



УДК 577.114.5:579.841.11:543.422.23

АНТИГЕННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ. 40*. УТОЧНЕННЫЕ СТРУКТУРЫ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Shigella dysenteriae* ТИПОВ 3, 9 И *Shigella boydii* ТИПА 4 ПО ДАННЫМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

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

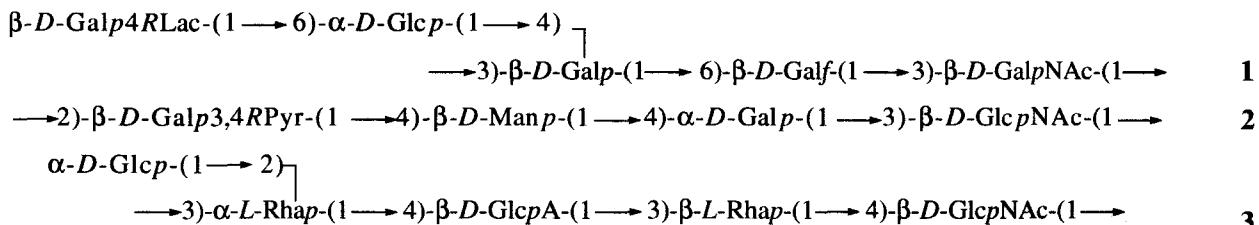
*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47;

**Школа биологических наук и биотехнологии Нанкайского университета, Тянь-цзинь, КНР;

***Лаборатория функциональной геномики микробов колледжа ТЕДА Нанкайского университета,
Тянь-цзинь, КНР

Поступила в редакцию 08.12.2006 г. Принята к печати 11.01.2007 г.

Строение изученных ранее О-специфических полисахаридов трех типовых штаммов бактерий рода *Shigella* уточнено с использованием современных методов спектроскопии ЯМР. Исправления коснулись конфигурации гликозидной связи (*S. dysenteriae* типа 3, структура 1), положения гликозилирования моносахаридного остатка и его ацетилирования пировиноградной кислотой (*S. dysenteriae* типа 9, структура 2) и места присоединения боковой моносахаридной цепи (*S. boydii* типа 4, структура 3).



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

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии *Shigella* являются распространенным патогеном человека, вызывающим целый спектр кишечных заболеваний от диареи до тяжелых форм дизентерии. В 1940-х годах штаммы *Shigella* были выделены в отдельный род, состоящий из четырех видов: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* и *S. sonnei*. В то же время близкое генетическое родство позволяет рассматривать бак-

терии *Shigella* (за исключением *S. boydii* типа 13) и *Escherichia coli* как один вид микроорганизмов. Три первых вида *Shigella* являются гетерогенными в отношении О-антителей и разделяются в соответствии с их иммуноспецифичностью на серологические типы. Такое антигенные разнообразие штаммов, возникшее в результате эволюции, способствует выживанию бактерий в различных экологических нишах. У шигелл, как и у других грамотрицательных бактерий, О-антителы представляют собой полисахаридные цепи (О-специфические полисахариды, ОПС) липополисахаридов (ЛПС) внешней мембраны клеточной оболочки. Они обычно построены из повторяющихся олигосахаридных звеньев, содержащих от двух до восьми моносахаридных остатков, и часто включают независимые компоненты, такие, как аминокислоты, ацетали пировиноградной кислоты, эфиры молочной кислоты, фосфатные и О-ацетильные группы.

* Сообщение 39 см. [1].

Сокращения: ЛПС – липополисахарид; ОПС – О-специфический полисахарид; COSY – корреляционная спектроскопия; НМВС – гетероядерная корреляция через несколько связей; HSQC – гетероядерная спектроскопия с одноквантовым переносом когеренции; Lac – остаток молочной кислоты, присоединенный простой эфирной связью; Руг – ацеталь пировиноградной кислоты; 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).

Таблица 1. Данные спектров ^1H -ЯМР полисахаридов из *S. dysenteriae* типов 3, 9 и *S. boydii* типа 4 (химические сдвиги, м.д.). NAc – *N*-ацетильная группа

Остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6a, H6b	NAc
ОПС <i>S. dysenteriae</i> типа 3							
$\beta\text{-}D\text{-Glc}p4RLac\text{-(1}\longrightarrow$	4.46	3.33	3.61	3.41	3.47	3.78, 3.96	
$\longrightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-Glc}p\text{-(1}\longrightarrow$	4.90	3.49	3.72	3.64	4.31	4.06, 4.32	
$\longrightarrow 3)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Gal}p\text{-(1}\longrightarrow$	4.48	3.65	3.82	4.22	3.76	3.81, 3.86	
$\longrightarrow 6)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Gal}f\text{-(1}\longrightarrow$	5.07	4.08	4.03	4.02	3.99	3.71, 4.06	
$\longrightarrow 3)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Gal}pNAc\text{-(1}\longrightarrow$	4.67	3.93	3.78	4.01	3.65	3.78, 3.85	2.02
<i>RLac</i>		4.47	1.42				
ЛПС NH_4OH из <i>S. dysenteriae</i> типа 9							
$\longrightarrow 2)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Gal}p^{I3,4R}\text{Pyr}\text{-(1}\longrightarrow$	4.56	3.74	4.26	4.14	4.01	3.80, 3.82	
$\longrightarrow 4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Man}p\text{-(1}\longrightarrow$	4.79	5.15	3.72	3.72	3.47	3.76, 4.01	
$\longrightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-Gal}p^{II}\text{-(1}\longrightarrow$	5.40	3.83	3.86	4.18	3.84	3.64, 3.79	
$\longrightarrow 3)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Glc}pNAc\text{-(1}\longrightarrow$	4.88	3.79	3.71	3.67	3.42	3.73, 3.85	2.04
<i>RPyg</i>			1.57				
ОПС AcOH из <i>S. dysenteriae</i> типа 9							
$\longrightarrow 2)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Gal}p^{I}\text{-(1}\longrightarrow$	4.46	3.70	3.70	3.84	3.70	3.77, 3.77	
$\longrightarrow 4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Man}p\text{-(1}\longrightarrow$	4.83	4.18	3.74	3.73	3.51	3.83, 4.15	
$\longrightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-}D\text{-Gal}p^{II}\text{-(1}\longrightarrow$	5.40	3.86	3.89	4.21	3.88	3.66, 3.82	
$\longrightarrow 3)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Glc}pNAc\text{-(1}\longrightarrow$	4.87	3.79	3.72	3.67	3.41	3.73, 3.90	2.06
ОПС <i>S. boydii</i> типа 4							
$\alpha\text{-}D\text{-Glc}p\text{-(1}\longrightarrow$	4.88	3.49	3.70	3.45	4.11	3.87, 3.87	
$\longrightarrow 2,3)\text{-}\alpha\text{-}L\text{-Rhap}^{I}\text{-(1}\longrightarrow$	4.82	4.12	3.86	3.53	4.01	1.24	
$\longrightarrow 4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Glc}pA\text{-(1}\longrightarrow$	4.69	3.42	3.59	3.67	3.90		
$\longrightarrow 3)\text{-}\beta\text{-}L\text{-Rhap}^{II}\text{-(1}\longrightarrow$	4.86	4.26	3.72	3.51	3.41	1.32	
$\longrightarrow 4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-Glc}pNAc\text{-(1}\longrightarrow$	4.68	3.64	3.66	3.58	3.46	3.81, 3.95	2.01

Данные о структуре ОПС способствуют уточнению классификационных схем бактерий на основе О-антител, необходимых для серодиагностики и эпидемиологического мониторинга. В сочетании с генетическими данными они позволяют выяснить пути биосинтеза О-антител и их диверсификации в ходе эволюции бактерий. К настоящему времени изучено строение О-антител большинства серотипов *Shigella*, однако ряд структур, установленных в 1970-х годах в основном химическими методами, нуждается в пересмотре. В настоящей работе приведены результаты повторного исследования О-антител трех штаммов *Shigella*, включая *S. dysenteriae* типов 3, 9 и *S. boydii* типа 4, с использованием современных методов спектроскопии ЯМР, которое привело к уточнению их структур.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ОПС получали мягкой кислотой деградацией ЛПС, выделенных водно-фенольной экстракцией

сухих бактериальных клеток, с последующей хроматографией на геле Sephadex G-50. Они были охарактеризованы данными спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР, которые полностью расшифровали с помощью двумерной спектроскопии 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 [2]. Последующий структурный анализ ОПС, включающий определение положений замещений моносахаридных остатков и их последовательности в повторяющемся звене, проводили с использованием спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (двумерный эксперимент ROESY).

***S. dysenteriae* типа 3.** Ранее была установлена структура пентасахаридного повторяющегося звена ОПС *S. dysenteriae* типа 3, содержащего два остатка *D*-галактозы и по одному остатку *D*-глюкозы, *N*-ацетил-*D*-галактозамина и простого эфира *D*-глюкозы с (*R*)-молочной кислотой (*RLac*) [3–6]. Спектр ^{13}C -ЯМР ОПС (рис. 1) содержал сигналы пяти аниомерных атомов углерода при 100.3–110.3 м.д.,

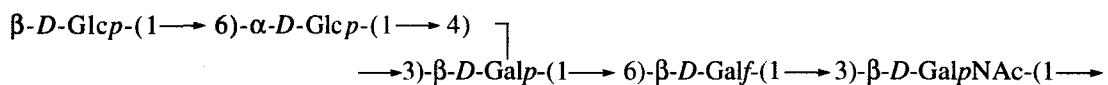
Таблица 2. Данные спектров ^{13}C -ЯМР полисахаридов из *S. dysenteriae* типов 3, 9 и *S. boydii* типа 4 (химические сдвиги, м.д.). NAc – *N*-ацетильная группа

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	NAc (CH ₃ , CO)
ОПС <i>S. dysenteriae</i> типа 3							
β-D-Glcp4RLac-(1→	103.6	74.3	77.0	78.5	76.0	62.0	
→6)-α-D-Glcp-(1→	100.3	73.1	73.8	69.9	71.6	69.1	
→3)-β-D-Galp-(1→	104.6	72.0	81.8	76.6	76.4	61.0	
→6)-β-D-Galf-(1→	110.3	82.4	78.2	84.4	70.9	72.5	
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	104.6	52.5	79.4	69.1	76.0	62.4	23.5, 175.7
RLac	179.8	77.8	19.7				
ЛПС NH ₄ OH из <i>S. dysenteriae</i> типа 9							
→2)-β-D-Galp ^I 3,4RPyR-(1→	102.3	79.7	80.3	76.4	74.4	62.2	
→4)-β-D-Manp-(1→	102.3	71.4	73.0	78.9	76.3	61.9	
→4)-α-D-Galp ^{II} -(1→	100.7	69.1	70.7	77.6	71.7	61.5	
→3)-β-D-GlcpNAc-(1→	101.1	55.7	81.0	72.1	77.0	62.0	23.8, 175.9
RPyR	177.0	108.7	24.4				
ОПС AcOH из <i>S. dysenteriae</i> типа 9							
→2)-β-D-Galp ^I -(1→	103.1	78.8	75.1	70.3	76.7	62.4	
→4)-β-D-Manp-(1→	102.2	71.3	73.1	79.2	76.4	62.2	
→4)-α-D-Galp ^{II} -(1→	100.8	69.9	70.8	77.6	71.8	61.5	
→3)-β-D-GlcpNAc-(1→	102.5	56.1	81.3	72.2	76.9	62.2	23.9, 175.5
ОПС <i>S. boydii</i> типа 4							
α-D-Glcp-(1→	99.1	73.0	74.4	71.0	73.3	61.8	
→2,3)-α-L-Rhap ^I -(1→	99.7	77.7	79.7	73.3	71.2	17.8	
→4)-β-D-GlcpA-(1→	105.1	75.0	75.5	80.5	76.2	175.1	
→3)-β-L-Rhap ^{II} -(1→	101.9	71.9	83.9	72.6	73.4	18.3	
→4)-β-D-GlcpNAc-(1→	104.6	57.5	75.3	79.0	75.9	62.6	23.8, 176.0

пяти HOCH_2 -групп (C6 моносахаридов) при 61.0, 62.0, 62.4, 69.1 и 72.5 м.д. (данные теста на присоединенные протоны), одного атома углерода, связанного с азотом (C2 остатка GalNAc), при 52.5 м.д., одной CH_3 -группы (C3 Lac) при 19.7 м.д., одной CO_2H -группы (C1 Lac) при 179.8 м.д., 20 атомов углерода пиранозных циклов сахаров и C2 Lac в области 69.1–84.4 м.д., а также одной *N*-ацетильной группы (CH_3 при 23.5 м.д., CO при 175.7 м.д.). Присутствие в спектре сигналов при 84.4 и 110.3 м.д., характерных для C4 и C1 фуранозидов, соответственно, показало, что один из моносахаридных остатков находится в фуранозной форме. В спектре ^1H -ЯМР ОПС присутствовали сигналы пяти

аномерных протонов в области 4.46–5.07 м.д., остальных протонов моносахаридов в области 3.33–4.32 м.д., H₂ Lac при 4.47 м.д., CH₃-группы (H₃ Lac) при 1.42 м.д. и N-ацетильной группы при 2.02 м.д.

В результате полного отнесения спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР (табл. 1 и 2) и анализа связей и последовательности моносахаридов с помощью эксперимента ROESY было найдено, что ОПС *S. dysenteriae* типа 3 имеет такую же углеводную основу, что и изученный ранее ОПС *E. coli* O164, для которого установлена следующая структура [7]:



E. coli O164 [7]

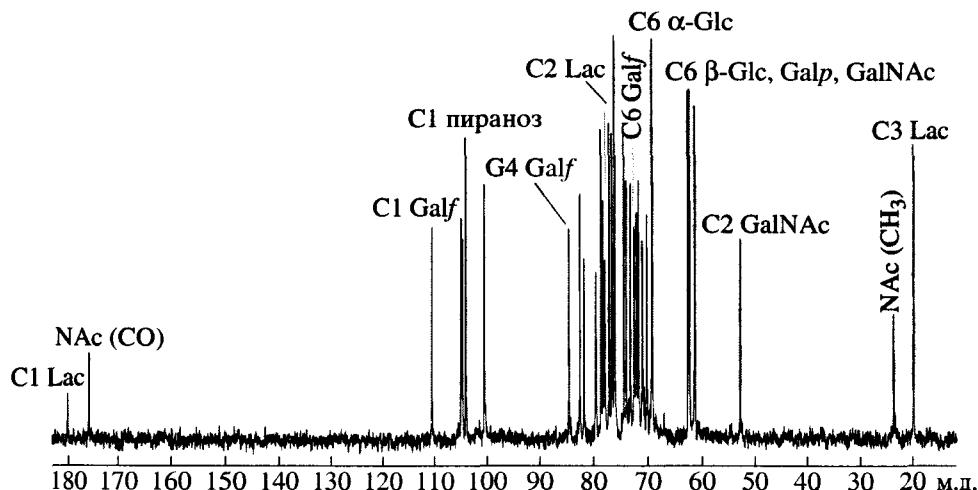
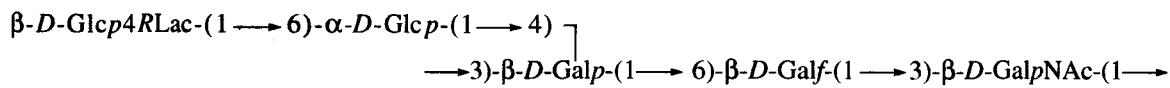


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР ОПС *S. dysenteriae* типа 3.

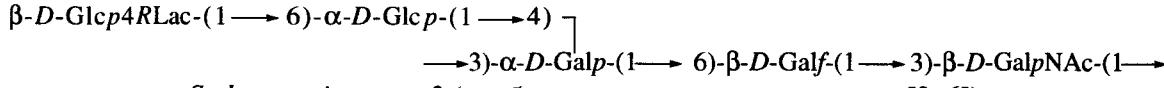
Единственным отличием ОПС *S. dysenteriae* типа 3 является наличие остатка молочной кислоты (Lac). Его положение при O4 терминального остатка глюкозы подтверждалось смещением в спектре ^{13}C -ЯМР в слабое поле в результате алкилирования сигнала C4 этого моносахарида от 70.6 м.д. в ОПС *E. coli* O164 к 78.5 м.д. в ОПС *S. dysenteriae* типа 3, а также присутствием корреляционного пика между сигналами H3 молочной кислоты и H4 β -Glc в спектре ROESY. Соответствующий простой эфир моносахарида, 4-O-[(*R*)-1-карбоксиэтил]-*D*-глюкоза (глюколактиловая

кислота, *D*-GlcRLac) был ранее выделен нами в индивидуальном виде из ОПС *S. dysenteriae* типа 3 сольволизом трифторметансульфониловой кислотой и охарактеризован данными спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР при изучении ОПС *S. boydii* типа 17, также содержащего *D*-GlcRLac [8].

Таким образом, в настоящей работе установлена структура ОПС *S. dysenteriae* типа 3, которая отличается от ранее установленной структуры [3–6] конфигурацией гликозидной связи остатка галактопиранозы:



S. dysenteriae типа 3 (структурная уточненная в настоящей работе)



S. dysenteriae типа 3 (опубликованная ранее структура [3–6])

Таким же образом должна быть уточнена структура ОПС *E. coli* O124, которая, как было показано ранее [9], идентична структуре ОПС *S. dysenteriae* типа 3. Когда эта часть работы была закончена, появилось независимое сообщение [10] об аналогичном пересмотре структур ОПС этих двух бактерий.

S. dysenteriae типа 9. Согласно опубликованным данным [11], ОПС *S. dysenteriae* типа 9 имеет тетрасахаридное повторяющееся звено, содержащее по одному остатку *D*-маннозы и *N*-ацетил-*D*-глюказамина и два остатка *D*-галактозы, один из которых несет ацеталь пишевиноградной кислоты (Руг), а другой *O*-ацетилирован в положение 2. Спектр ^{13}C -ЯМР этого ОПС содержал две серии

сигналов с различной интенсивностью, что было вызвано частичным удалением кислотолабильной ацетальной группы при мягкой кислотной деградации ЛПС (остаточный сигнал C3 Руг присутствовал в спектре при 24.4 м.д.). При этом сигнала *O*-ацетильной группы в характерной для него области спектра (20–21 м.д.) обнаружено не было, вероятно из-за низкого содержания этих групп.

В связи с нерегулярностью полисахарида, полученного мягким кислотным гидролизом, деградацию ЛПС провели другим способом – обработкой гидроксидом аммония, не затрагивающей ацетальную группу. В результате образовался *O*-дезацилированный ЛПС ($\text{LPS}_{\text{NH}_4\text{OH}}$). Спектр

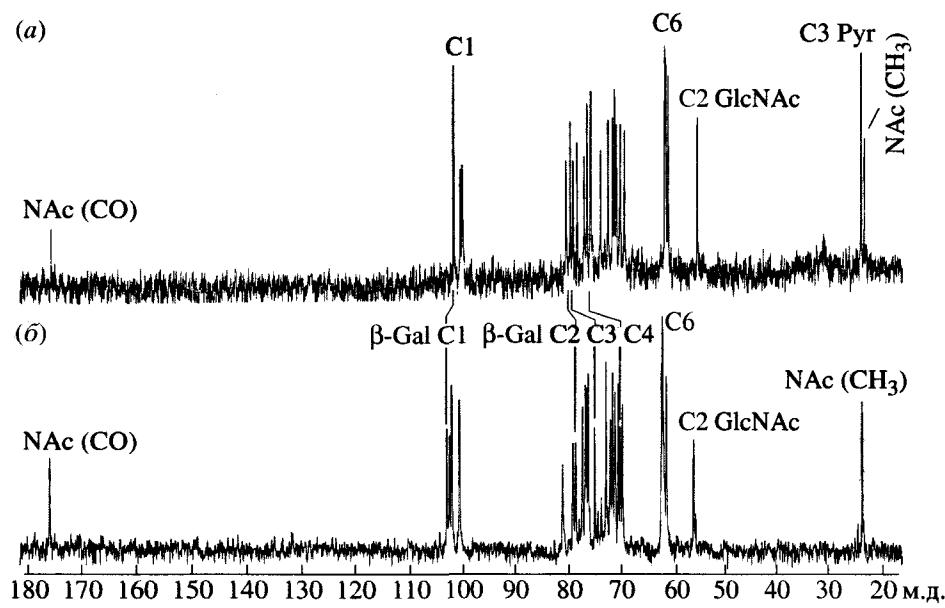


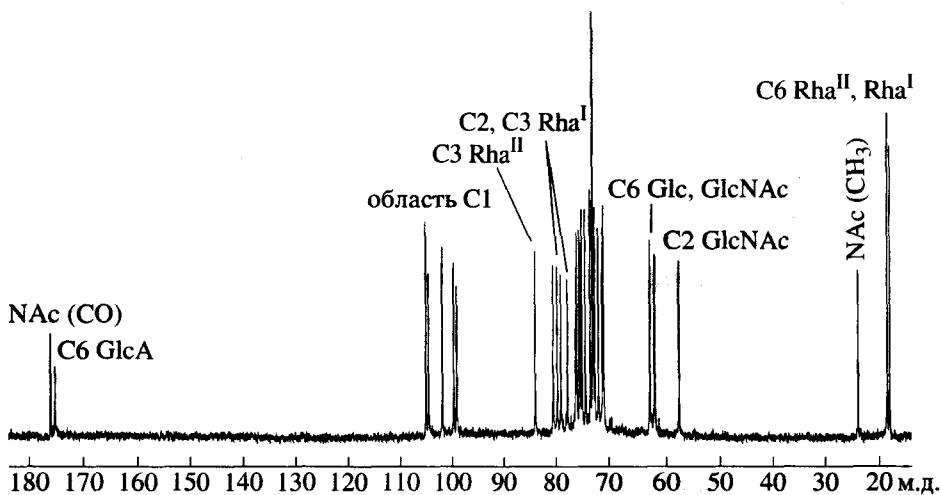
Рис. 2. Спектры ^{13}C -ЯМР ЛПС $_{\text{NH}_4\text{OH}}$ (а) и ОПС $_{\text{AcOH}}$ (б) из *S. dysenteriae* типа 9.

^{13}C -ЯМР ЛПС $_{\text{NH}_4\text{OH}}$ (рис. 2а) содержал сигналы четырех аномерных атомов углерода при 100.7–102.3 м.д., четырех НОСН₂-групп (С6 моносахаридов) при 61.5–62.2 м.д., одного атома углерода, связанного с азотом (С2 остатка GlcNAc), при 55.7 м.д., 15 атомов углерода пиранозных циклов сахаров при 69.1–81.0 м.д., ацетала Рур [CH₃-группы (С3) при 24.4 м.д., С2 при 108.7 м.д., CO₂H-группы (С1) при 177.0 м.д.] и N-ацетильной группы (CH₃) при 23.8 м.д., CO при 175.9 м.д.). Отсутствие в спектре сигналов в области 84–88 м.д., характерных для фуранозидов, показало, что все моносахариды находятся в пиранозной форме. В спектре ^1H -ЯМР ЛПС $_{\text{NH}_4\text{OH}}$ присутствовали сигналы четырех аномерных протонов при 4.56–5.40 м.д., остальных протонов моносахаридов в области 3.42–4.26 м.д., CH₃-группы (С3 Рур) при 1.57 м.д. и N-ацетильной группы при 2.04 м.д.

Сигналы в спектрах ^1H - и ^{13}C -ЯМР ЛПС $_{\text{NH}_4\text{OH}}$ (табл. 1 и 2) отнесли следующим образом. Спектр TOCSY выявил корреляции аномерных протонов с протонами H2–H6 остатка GlcNAc и H2–H4 двух остатков Gal (Gal^I и Gal^{II}). Сигналы протонов H5 и H6a,6b остатка Gal^{II} найдены на основании корреляций H4/H5, H6a,6b в спектре ROESY и H5/H6a,6b в спектре COSY. Для остатка Gal^I эти же эксперименты выявили корреляции H1/H3, H5 (ROESY) и H5/H6a,6b (COSY). Сигналы остатка Man были отнесены по корреляциям H1/H2 и H5/H6a,6b (COSY), H2/H3, H4 (TOCSY) и H1/H3, H5 (ROESY). Спектр ^{13}C -ЯМР расшифровали с помощью экспериментов ^1H , ^{13}C -HSQC и HMBC.

Полученная из ^1H -ЯМР-спектра величина константы спин-спинового взаимодействия $J_{1,2} \sim 3$ Гц показала, что остаток Gal^{II} присоединен α -гликозидной связью, тогда как остатки Gal^I и GlcNAc, характеризующиеся величиной $J_{1,2} \sim 8$ Гц, имеют β -конфигурацию. β -Конфигурация остатка Man следовала из положения сигналов H5 при 3.47 м.д. и C5 при 76.3 м.д. (ср. с опубликованными данными для α - и β -маннопиранозы [12]). Сигналы C1 и C2 остатка Рур нашли с помощью эксперимента HMBC, который выявил их корреляции с сигналом протона H3 Рур при 177.0/1.57 и 108.7/1.57 м.д. соответственно. Значительное смещение в слабое поле сигналов C2 Gal^I, C3 GlcNAc, C4 Man и C4 Gal^{II} к 79.7, 81.0, 78.9 и 77.6 м.д. соответственно по сравнению с их положением в спектрах соответствующих незамещенных моносахаридов [12] позволило установить позиции замещения этих моносахаридных остатков.

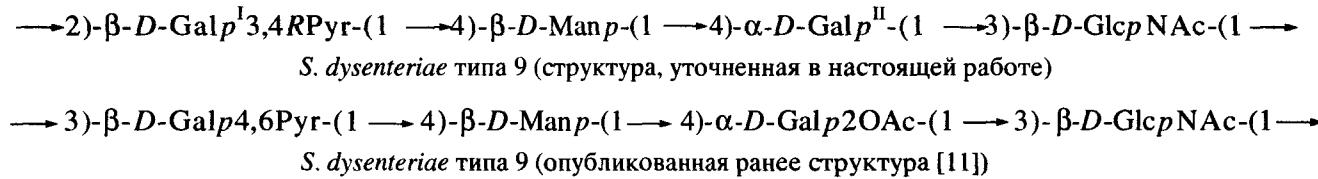
Спектр ROESY выявил следующие корреляции между трансгликозидными протонами соседних моносахаридных остатков: GlcNAc H1, Gal^I H2; Gal^I H1, Man H4; Man H1, Gal^{II} H4 и Gal^{II} H1, GlcNAc H3 при 4.88/3.74; 4.56/3.72; 4.79/4.18 и 5.40/3.71 м.д. соответственно. Эти корреляции подтвердили типы замещения моносахаридных остатков и выявили их последовательность в повторяющемся звене. Спектр ROESY показал также корреляции протона H3 Рур с протонами H3 и H4 Gal^I и, таким образом, подтвердил, что пироноградная кислота присоединяется к этому моносахаридному остатку в положения 3 и 4. Химические сдвиги сигналов ^{13}C -ЯМР остатка Рур свидетельствовали о (*R*)-конфигурации ацетала [13–15].

Рис. 3. Спектр ^{13}C -ЯМР ОПС *S. boydii* типа 4.

Для подтверждения структуры ОПС *S. dysenteriae* типа 9 обработали уксусной кислотой в течение 15 ч, что привело к полному удалению ацетильной группы (рис. 2б). Полученный дезацетилированный ОПС (ОПС_{AcOH}) исследовали с помощью тех же методов спектроскопии ЯМР, что и ЛПС_{NH₄OH}. Положение остатка Pyr подтверждалось смещением в сильное поле в результате дезацетилирования сигналов C3 и C4 Gal^I от 80.3 и

76.4 м.д. в спектре ЛПС_{NH₄OH} к 75.1 и 70.3 м.д. в спектре ОПС_{AcOH} (табл. 1 и 2).

Полученные данные показали, что ОПС *S. dysenteriae* типа 9 имеет приведенную ниже структуру, которая отличается от ранее опубликованной [11] отсутствием *O*-ацетильной группы, положением гликозилирования остатка Gal^I и местом присоединения к нему остатка пировиноградной кислоты:



Следует отметить, что расхождение, связанное с *O*-ацетилированием, скорее всего не вызвано ошибкой в ходе проводившегося ранее исследования структуры ОПС, а является результатом различий между исследованными штаммами *S. dysenteriae* типа 9 и/или условиями их культивирования, которые могут повлиять на такую постполимеризационную модификацию ОПС, как *O*-ацетилирование. Уточненная структура ОПС *S. dysenteriae* типа 9 идентична структуре капсулного полисахарида *E. coli* K47 [15], что дает еще один пример близкого родства между антигенными полисахаридами шигелл и эшерихий.

S. boydii типа 4. В пентасахаридном повторяющемся звене ОПС *S. boydii* типа 4 ранее идентифицировали по одному остатку D-Glc, D-GlcNAc и D-глюкуроновой кислоты (D-GlcA) и два остатка L-рамнозы [16]. В ^{13}C -ЯМР-спектре ОПС (рис. 3) присутствовали сигналы пяти аномерных атомов

углерода при 99.1–105.1 м.д., двух HOCH₂-групп (C6 Glc и GlcNAc) при 61.8 и 62.6 м.д., одного атома углерода, связанного с азотом (C2 GlcNAc), при 57.5 м.д., двух CH₃-групп (C6 остатков Rha) при 17.8 и 18.3 м.д., одной CO₂H-группы (C6 GlcA) при 175.1 м.д., 19 атомов углерода моносахаридных циклов в области 69.1–81.0 м.д. и *N*-ацетильной группы (CH₃ при 23.8 м.д., CO при 176.0 м.д.). Отсутствие в спектре сигналов в области 84–88 м.д., характерных для фуранозидов, показало, что все моносахариды находятся в пиранозной форме. ^1H -ЯМР-спектр ОПС содержал сигналы пяти аномерных протонов в области 4.69–4.88 м.д., двух CH₃-групп (H6 остатков Rha) при 1.24 и 1.32 м.д., остальных протонов моносахардов в области 3.41–4.26 м.д. и *N*-ацетильной группы при 2.01 м.д.

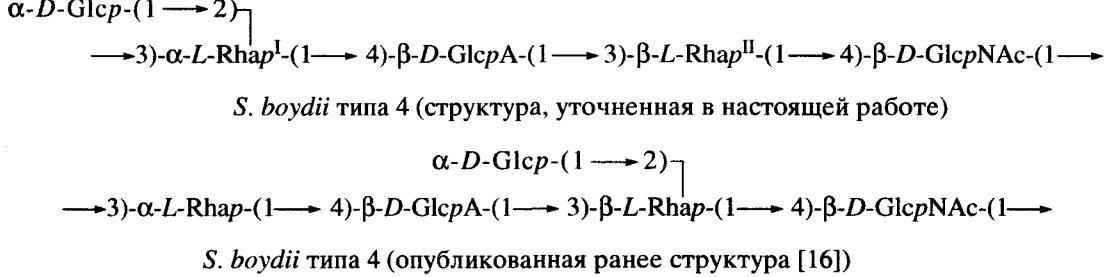
Сигналы ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров ОПС отнесли с помощью двумерных экспериментов $\text{H}, ^1\text{H}$

COSY, TOCSY, ROESY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC (табл. 1 и 2). Спектр TOCSY содержал корреляционные пики аномерных протонов со всеми протонами спиновых систем GlcNAc, Glc и GlcA. Для остатков Rha (Rha^I и Rha^{II}) выявлены корреляции H1 с H2 в спектре COSY и H6 с протонами H2–H5 в спектре TOCSY. Величина константы спин-спинового взаимодействия $J_{1,2}$ 3 Гц в протонном спектре показала, что остаток Glc присоединен α -гликозидной связью, тогда как остатки GlcNAc и GlcA, характеризующиеся величинами $J_{1,2}$ ~ 8 Гц, имеют β -конфигурацию. Положение сигналов C5 Rha^I при 71.2 м.д. и Rha^{II} при 73.4 м.д. свидетельствовало об α -конфигурации первого и β -конфигурации второго остатка (ср. с опубликованными данными для α - и β -рамнопиранозы [12]).

Смещение в слабое поле в ^{13}C -ЯМР-спектре ОПС сигналов C4 GlcA и GlcNAc, C3 Rha^{II} и C2 и

C3 Rha^I к 80.5, 79.0, 83.9, 77.7 и 79.7 м.д. соответственно по сравнению с их положением в спектре незамещенных моносахаридах [12] позволило определить типы замещения моносахаридных остатков. Последовательность моносахаридных остатков в повторяющемся звене установили на основании следующих корреляций между трансгликозидными протонами в спектре ROESY: Glc H1, Rha^I H2; Rha^I H1, GlcA H4; GlcA H1, Rha^{II} H3; Rha^{II} H1, GlcNAc H4 и GlcNAc H1, Rha^I H3 при 4.88/4.12; 4.82/3.67; 4.69/3.72; 4.86/3.58 и 4.68/3.86 соответственно.

На основании этих данных уточнена структура ОПС *S. boydii* типа 4, отличающаяся от ранее опубликованной структуры [16] местом присоединения бокового остатка Glc:



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выращивание бактерий и выделение липополисахаридов. Типовые штаммы *S. dysenteriae* типов 3 (G1281), 9 (G1274) и *S. boydii* типа 4 (G1296) 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 [17]. ЛПС *S. dysenteriae* типов 3, 9 и *S. boydii* типа 4 (800, 380 и 360 мг) получали водно-фенольной экстракцией клеток (4.5, 8.7 и 5.2 г соответственно) по методу Вестфала [18], нуклеиновые кислоты и белки осаждали подкислением экстракта до pH 2 водной 50% $\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}$ при охлаждении и интенсивном перемешивании, осадок отделяли центрифугированием, и супернатант, содержащий ЛПС, дialisовали и лиофилизовали.

Деградацию липополисахаридов *S. dysenteriae* типов 3, 9 и *S. boydii* типа 4 (170, 130 и 102 мг соответственно) проводили водной 2% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (100°C) до образования осадка липида A, который отделяли центрифугированием (13000g, 20 мин). Супернатант хроматографировали на геле Sephadex G-50 (Amersham Biosciences, Швеция) в 0.05 M

пиридиний-ацетатном буфере pH 4.5, контролируя элюцию с помощью дифференциального рефрактометра (Knauer, Германия). ОПС получены с выходами 30–36% от веса ЛПС.

Мягкую щелочную деградацию ЛПС *S. dysenteriae* типа 9 (80 мг) проводили нагреванием раствора в 12.5% NH_4OH (37°C, 16 ч), осадок отделяли центрифугированием (13000g, 20 мин), и супернатант хроматографировали на геле Sephadex G-50 как описано выше. ЛПС_{NH₄OH} получен с выходом 70%.

Для удаления остатка пировиноградной кислоты ОПС *S. dysenteriae* типа 9 (30 мг) обрабатывали водной 2% $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (100°C, 15 ч) и выделяли модифицированный полисахарид ОПС_{AcOH} хроматографией на геле TSK HW-40 (S) (Merck, Германия) в воде. Выход ОПС_{AcOH} составил 33%.

Спектры ЯМР снимали на спектрометре Bruker DRX-500 (Германия) в растворе в 99.96% D_2O при 30°C (внутренний стандарт – ацетон; δ_{H} 2.225 м.д., δ_{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

экспериментах TOCSY и ROESY составляло 200 и 300 мс соответственно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа финансирована РФФИ (грант № 05-04-48992), Советом по грантам при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ и молодых ученых РФ (МК-1597.2005.3), Фондом содействия отечественной науке (для Перепелова А.В.) и Государственным фондом естественных наук Китая (программы 30370339 и 30370023, основная программа 30530010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Парамонов Н.А., Шашков А.С., Книрель Ю.А., Солдаткина М.А., Захарова И.Я. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 984–993.
2. Duus J.O., Gotfredsen C.H., Bock K. // Chem. Rev. 2000. V. 100. P. 4589–4614.
3. Дмитриев Б.А., Львов В.Л., Гофман И.Л., Кочетков Н.К. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1977. № 10. С. 1613–1619.
4. Dmitriev B.A., Backinowsky L.V., Lvov V.L., Kochetkov N.K., Hofman I.L. // Eur. J. Biochem. 1975. V. 50. P. 539–547.
5. Dmitriev B.A., Knirel Y.A., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1975. V. 40. P. 365–372.
6. Dmitriev B.A., Lvov V.L., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1977. V. 56. P. 207–209.
7. Linnerborg M., Weintraub A., Widmalm G. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 266. P. 460–466.
8. Senchenkova S.N., Feng L., Wang Q., Perepelov A.V., Qin D., Shevelev S.D., Wang M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Wang L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 349. P. 289–295.
9. Dmitriev B.A., Lvov V.L., Kochetkov N.K., Jann B., Jann K. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 64. P. 491–498.
10. Jonsson K.H., Weintraub A., Widmalm G. // Carbohydr. Res. 2006. V. 341. P. 2986–2989.
11. Дмитриев Б.А., Книрель Ю.А., Виноградов Е.В., Кочетков Н.К., Гофман И.Л. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. С. 40–46.
12. Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75.
13. Garegg P.J., Jansson P.-E., Lindberg B., Lindh F., Lönnberg J., Kvärnström I., Nimmich W. // Carbohydr. Res. 1980. V. 78. P. 127–132.
14. Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Vinogradov E.V., Zatonsky G.V., Knirel Y.A., Literacka E., Kaca W. // Carbohydr. Res. 2000. V. 329. P. 453–457.
15. De Bruin A.H., Parolis H., Parolis L.A.S. // Carbohydr. Res. 1992. V. 233. P. 195–204.
16. Львов В.Л., Тохтамышева Н.В., Дмитриев Б.А., Кочетков Н.К., Гофман И.Л. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. С. 1842–1850.
17. Robbins P.W., Uchida T. // Biochemistry. 1962. V. 1. P. 323–335.
18. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.

Antigenic Polysaccharides of Bacteria: 40. The Structures of O-Specific Polysaccharides from *Shigella dysenteriae* Types 3 and 9 and *S. boydii* Type 4 Revised by NMR Spectroscopy

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

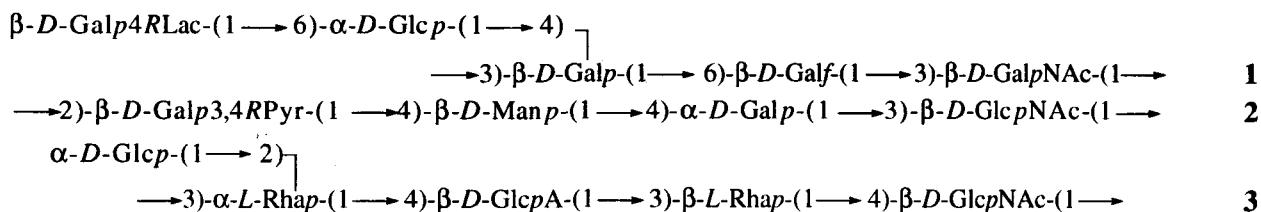
Phone/fax: +7 (495) 137-6148; e-mail: perepel@ioc.ac.ru

^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 Str., TEDA, Tyan-jin, 300457, China

^c Tyan-jin Key Laboratory for Microbial Functional Genomics, TEDA College, Nankai University, 23 HongDa street, TEDA, Tyan-jin, 300457, China

The reported structures of O-specific polysaccharides from three standard strains of *Shigella* bacteria were corrected by modern NMR techniques. The revisions concerned the configuration of the O-glycoside linkage (*S. dysenteriae* type 3, structure 1), the positions of monosaccharide residue glycosylation and acetylation by pyruvic acid (*S. dysenteriae* type 9, structure 2), and the attachment position of the side monosaccharide chain (*S. boydii* type 4, structure 3).



The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2008, vol. 34, no. 1; see also <http://www.maik.ru>

Key words: NMR spectroscopy, O-specific polysaccharide, *Shigella dysenteriae*, *S. boydii*, structure