella dysenteriae*, О-антиген; структура бактериального полисахарида; спектроскопия ЯМР.

ВВЕДЕНИЕ

Настоящей работой мы продолжаем публикацию результатов повторного исследования О-специфических полисахаридов (ОПС, О-антигенов) бактерий рода *Shigella* – возбудителей бактериальной дизентерии (шигеллеза). Данные о структуре ОПС служат молекулярной основой для внутривидовой классификации грамотрицательных микроорганизмов, необходимой для серодиагностики и эпидемиологического мониторинга. В сочетании с генетическими данными они позволяют выяснять пути биосинтеза О-антигенов и их диверсификации в ходе эволюции бактерий.

Ранее были уточнены структуры ОПС бактерий *S. dysenteriae* типов 3 [2, 3], 4 [1], 5 [1] и 9 [2], *S. boydii* типов 4 [2] и 6 [4]. В представленной статье приводятся данные о строении ОПС двух штаммов, относящихся к *S. dysenteriae* типа 8, которые продуцируют сходные по структуре, но не идентичные О-антигены. ОПС одного из штаммов исследовался ранее [5], и его структура уточнена в настоящей работе; ОПС другого штамма исследован впервые.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

***S. dysenteriae* типа 8 штамм 599.** В пентасахаридном повторяющемся звене ОПС из штамма 599 ранее идентифицировали два остатка *D*-GalNAc и по одному остатку *D*-Glc, *D*-GlcNAc и *D*-глюкуроновой кислоты (*D*-GlcA) [5]. В ¹³C-ЯМР-спектре ОПС (рисунок а) присутствовали сигналы пяти аномерных атомов углерода при 98.4–106.2 м.д., четырех НОСН₂-групп (С6 моносахаридов) при 61.3, 61.7, 62.5 и 70.2 м. д. (данные DEPT-эксперимента), трех атомов углерода, связанных с азотом (С2 аминсахаров) при 52.7–55.2 м. д., одной

Сообщение 41 см. [1].

Сокращения: ЛПС – липополисахарид; ОПС – О-специфический полисахарид; COSY – корреляционная спектроскопия; 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.
[#]Автор для связи (тел./факс: (495) 137-61-48; эл. почта: perepel@ioc.ac.ru).

CO₂H-группы (C6 GlcA) при 175.0 м. д., 17 атомов углерода моносахаридных циклов в области 69.1–81.0 м. д. и трех *N*-ацетильных групп (CH₃ при 23.7–24.0 м. д., CO при 175.8–176.5 м.д.). ¹H-ЯМР-спектр ОПС содержал сигналы пяти аномерных протонов в области 4.39–4.84 м. д., остальных протонов моносахаридов в области 3.08–4.28 м. д. и трех *N*-ацетильных групп при 2.01–2.07 м. д.

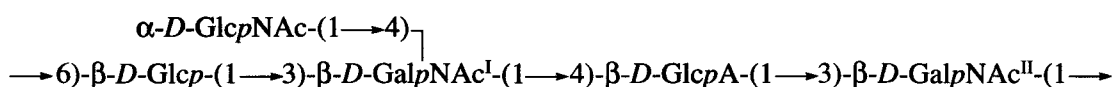
¹H- и ¹³C-ЯМР-спектры ОПС были полностью расшифрованы с помощью двумерной спектроскопии ЯМР (табл. 1 и 2), включая эксперименты ¹H,¹H-COSY, TOCSY, ROESY, ¹H,¹³C-HSQC и HMBC, по описанной методологии [6]. Спектр TOCSY содержал корреляционные пики аномерных протонов со всеми протонами спиновых систем моносахаридов с глюко-конфигурацией (Glc, GlcNAc и GlcA). Для остатков GalNAc (GalNAc^I и GalNAc^{II}) выявлены корреляции H1 с протонами H2–H4 в спектре COSY и корреляции H1 с протоном H5 в спектре ROESY. Сигналы C6 остатков GlcA, GalNAc^I и GalNAc^{II} идентифицированы на основании корреляций H5/C6 в спектре ¹H,¹³C-HMBC при 3.77/175.0, 3.73/61.7 и 3.67/62.5.

Величина константы спин-спинового взаимодействия $J_{1,2}$ 3 Гц показала, что остаток GlcNAc присоединен α -гликозидной связью, тогда как остальные остатки, характеризующиеся величинами $J_{1,2} \sim 8$ Гц, имеют β -конфигурацию. Отсутствие в ¹³C-ЯМР-спектре ОПС сигналов в области 82–88 м. д., харак-

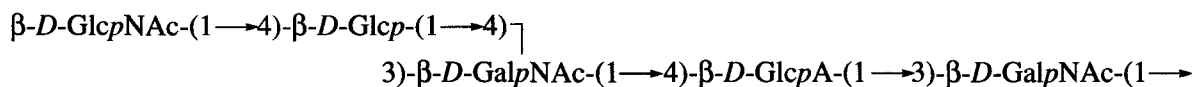
терных для фуранозидов, показало, что все моносахариды находятся в пиранозной форме. Смещение в слабое поле сигналов C3 и C4 GalNAc^I, C3 GalNAc^{II}, C4 GlcA и C6 Glc к 80.0, 75.0, 81.5, 81.4 и 70.2 м. д. соответственно по сравнению с их положением в незамещенных моносахаридах [7] позволило определить типы замещения моносахаридных остатков.

Последующий структурный анализ ОПС проводили с использованием спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (двумерный эксперимент ROESY). Он выявил следующие корреляции между трансгликозидными протонами в спектре ROESY: H1 GlcNAc/H4 GalNAc^I; H1 GalNAc^I/H4 GlcA; H1 GlcA/H3 GalNAc^{II}; H1 GalNAc^{II}/H6a,Hb Glc; H1 Glc/H3 GalNAc^I при 4.84/4.19; 4.54/3.77; 4.50/3.85; 4.54/3.79; 4.12 и 4.39/3.84 соответственно, которые подтвердили положение замещения моносахаридных остатков и определили их последовательность в повторяющемся звене. Дополнительно полученная информация была подтверждена в эксперименте HMBC по выявлению ¹H,¹³C-гетероядерных корреляций между связанными моносахаридными остатками (данные не приводятся).

Таким образом, в результате этого исследования уточнена структура ОПС из *S. dysenteriae* типа 8 штамма 599, отличающаяся от ранее опубликованной структуры [5] положением остатка Glc (в основной, а не в боковой цепи), местом его замещения и аномерной конфигурацией остатка GlcNAc:



S. dysenteriae типа 8 (структура штамма 599, уточненная в настоящей работе)

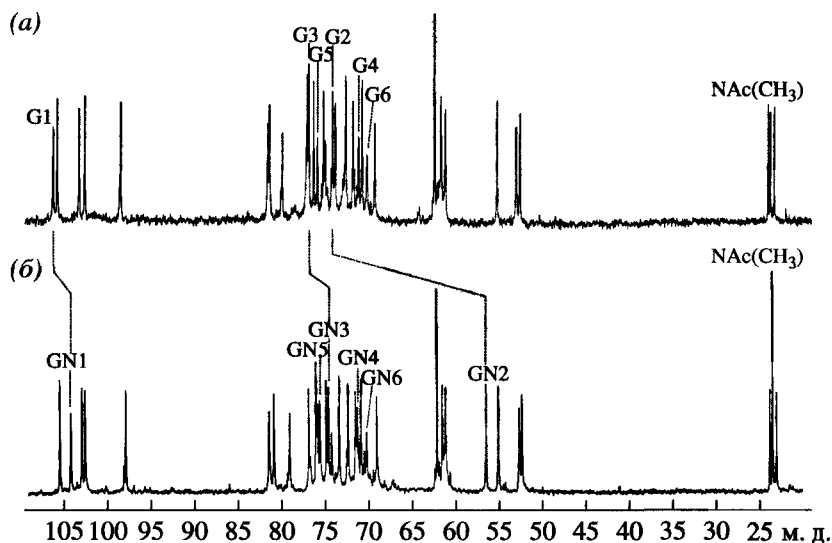


S. dysenteriae типа 8 (опубликованная ранее структура штамма 599 [5])

***S. dysenteriae* типа 8 штамм G1221.** В ¹³C-ЯМР-спектре ОПС ранее неизученного штамма G1221 (рисунок б) присутствовали сигналы пяти аномерных атомов углерода при 98.1–105.8 м.д., четырех NOCH₂-групп (C6 моносахаридов) при 61.4, 61.8, 62.4 и 70.5 м.д. (данные DEPT-эксперимента), четырех атомов углерода, связанных с азотом (C2 гексозаминов) при 52.6–56.8 м. д., одной CO₂H-группы (C6 гексуронової кислоты) при 173.8 м.д., 16 атомов углерода моносахаридных циклов в области 69.3–81.6 м.д. и четырех *N*-ацетильных групп (CH₃ при 23.3–24.0 м.д., CO при 175.8–176 м.д.). ¹H-ЯМР-спектр ОПС содержал сигналы пяти аномерных протонов в области 4.47–4.84 м. д., остальных протонов моносахаридов в области 3.38–4.20 м.д. и четырех *N*-ацетильных групп при 2.01–2.07 м.д. Таким образом, ОПС имеет пентасахаридное по-

вторяющееся звено, содержащее четыре *N*-ацетилгексозаминовых остатка и один остаток гексуронової кислоты.

Сигналы в ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектрах ОПС штамма G1221 были отнесены с помощью двумерных экспериментов ¹H,¹H-COSY, TOCSY и ¹H,¹³C-HSQC (табл. 1 и 2). В результате на основании КССВ вицинальных протонов моносахаридов было найдено, что остаток гексуронової кислоты имеет глюкоконфигурацию (GlcA), а из четырех остатков *N*-ацетилгексозаминов два имеют глюкоконфигурацию (GlcNAc^I и GlcNAc^{II}), а два другие – галактоконфигурацию (GalNAc^I и GalNAc^{II}). Следовательно, повторяющееся звено ОПС штамма G1221 отличается от повторяющегося звена ОПС штамма 599 только тем, что вместо остатка глюкозы оно содержит второй остаток GlcNAc. Величины КССВ $J_{1,2}$ 7–8 Гц

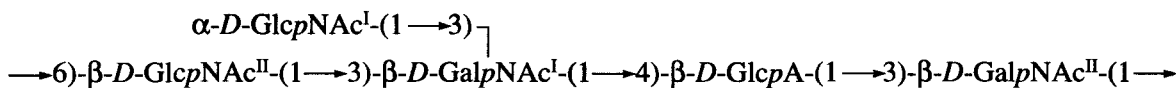


Фрагменты ^{13}C -ЯМР-спектров ОПС из *S. dysenteriae* типа 8 штаммов 599 (а) и G1221 (б). Обозначения G и GN относятся к остаткам Glc и GlcNAc^{II} соответственно.

указывали на β -конфигурацию всех гликозидных связей за исключением связи остатка GlcNAc^I, который характеризовался КССВ $J_{1,2} \sim 3$ Гц и следовательно имеет α -конфигурацию.

Дальнейший структурный анализ ОПС на основании данных двумерных экспериментов HMBC

и ROESY, проведенный как описано выше для штамма 599, выявил типы замещения моносахаридных остатков и их последовательность в повторяющемся звене. В результате установлена следующая структура ОПС штамма G1221:



S. dysenteriae типа 8 (штамм G1221)

Таблица 1. Данные спектров ^1H -ЯМР ОПС из двух штаммов *S. dysenteriae* типа 8 (химические сдвиги, м.д.)

Остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6а, H6б
Штамм 599 ^а						
$\alpha\text{-D-GlcpNAc}\text{-(1}\rightarrow$	4.84	3.88	3.87	3.59	4.28	3.81; 3.81
$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-(1}\rightarrow$	4.39	3.08	3.43	3.38	3.48	3.79; 4.12
$\rightarrow\text{3,4)-}\beta\text{-D-GalpNAc}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow$	4.54	4.09	3.84	4.19	3.73	3.66; 3.72
$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-(1}\rightarrow$	4.50	3.38	3.58	3.77	3.77	
$\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GalpNAc}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow$	4.54	4.02	3.85	4.09	3.67	3.74; 3.78
Штамм G1221 ^б						
$\alpha\text{-D-GlcpNAc}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow$	4.84	3.88	3.88	3.55	4.31	3.87; 3.94
$\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-GlcpNAc}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow$	4.47	3.54	3.53	3.39	3.51	3.83; 4.13
$\rightarrow\text{3,4)-}\beta\text{-D-GalpNAc}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow$	4.49	4.02	3.78	4.20	3.71	3.64; 3.73
$\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-(1}\rightarrow$	4.53	3.38	3.60	3.81	3.87	
$\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GalpNAc}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow$	4.57	4.01	3.88	4.08	3.68	3.76; 3.76

Сигналы *N*-ацетильных групп находятся при ^а2.01–2.07 м. д. и ^б1.94–2.09 м. д.

Таблица 2. Данные спектров ^{13}C -ЯМР ОПС из двух штаммов *S. dysenteriae* типа 8 (химические сдвиги, м. д.)

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Штамм 599^a						
α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	98.4	55.2	71.8	70.8	72.7	61.3
\rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	106.2	74.2	76.8	71.2	75.9	70.2
\rightarrow 3,4)- β -D-GalpNAc ^I -(1 \rightarrow	102.5	53.1	80.0	75.0	77.0	61.7
\rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	105.8	73.9	75.1	81.4	77.1	175.0
\rightarrow 3)- β -D-GalpNAc ^{II} -(1 \rightarrow	103.2	52.7	81.5	69.4	76.3	62.5
Штамм G1221^b						
α -D-GlcpNAc ^I -(1 \rightarrow	98.1	55.3	71.8	71.1	72.6	61.4
\rightarrow 6)- β -D-GlcpNAc ^{II} -(1 \rightarrow	104.5	56.8	74.8	71.6	75.9	70.5
\rightarrow 3,4)- β -D-GalpNAc ^I -(1 \rightarrow	102.8	52.9	79.3	74.5	77.1	61.8
\rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	105.8	73.6	75.1	81.1	76.1	173.8
\rightarrow 3)- β -D-GalpNAc ^{II} -(1 \rightarrow	103.2	52.6	81.6	69.3	76.3	62.4

Сигналы *N*-ацетильных групп находятся при $^{\text{a}}23.7\text{--}24.0$ (Me) и $175.8\text{--}176.5$ (CO) м. д.; $^{\text{b}}23.3\text{--}24.0$ (Me) и $175.8\text{--}176.0$ (CO) м. д.

Эта структура близка структуре ОПС штамма 599, и ее единственное отличие заключается в присутствии остатка GlcNAc, занимающего в штамме G1221 то же положение в основной цепи и присоединенного такой же связью, что и остаток глюкозы в ОПС штамма 599. Обнаруженное различие очевидно связано с заменой гена глюкозилтрансферазы в штамме 599 на ген GlcNAc-трансферазы в штамме G1221 в генном кластере биосинтеза O-антигена, в остальном сходного у обеих бактерий [8]. Не исключено, что изменения коснулись также генов процессинга O-антигена, кодирующих флиппазу и O-антиген-полимеразу для трансмембранного переноса и полимеризации олигосахаридного повторяющегося звена O-антигена, предварительно собранного на липидном носителе с помощью гликозилтрансфераз.

Таким образом, *S. dysenteriae* типа 8 объединяет штаммы с близкородственными, но различными по структуре O-антигенами, что достаточно широко распространено среди многих грамотрицательных бактерий, но не характерно для рода *Shigella*. Полученные данные, дополненные результатами серологического исследования O-антигенов этих двух штаммов, могут послужить основой для разделения *S. dysenteriae* типа 8 на два подтипа и тем самым создания первой комплексной серогруппы у этого вида бактерий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выращивание бактерий и выделение липополисахаридов. *S. dysenteriae* типа 8 штаммы 599 и G1221 получены из ГНИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (Москва, Россия) и Института медицинских и ветеринарных наук (Аделаида, Австралия)

(Institute of Medical and Veterinary Science, Adelaide, Australia (IMVS)) соответственно. Штамм 599 культивировали как описано ранее [5]. Штамм G1221 выращивали до начала логарифмической фазы роста в ферментере BIOSTAT C-10 (Германия) в условиях постоянной аэрации при 37°C и pH 7.0. ЛПС выделяли из сухих бактериальных клеток водно-фенольной экстракцией по методу Вестфалля [9] нуклеиновые кислоты и белки осаждали подкисленным экстрактом до pH 2 водной 50% $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$ при охлаждении до 4°C и интенсивном перемешивании, осадок отделяли центрифугированием и супернатант, содержащий ЛПС, диализовали и лиофилизовали. Выход ЛПС составил $\sim 10\%$.

Получение O-специфических полисахаридов. ОПС получали мягкой кислотной деградацией ЛПС из *S. dysenteriae* типа 8 штаммов 599 и G1221 (100 и 143 мг соответственно) действием водной 2% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (100°C) до образования осадка липида, 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 (Кнауер, Германия). ОПС получены с выходами 27 и 39% от веса ЛПС соответственно.

Спектры ЯМР снимали на спектрометре DRX-500 (Bruker, Германия) в растворе в 99.96% D_2O при 30°C (внутренний стандарт – ацетон, $\delta_{\text{H}} 2.225$ и $\delta_{\text{C}} 31.45$ м.д.). Образцы предварительно лиофилизовали из D_2O . Двумерные спектры снимали, используя стандартное математическое обеспечение компании “Bruker” (Германия); для сбора и обработки данных использовали программу XWINNMR 2.6. Время смешивания в эксперимен-

тах TOCSY и ROESY составляло 200 и 100 мс соответственно. Эксперименты НМВС были оптимизированы для КССВ J_{HC} 8 Гц.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа финансирована РФФИ (гранты № 05-04-48992 и 08-04-01205-а), 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., Knirel Y.A., Liu B., Feng L., Wang L.* // Russ. J. Bioorgan. Chemistry. 2008. V. 34. P. 460–467 (Перепелов А.В., Сенченкова С.Н., Шашков А.С., Книрель Ю.А.,

Лю Б., Фенг Л., Ванг Л. // Биоорган. химия. 2008. Т. 34. С. 513–521).

2. *Jonsson K.H., Weintraub A., Widmalm G.* // Carbohydr. Res. 2006. V. 341. P. 2986–2989.

3. *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., Шашков А.С., Лю Б., Фенг Л., Ванг Л., Книрель Ю.А. // Биоорган. химия. 2008. Т. 34. С. 121–128).

4. *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.

5. *Дмитриев Б.А., Львов В.Л., Рамос Е.Л., Кочетков Н.К., Гофман И.Л.* // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. С. 760–766.

6. *Duus J.O., Gotfredsen C.H., Bock K.* // Chem. Rev. 2000. V. 100. P. 4589–4614.

7. *Jansson P.-E., Kenne L., Widmalm G.* // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. P. 169–191.

8. *Liu B., Knirel Y.A., Feng L., Perepelov A.V., Senchenkova S.N., Wang Q., Reeves P.R., Wang L.* // FEMS Microbiol Rev. 2008. (в печати).

9. *Westphal O., Jann K.* // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.

Structures of O-Polysaccharides from Two *Shigella dysenteriae* Type 8 Strains

A. V. Perepelov^{a,#}, S. N. Senchenkova^a, A. S. Shashkov^a, Yu. A. Knirel^a, B. Lu^{b,c},
L. Feng^{b,c}, and L. Wang^{b,c}

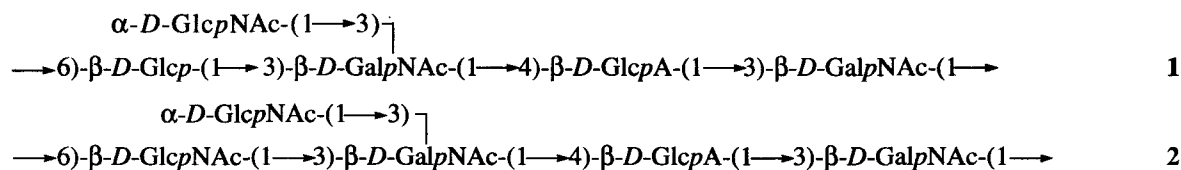
Phone/fax: +7 (495) 137-6148; e-mail: perepel@ioc.ac.ru

^a Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 119991 Russia

^b TEDA School of Biological Sciences and Biotechnology, Nankai University, 23 HongDa st., TEDA, Tianjin, 300457, China

^c Tianjin Key Laboratory for Microbial Functional Genomics, TEDA College, Nankai University, 23 HongDa st., TEDA, Tianjin, 300457, China

The structure of the O-polysaccharide (O-antigen) from *Shigella dysenteriae* type 8 bacteria (strain 599) was corrected using modern NMR techniques (structure 1). The revisions concerned the position of the Glc residue (in the main, but not the side, chain), the site of its substitution, and the configuration of the O-glycoside linkage of the GlcNAc residue. The *S. dysenteriae* type 8 bacterium (strain G1221), the second investigated representative, was found to produce another structural variant of the O-polysaccharide. It contains GlcNAc instead of the Glc residue in the main chain (structure 2). This data may lead to approval of division of *S. dysenteriae* type 8 into two subtypes:



Key words: NMR spectroscopy, O-antigen, *Shigella dysenteriae*, structure of the bacterial polysaccharide