



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\*

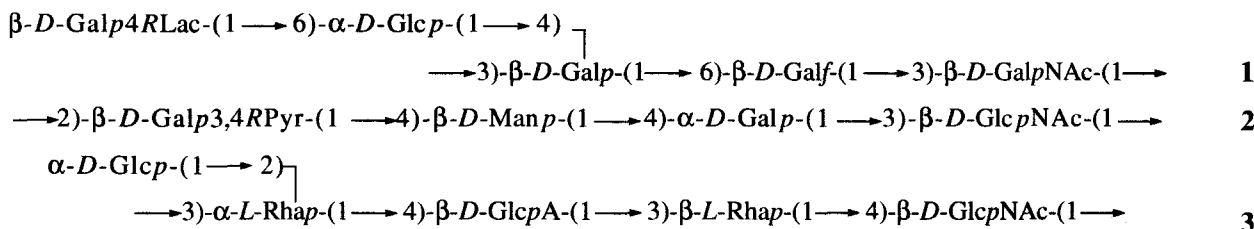
\*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47;

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

\*\*\*Лаборатория функциональной геномики микробов колледжа ТЕДА Нанкайского университета,  
Тянь-дзинь, 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 ацеталирования 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-антигенов и разделяются в соответствии с их иммуноспецифичностью на серологические типы. Такое антигенное разнообразие штаммов, возникшее в результате эволюции, способствует 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) внешней мембраны клеточной оболочки. Они обычно построены из повторяющихся олигосахаридных звеньев, содержащих от двух до восьми моносахаридных остатков, и часто включают неуглеводные 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; HMBC – гетероядерная корреляция через несколько связей; HSQC – гетероядерная спектроскопия с одноквантовым переносом когеренции; Лас – остаток молочной 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  $^1\text{H}$ -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
<b>ОПС <i>S. dysenteriae</i> типа 3</b>							
$\beta$ -D-Glcp4RLac-(1 $\rightarrow$	4.46	3.33	3.61	3.41	3.47	3.78, 3.96	
$\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$	4.90	3.49	3.72	3.64	4.31	4.06, 4.32	
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$	4.48	3.65	3.82	4.22	3.76	3.81, 3.86	
$\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galf-(1 $\rightarrow$	5.07	4.08	4.03	4.02	3.99	3.71, 4.06	
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$	4.67	3.93	3.78	4.01	3.65	3.78, 3.85	2.02
RLac		4.47	1.42				
<b>ЛПС<math>_{\text{NH}_4\text{OH}}</math> из <i>S. dysenteriae</i> типа 9</b>							
$\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Galp <sup>1</sup> 3,4RPyr-(1 $\rightarrow$	4.56	3.74	4.26	4.14	4.01	3.80, 3.82	
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$	4.79	5.15	3.72	3.72	3.47	3.76, 4.01	
$\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp <sup>II</sup> -(1 $\rightarrow$	5.40	3.83	3.86	4.18	3.84	3.64, 3.79	
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$	4.88	3.79	3.71	3.67	3.42	3.73, 3.85	2.04
RPyr			1.57				
<b>ОПС<math>_{\text{AcOH}}</math> из <i>S. dysenteriae</i> типа 9</b>							
$\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Galp <sup>I</sup> -(1 $\rightarrow$	4.46	3.70	3.70	3.84	3.70	3.77, 3.77	
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$	4.83	4.18	3.74	3.73	3.51	3.83, 4.15	
$\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp <sup>II</sup> -(1 $\rightarrow$	5.40	3.86	3.89	4.21	3.88	3.66, 3.82	
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$	4.87	3.79	3.72	3.67	3.41	3.73, 3.90	2.06
<b>ОПС <i>S. boydii</i> типа 4</b>							
$\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$	4.88	3.49	3.70	3.45	4.11	3.87, 3.87	
$\rightarrow$ 2,3)- $\alpha$ -L-Rhap <sup>I</sup> -(1 $\rightarrow$	4.82	4.12	3.86	3.53	4.01	1.24	
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$	4.69	3.42	3.59	3.67	3.90		
$\rightarrow$ 3)- $\beta$ -L-Rhap <sup>II</sup> -(1 $\rightarrow$	4.86	4.26	3.72	3.51	3.41	1.32	
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$	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-антигенов, 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 О-антигенов 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-антигенов 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  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ОПС (рис. 1) содержал сигналы пяти аномерных атомов углерода при 100.3–110.3 м.д.,

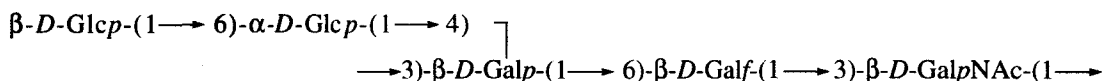
**Таблица 2.** Данные спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахаридов из *S. dysenteriae* типов 3, 9 и *S. boydii* типа 4 (химические сдвиги, м.д.). NAc – *N*-ацетильная группа

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

пяти НОСН<sub>2</sub>-групп (С6 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 (С2 остатка GalNAc), при 52.5 м.д., одной СН<sub>3</sub>-группы (С3 Lac) при 19.7 м.д., одной СО<sub>2</sub>Н-группы (С1 Lac) при 179.8 м.д., 20 атомов углерода пиранозных циклов сахаров и С2 Lac в области 69.1–84.4 м.д., а также одной *N*-ацетильной группы (СН<sub>3</sub> при 23.5 м.д., СО при 175.7 м.д.). Присутствие в спектре сигналов при 84.4 и 110.3 м.д., характерных для С4 и С1 фуранозидов, соответственно, показало, что один из моносахаридных остатков находится в фуранозной форме. В спектре  $^1\text{H}$ -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., Н2 Lac при 4.47 м.д., СН<sub>3</sub>-группы (Н3 Lac) при 1.42 м.д. и *N*-ацетильной группы при 2.02 м.д.

В результате полного отнесения спектров  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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]

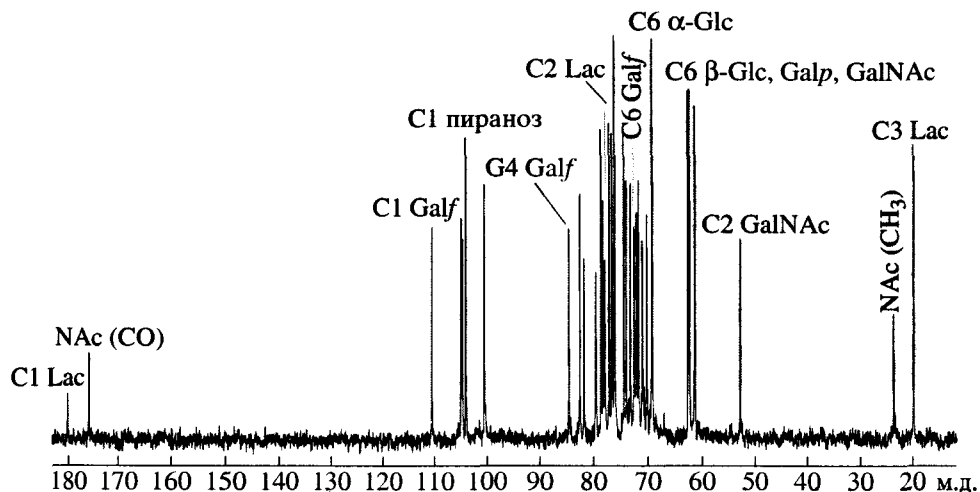
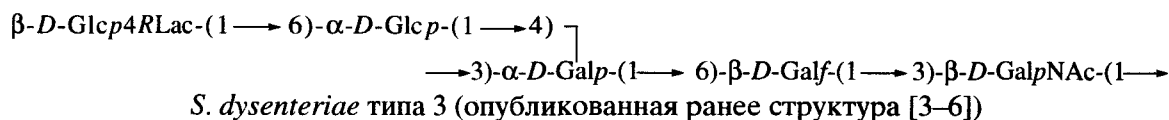
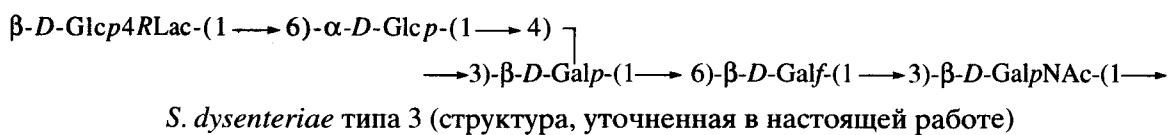


Рис. 1. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ОПС *S. dysenteriae* типа 3.

Единственным отличием ОПС *S. dysenteriae* типа 3 является наличие остатка молочной кислоты (Lac). Его положение при О4 терминального остатка глюкозы подтверждалось смещением в спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР в слабое поле в результате алкилирования сигнала С4 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 Н3 молочной кислоты и Н4  $\beta$ -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 трифторметансульфо кислотой и охарактеризован данными спектров  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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:



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*-глюкозамина и два остатка *D*-галактозы, один из которых несет ацеталь пировиноградной кислоты (Pur), а другой *O*-ацетилен в положение 2. Спектр  $^{13}\text{C}$ -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 С3 Pur 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*-деацелированный ЛПС (ЛПС<sub>NH<sub>4</sub>OH</sub>). Спектр

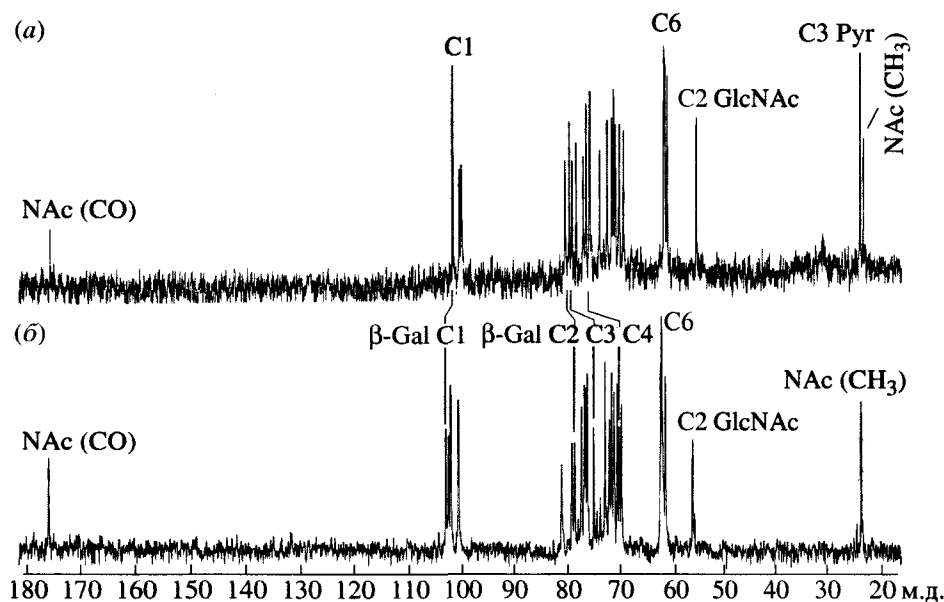


Рис. 2. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ЛПС $_{\text{NH}_4\text{OH}}$  (а) и ОПС $_{\text{AcOH}}$  (б) из *S. dysenteriae* типа 9.

$^{13}\text{C}$ -ЯМР ЛПС $_{\text{NH}_4\text{OH}}$  (рис. 2а) содержал сигналы четырех аномерных атомов углерода при 100.7–102.3 м.д., четырех HOCH $_2$ -групп (C6 моносахаридов) при 61.5–62.2 м.д., одного атома углерода, связанного с азотом (C2 остатка GlcNAc), при 55.7 м.д., 15 атомов углерода пиранозных циклов сахаров при 69.1–81.0 м.д., ацетала Pyru [CH $_3$ -группы (C3) при 24.4 м.д., C2 при 108.7 м.д., CO $_2$ H-группы (C1) при 177.0 м.д.] и *N*-ацетильной группы (CH $_3$  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  $^1\text{H}$ -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., CH $_3$ -группы (C3 Pyru) при 1.57 м.д. и *N*-ацетильной группы при 2.04 м.д.

Сигналы в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -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 $^{\text{I}}$  и Gal $^{\text{II}}$ ). Сигналы протонов H5 и H6a,6b остатка Gal $^{\text{II}}$  найдены на основании корреляций H4/H5, H6a,6b в спектре ROESY и H5/H6a,6b в спектре COSY. Для остатка Gal $^{\text{I}}$  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  $^{13}\text{C}$ -ЯМР расшифровали с помощью экспериментов  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC и HMBC.

Полученная из  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектра величина константы спин-спинового взаимодействия  $J_{1,2}$  3 Гц показала, что остаток Gal $^{\text{II}}$  присоединен  $\alpha$ -гликозидной связью, тогда как остатки Gal $^{\text{I}}$  и GlcNAc, характеризующиеся величиной  $J_{1,2} \sim 8$  Гц, имеют  $\beta$ -конфигурацию.  $\beta$ -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  $\alpha$ - и  $\beta$ -маннопиранозы [12]). Сигналы C1 и C2 остатка Pyru нашли с помощью эксперимента HMBC, который выявил их корреляции с сигналом протона H3 Pyru при 177.0/1.57 и 108.7/1.57 м.д. соответственно. Значительное смещение в слабое поле сигналов C2 Gal $^{\text{I}}$ , C3 GlcNAc, C4 Man и C4 Gal $^{\text{II}}$  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 $^{\text{I}}$  H2; Gal $^{\text{I}}$  H1, Man H4; Man H1, Gal $^{\text{II}}$  H4 и Gal $^{\text{II}}$  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 Pyru с протонами H3 и H4 Gal $^{\text{I}}$  и, таким образом, подтвердил, что пировиноградная кислота присоединяется к этому моносахаридному остатку в положения 3 и 4. Химические сдвиги сигналов  $^{13}\text{C}$ -ЯМР остатка Pyru свидетельствовали о (*R*)-конфигурации ацетала [13–15].

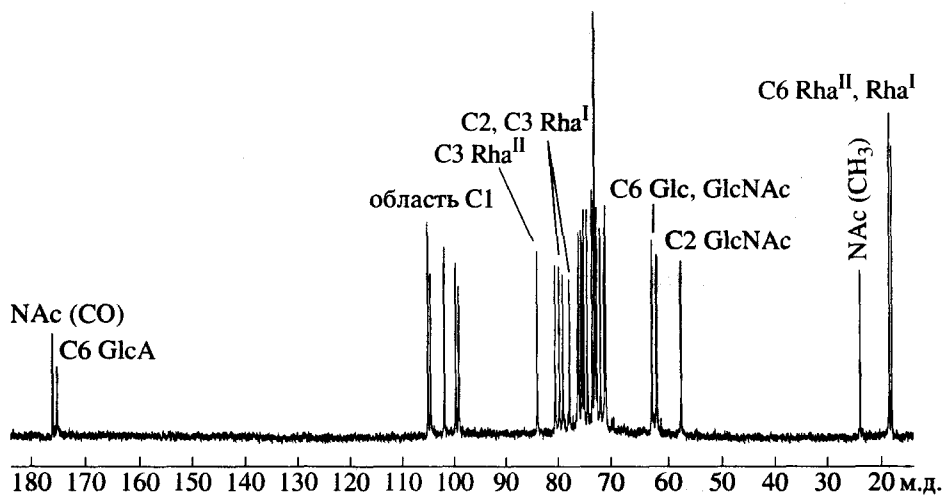
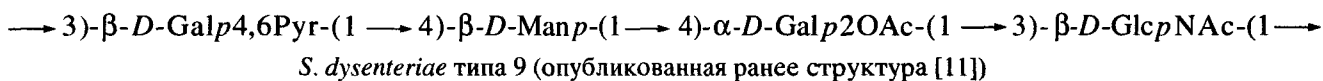
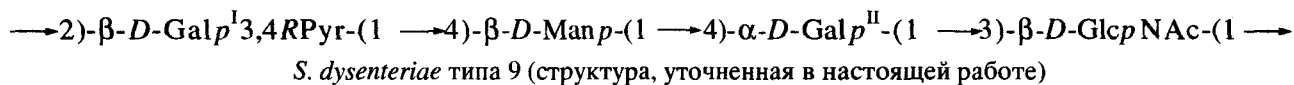


Рис. 3. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ОПС *S. boydii* типа 4.

Для подтверждения структуры ОПС *S. dysenteriae* типа 9 обработали уксусной кислотой в течение 15 ч, что привело к полному удалению ацетальной группы (рис. 2б). Полученный дезацетализованный ОПС (ОПС<sub>AcOH</sub>) исследовали с помощью тех же методов спектроскопии ЯМР, что и ЛПС<sub>NH<sub>4</sub>OH</sub>. Положение остатка R<sub>1</sub> подтверждалось смещением в сильное поле в результате дезацетализации сигналов C3 и C4 Gal<sup>I</sup> от 80.3 и

76.4 м.д. в спектре ЛПС<sub>NH<sub>4</sub>OH</sub> к 75.1 и 70.3 м.д. в спектре ОПС<sub>AcOH</sub> (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<sup>I</sup> 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 постполимеразационную модификацию ОПС, как *O*-ацетилирование. Уточненная структура ОПС *S. dysenteriae* типа 9 идентична структуре капсульного 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  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре ОПС (рис. 3) присутствовали сигналы пяти аномерных атомов

углерода при 99.1–105.1 м.д., двух HOCH<sub>2</sub>-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 CH<sub>3</sub>-групп (C6 остатков Rha) при 17.8 и 18.3 м.д., одной CO<sub>2</sub>H-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 (CH<sub>3</sub> 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.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектр ОПС содержал сигналы пяти аномерных протонов в области 4.69–4.88 м.д., двух CH<sub>3</sub>-групп (H6 остатков Rha) при 1.24 и 1.32 м.д., остальных протонов моносахаридов в области 3.41–4.26 м.д. и *N*-ацетильной группы при 2.01 м.д.

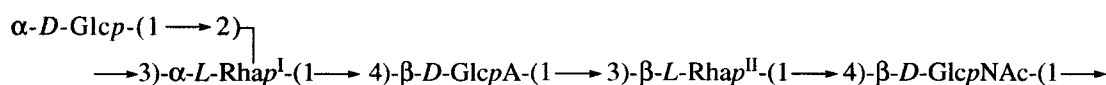
Сигналы  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров ОПС отнесли с помощью двумерных экспериментов H, $^1\text{H}$ -

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<sup>I</sup> и Rha<sup>II</sup>) 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  $\alpha$ -гликозидной связью, тогда как остатки GlcNAc и GlcA, характеризующиеся величинами  $J_{1,2} \sim 8$  Гц, имеют  $\beta$ -конфигурацию. Положение сигналов C5 Rha<sup>I</sup> при 71.2 м.д. и Rha<sup>II</sup> при 73.4 м.д. свидетельствовало об  $\alpha$ -конфигурации первого и  $\beta$ -конфигурации второго остатка (ср. с опубликованными данными для  $\alpha$ - и  $\beta$ -рамнопиранозы [12]).

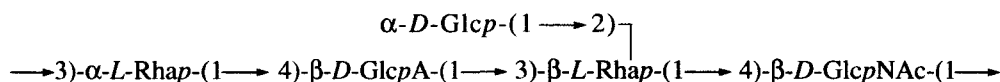
Смещение в слабое поле в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре ОПС сигналов C4 GlcA и GlcNAc, C3 Rha<sup>II</sup> и C2 и

C3 Rha<sup>I</sup> 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<sup>I</sup> H2; Rha<sup>I</sup> H1, GlcA H4; GlcA H1, Rha<sup>II</sup> H3; Rha<sup>II</sup> H1, GlcNAc H4 и GlcNAc H1, Rha<sup>I</sup> 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:



*S. boydii* типа 4 (структура, уточненная в настоящей работе)



*S. boydii* типа 4 (опубликованная ранее структура [16])

## 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 Вестфалы [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, диализовали и лиофилизировали.

**Деградиацию 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 А, который отделяли центрифугированием (13000g, 20 мин). Супернатант хроматографировали на геле Sephadex G-50 (Amersham Biosciences, Швеция) в 0.05 М

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

Мягкую щелочную деградиацию ЛПС *S. dysenteriae* типа 9 (80 мг) проводили нагреванием раствора в 12.5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  (37°C, 16 ч), осадок отделяли центрифугированием (13000g, 20 мин), и супернатант хроматографировали на геле Sephadex G-50 как описано выше. ЛПС<sub>NH<sub>4</sub>OH</sub> 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<sub>AcOH</sub> хроматографией на геле TSK HW-40 (S) (Merck, Германия) в воде. Выход ОПС<sub>AcOH</sub> составил 33%.

**Спектры ЯМР** снимали на спектрометре Bruker DRX-500 (Германия) в растворе в 99.96% D<sub>2</sub>O при 30°C (внутренний стандарт – ацетон;  $\delta_{\text{H}}$  2.225 м.д.,  $\delta_{\text{C}}$  31.45 м.д.). Образцы предварительно лиофилизировали из D<sub>2</sub>O. Двумерные спектры снимали, используя стандартное математическое обеспечение компании “Bruker” (Германия); для сбора и обработки данных использовали программу “XWINNMR 2.6”. Время смешивания в

