

УДК 577.124

ИЗМЕНЕНИЯ В ЭКСПРЕССИИ КОНЦЕВЫХ ОЛИГОСАХАРИДНЫХ ЗВЕНЬЕВ И ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ЦЕПИ ПОЛИ-*N*-АЦЕТИЛЛАКТОЗАМИНА В ЛИПОПОЛИСАХАРИДЕ *Helicobacter pylori* ПРИ КОЛОНИЗАЦИИ МАКАК-РЕЗУС*

© 2020 А.В. Перепелов**, С.Н. Сенченкова, Ю.А. Книрель

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: andreivperpelov@gmail.com

Поступила в редакцию 04.10.2019

После доработки 29.11.2019

Принята к публикации 30.11.2019

Helicobacter pylori является важным патогеном человека, вызывая гастриты, язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, а также может быть причиной рака желудка. *O*-полисахариды, входящие в состав липополисахаридов (ЛПС) *H. pylori*, построены из (β 1 \rightarrow 3)-поли-*N*-ацетиллактозамина (polyLacNAc), различным образом замещенного остатками α -L-фукозы. Во многих штаммах концевые звенья LacNAc являются моно- или ди-фукозилированными, таким образом представляя собой олигосахариды Льюис X (Le^x) и/или Льюис Y (Le^y). Ранее при исследовании на макаках-резус как модели инфекции, вызываемой *H. pylori* у человека, обнаружена адаптация бактерий к организму хозяина за счет экспрессии ими антигенов Льюис в ходе колонизации. В настоящей работе охарактеризованы ЛПС штаммов *H. pylori*, использовавшихся ранее, включая родительский штамм J166 и три дочерних штамма 98-149, 98-169 и 98-181, полученных от макак-резус после длительной колонизации. Анализы химическими методами и спектроскопией ЯМР показали, что родительский штамм продуцирует концевые олигосахаридные звенья Le^x, Le^y и Н типа 1. Дочерние штаммы оказались сходными с родительским по присутствию одинаковой олигосахаридной области (кора) ЛПС и фукозилированию внутренних звеньев LacNAc цепи polyLacNAc, но различались по строению концевых олигосахаридных звеньев. Le^x присутствовал в обезьяньих изолятах 98-149 и 98-169 из животного-хозяина с фенотипом Le^a, а Le^y был обнаружен в изоляте 98-181 из обезьяны с фенотипом Le^b. Так как Le^a и Le^b являются изомерами Le^x и Le^y соответственно, то такая корреляция подтверждает адаптацию экспрессии терминальных олигосахаридных звеньев в штаммах *H. pylori* к индивидуальным особенностям слизистой оболочки желудка организма-хозяина. Штамм 98-181 приобрел также способность к глюкозилированию цепи polyLacNAc. Отметим, что этот штамм отличался низким содержанием фукозы во внутренних звеньях LacNAc (внутренний Le^x) вследствие декорирования polyLacNAc остатками β -глюкопиранозы, что также могло играть роль в адаптации бактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Helicobacter pylori*, липополисахарид, *O*-полисахарид, поли(*N*-ацетиллактозамин), глюкозилирование, экспрессия антигенов Льюиса, бактериальная адаптация, макака-резус.

DOI: 10.31857/S0320972520020104

Бактерия *Helicobacter pylori* – важный патоген, вызывающий хронические гастриты у людей [1]. Инфекции, связанные с этой бактерией, имеют широкий спектр клинических проявлений [1, 2], включая развитие язвенных заболеваний и возрастание риска развития рака желудка. Как и другие грамотрицательные бактерии, *H. pylori* несет на внешней мембране липополисахарид (ЛПС), который является основной мишенью иммунной системы организма-хозяина. ЛПС обычно состоит из трех различных частей: липид А, олигосахарид кора и *O*-полисахарид (ОПС).

Структуры липида А [3] и олигосахариды кора [4] ЛПС *H. pylori* были ранее установлены. Низкая степень фосфорилирования и необычный

рид (ЛПС), который является основной мишенью иммунной системы организма-хозяина. ЛПС обычно состоит из трех различных частей: липид А, олигосахарид кора и *O*-полисахарид (ОПС).

Принятые сокращения: ГЖХ – газожидкостная хроматография; ЛПС – липополисахарид; ОПС – *O*-полисахарид; COSY – корреляционная спектроскопия; ESI MS – масс-спектрометрия с ионизацией в электрическом поле; DD-Нер, LD-Нер – D-глицеро-, L-глицеро-D-манно-гептоза; Kdo – 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновая кислота; LacNAc – *N*-ацетиллактозамин; Le^a, Le^b, Le^x, Le^y и Н-1 – Льюис а, Льюис b, Льюис X, Льюис Y и Н типа 1 соответственно; PEtn – 2-аминоэтил фосфат; polyLacNAc – (β 1 \rightarrow 3)-поли-*N*-ацетиллактозамин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ19-289, 30.12.2019.

** Адресат для корреспонденции.



Рис. 1. Структуры олигосахаридов типа 2 и типа 1. Звенья Льюис X, Льюис Y и Н типа 1 найдены в ЛПС исследованных штаммах *H. Pylori*

тип ацилирования в липиде А объясняют низкую эндотоксическую активность и слабый иммунологический ответ на ЛПС *H. pylori* [5]. В общем виде ОПС штаммов *H. pylori* построен из (β1→3)-поли-N-ацетиллактозамина (polyLacNAc), декорированного остатками α-L-фукозы или, в некоторых штаммах, дополнительно остатками глюкозы или галактозы [6–11]. Концевое звено ОПС *H. pylori* представляет собой моно- или дифукозилированный N-ацетиллактозамин (LacNAc), который, таким образом, подстраивается («мимикрирует») под антигены Льюис X (Le^x) и/или Льюис Y (Le^y) (рис. 1) [6–12]. В некоторых штаммах *H. pylori* были найдены Льюис a (Le^a), Льюис b (Le^b) и Н тип I (Н-1) (рис. 1) [13].

Ранее было продемонстрировано, что в ходе длительной колонизации в макаках-резус (*Macaca mulatta*) клетки *H. pylori* способны переключать свой фенотип, определяемый антигеном Льюиса, для адаптации к организму-хозяину, что указывает на возможность селекции бактериальных фенотипов [14]. Однако не было проведено структурных исследований, которые могли бы прояснить молекулярный механизм такой адаптации. В настоящей работе приведены результаты химического, ЯМР-спектроско-

пического и масс-спектрометрического анализов ОПС, включая изучение внутренних и концевых олигосахаридных звеньев, а также олигосахаридов кора в ЛПС штаммов *H. pylori*, выделенных после длительной колонизации в организме животных в сравнении с родительским штаммом. Эти данные подтвердили эволюцию экспрессии антигенов Льюиса в макаках-резус.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы, культивирование, выделение и деградация липополисахаридов. Использованы прививочный (родительский) штамм J166 и три изолята (98-149 и 98-169 от обезьян, экспрессирующих Le^a, и 98-181 от обезьяны с Le^b), выделенные после 40-недельной колонизации. Для получения биомассы бактериальные штаммы выращивали на кровяном агаре как описано в работе [15]. Образцы ЛПС выделяли экстракцией из клеточной массы водным фенолом [16] и расщепляли 0,1 М натрий-ацетатным буфером (рН 4) 2,2 ч при 100 °С. Водорастворимую углеводсодержащую часть фракционировали гель-распределитель-

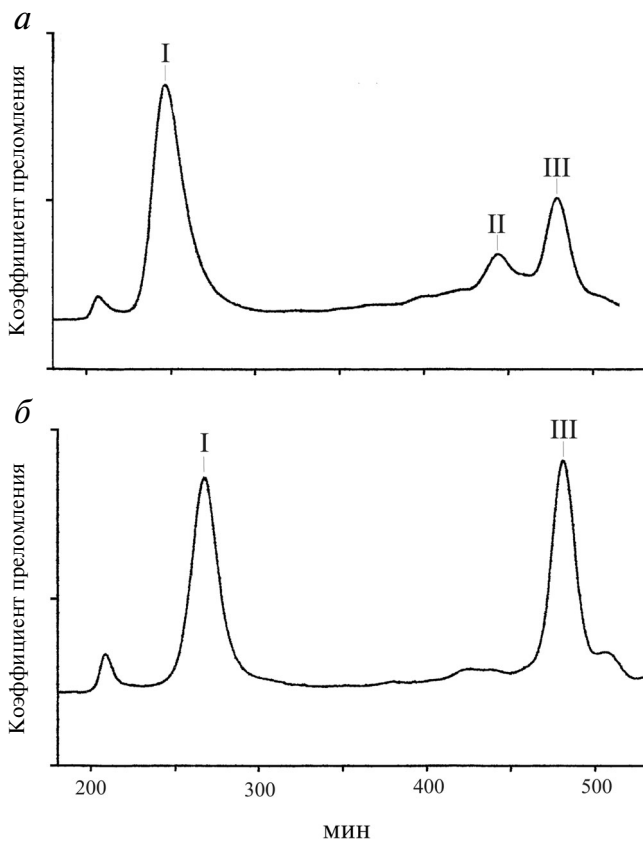


Рис. 2. Профили элюции на геле Sephadex G-50 углеводных продуктов из ЛПС *H. pylori* 98-149 (а) и 98-169 (б). Фракция I представляет собой ОПС с цепью polyLacNAc, присоединенный к кору; фракции II и III являются олигосахаридами кора. Соответствующие структуры приведены на рис. 3

ной хроматографией на колонке с гелем Sephadex G-50 Superfine (70 × 2,6 см, свободный объем 200 мл) в 0,05 М пиридиний-ацетатном буфере (рН 4,5) со скоростью потока 0,5 мл/мин (рис. 2). Элюцию контролировали с помощью дифференциального рефрактометра «Waters», размер фракции составлял 10 мл. Полученные продукты из каждого ЛПС представляли собой полисахарид (фракция I) и усеченный олигосахарид кора (фракция III); дополнительный олигосахарид кора (фракция II) был выделен из ЛПС штаммов J166 и 98-169.

Моносахаридный анализ и метилирование. Гидролиз проводили 2 М трифторуксусной кислотой (120 °С, 2 ч) и моносахариды идентифицировали газо-жидкостной хроматографией (ГЖХ) в виде ацетатов полиолов на приборе «Hewlett-Packard» 5880 с колонкой DB-5 (25 м × 0,25 мм) при температурной программе от 160 °С (1 мин) до 250 °С со скоростью 3 °С/мин.

Метилирование осуществляли с помощью метилиодида в диметилсульфоксиде в присутствии натрий-метилсульфинилметанида (CH₃SOCH₂Na)

в качестве основания [17]. Гидролиз проводили как при моносахаридном анализе, частично метилированные моносахариды восстанавливали NaBD₄, превращали в ацетаты полиолов и анализировали методом ГЖХ-МС на хроматографе «Hewlett Packard» 5890, соединенном с масс-спектрометром «NERMAG» R10-10L (Франция), используя колонку с неподвижной фазой DB-5 и температурной программой от 130 °С (1 мин) до 250 °С со скоростью 3 °С/мин.

Деградация по Смитчу. ОПС штамма 98-181 (2 мг) окисляли 0,1 М NaIO₄ (0,3 мл) при 20 °С в течение 48 ч в темноте и избыток периодата разрушали добавлением этиленгликоля (0,05 мл). Продукты реакции восстанавливали NaBH₄ (6 мг) при 20 °С в течение 2 ч, обессоливали гель-распределительной хроматографией на колонке с гелем Fractogel TSK HW-40S (24 × 1 см) в воде, гидролизовали 2%-ной уксусной кислотой (2 ч, 100 °С), и полученный модифицированный ОПС выделяли хроматографией на колонке с тем же гелем.

Спектроскопия ЯМР и масс-спектрометрия. Спектры ЯМР были записаны в 99,96% D₂O при 60 °С, используя спектрометр «JEOL» EX-270. Перед съемкой спектров образцы дважды лиофилизовали из D₂O (99,9%). Химические сдвиги представлены в м.д., в качестве внутреннего стандарта использовали натрий-3-триметилсилпропаноат-2,2,3,3-d₄ (δ_H 0,00).

Масс-спектрометрию с ионизацией электро-распылением (ESI MS) осуществляли для отрицательных ионов на масс-спектрометре «VG Quattro» («Micromass», Великобритания) с ацетонитрилом в качестве мобильной фазы при потоке 10 л/мин. Образцы растворяли в 50%-ном водном ацетонитриле при концентрации ~50 пкмоль/мкл и 10 мкл раствора вводили с помощью шприца в прибор.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расщепление липополисахаридов и характеристика олигосахаридов кора. Мягкая кислотная деградация ЛПС из *H. pylori* J166 и трех дочерних штаммов (98-149, 98-169 и 98-181) с последующей хроматографией на геле Sephadex G-50 (рис. 2) привела к ОПС на основе polyLacNAc (фракция I) и одной или двум фракциям олигосахаридов кора (фракция III в штаммах 98-149 и 98-181 или фракции II и III в штаммах J166 и 98-169). Все фракции исследовали с помощью моносахаридного анализа; олигосахариды анализировали также методом ESI MS, а ОПС изучали методами метилирования (таблица) и спектроскопии ЯМР.

Данные метилирования фракции I (ОПС). Времена удерживания при анализе ГЖХ частично метилированных ацетатов полиолов в сравнении с 2,3,4-три-*O*-метилфукозой (2,3,4-Me₃-Fuc, 1,00) и гексаацетатом глюкозола (2,67)

Частично метилированное производное	Относительное время удерживания	Содержание (по отклику детектора) в штаммах			
		J166	98-149	98-169	98-181
2,3,4-Me ₃ -Fuc	1,00	0,43	0,39	0,31	0,16
3,5-Me ₂ -Rib	1,01	0,10	0,11	0,17	0,13
2,4-Me ₂ -Fuc	1,27	0,12	0,15	0,12	0,09
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1,33	0,13	0,13	0,10	0,71
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,38	<0,05	0,13	0,10	<0,05
2,4,6-Me ₃ -Glc	1,66	0,13	0,12	0,11	0,13
2,3,6-Me ₃ -Gal	1,67	0,24	0,25	0,23	0,15
2,4,6-Me ₃ -Gal	1,73	1,15	1,17	1,23	0,33
2,6-Me ₂ -Gal	1,96	<0,05	<0,05	<0,05	0,86
3,4,6,7-Me ₄ -LD-Нер	2,31	0,13	0,11	0,12	0,06
2,3,4,6-Me ₄ -DD-Нер	2,37	0,13	0,13	0,13	0,18
3,4,6-Me ₃ -DD-Нер	2,71	0,12	0,11	0,10	0,10
2,3,6-Me ₃ -GlcNAc	2,81	0,39	0,28	0,32	0,68
2,4,6-Me ₃ -GlcNAc	2,97	0,15	0,11	0,08	0,09
2,6-Me ₂ -GlcNAc	3,13	0,46	0,61	0,60	0,20

Моносахаридный анализ показал, что главными компонентами олигосахаридной фракции III в каждом штамме были глюкоза, галактоза, *D*-глицеро-*D*-манно-гептоза (DD-Нер) и *L*-глицеро-*D*-манно-гептоза (LD-Нер). Анализ методом ESI MS показал присутствие основного соединения с мол. массой 242,4 Да. С учетом данных моносахаридного анализа и ESI MS сделан вывод, что эта фракция представляет собой укороченный олигосахарид кора состава GlcGal(DD-Нер)(LD-Нер)₂KdoPEtn, где Kdo обозначает 3-дезоксид-*D*-манно-окт-2-улозоновую кислоту в ангидро-форме, а PEtn – 2-аминоэтилфосфат. Соединение с таким же составом было получено ранее из ЛПС ряда других штаммов *H. pylori*, его строение приведено на рис. 3 (структура 1) [7, 13].

Основная олигосахаридная фракция II, полученная из ЛПС *H. pylori* J166 и 98-169, отличалась от фракции III присутствием фукозы и GlcNAc, а также более высоким содержанием DD-Нер. Ее моносахаридный состав и мол. масса 1946,6 Да, определенная методом ESI MS, соответствовали олигосахариду кора из штаммов *H. pylori* 26695 и Sydney, имеющему структуру 2 (рис. 3) [4, 18]. Во фракции II также присутствовали соединения, содержащие одну или несколько дополнительных остатков гексоз и рибо-

зы и имеющие сходный состав с олигосахаридами кора *H. pylori*, строение которых было установлено ранее [4].

Моносахаридный анализ и анализ методом метилирования фракции I из каждого штамма (таблица) продемонстрировали присутствие всех составляющих кора, включая концевую глюкозу, 4-замещенную галактозу, 2-замещенную LD-Нер, 7-замещенную DD-Нер (место удлинения кора), 2,7-дизамещенную DD-Нер, 3-замещенный GlcNAc и 3-замещенную фукозу. Эти компоненты были минорными, и был сделан вывод, что фракция I представляет собой ОПС, присоединенный к кору ЛПС.

Характеристика *O*-полисахаридов. Моносахаридный анализ и метилирование фракции I из ЛПС *H. pylori* J166, 98-149 и 98-169 (таблица) продемонстрировали типичное строение на основе (1→3)-polyLacNAc с несколькими звеньями LacNAc, фукозилированными по положению 3 остатка GlcNAc (структура 3) (рис. 3) (сравни с лит. данными [7, 18–20]). Исходя из соотношения 4-замещенного и 3,4-дизамещенного остатков GlcNAc (таблица), степень фукозилирования составляла 54, 69 и 65% в штаммах J166, 98-149 и 98-169 соответственно и, следовательно, фукозилированные звенья LacNAc в них были основными. Соотношение метилирован-

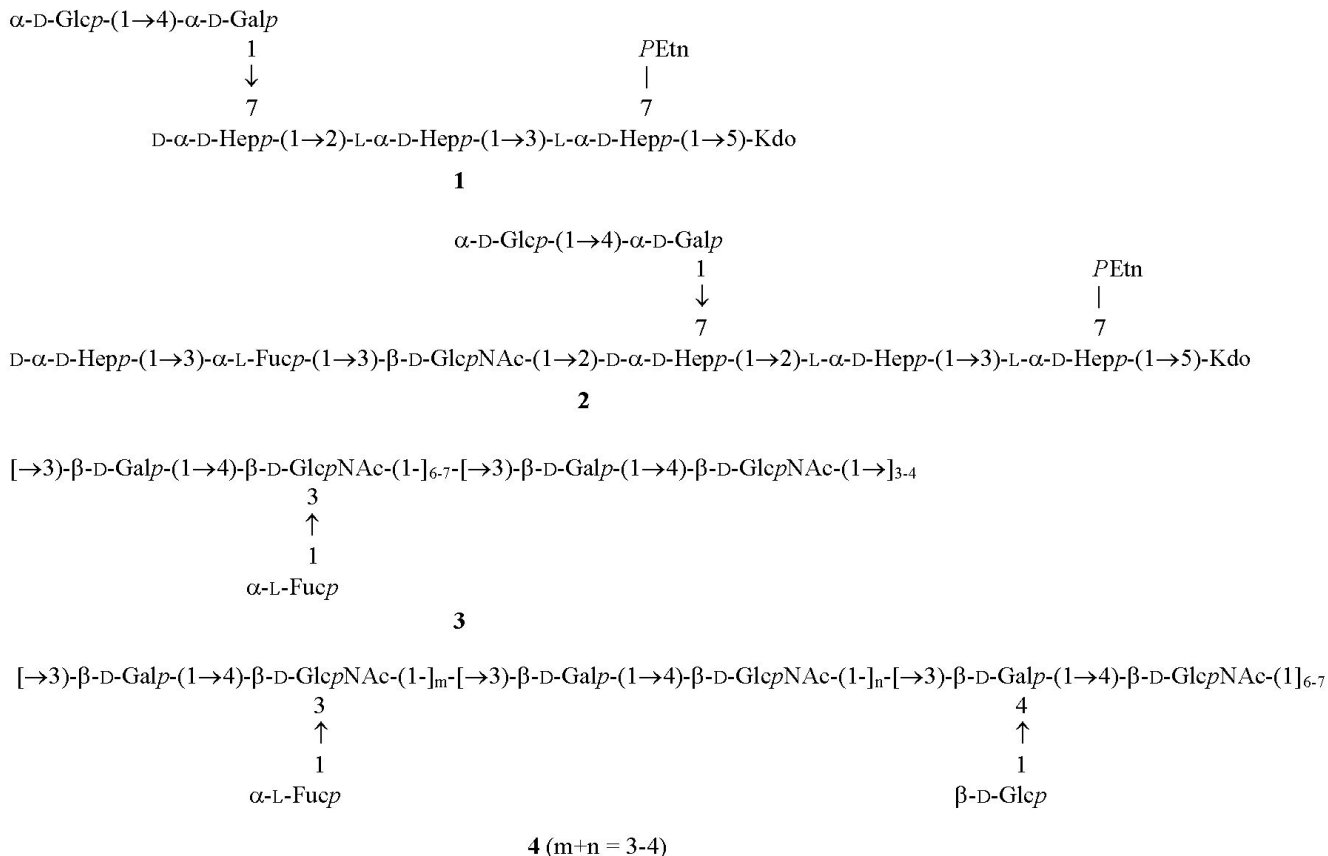


Рис. 3. Структуры фракции III с укороченным олигосахаридом кора из всех изученных штаммов *H. pylori* (1), основной фракции II олигосахарида кора ЛПС штаммов *H. pylori* J166 и 98-169 (2) и фракции I (ОПС) из *H. pylori* J166, 98-149, 98-169 (3) и 98-181 (4). В олигосахаридах 1 и 2 остатки Kdo присутствуют в ангидро-форме. Распределение гликозилированных и негликозилированных звеньев LacNAc в полисахаридах 3 и 4 не определено

ных производных 3-замещенной Gal в звеньях LacNAc и остатков гептозы в коре показало присутствие 10–11 внутренних звеньев LacNAc в каждой полисахаридной цепи. Основные сигналы аномерных протонов в ^1H ЯМР-спектре ОПС принадлежали остаткам $\beta\text{-GlcpNAc}$ (4,74 м.д., $J_{1,2}$ 8,5 Гц), $\beta\text{-Galp}$ (4,49 м.д., $J_{1,2}$ 8 Гц) и $\alpha\text{-Fucp}$ (5,04 м.д., $J_{1,2}$ 3 Гц) (сравни с лит. данными [7, 18, 19]). Эти данные подтверждают поли(α -фукозилирование) цепи polyLacNAc (структура 3) (рис. 3).

В то время как существенного структурного различия между фракцией I из штаммов J166, 98-149 и 98-169 обнаружено не было, ОПС штамма *H. pylori* 98-181 отличался существенно большим содержанием глюкозы (82% по сравнению с 22–29% в трех других исследованных штаммах). Анализ методом метилирования показал присутствие как главных компонентов концевых остатков глюкозы и 3,4-дизамещенных остатков галактозы, тогда как 3-замещенные остатки галактозы, являющиеся основными в ОПС со структурой 3, были минорными (таб-

лица). В дополнение к сигналам аномерных протонов, идентифицированных в ОПС штаммов J166, 98-149 и 98-169 (см. выше), спектр ^1H ЯМР полисахарида штамма 98-181 содержал интенсивный сигнал H-1 остатка $\beta\text{-Glcp}$ (4,88 м.д., $J_{1,2}$ 7,5 Гц).

Эти данные подтвердили, что ОПС штамма 98-181 имеет структуру 4, которая отличается декорацией звена LacNAc остатком β -глюкозы, присоединенным в положение 4 остатку галактозы (рис. 3). Исходя из соотношения 3-замещенного и 3,4-дизамещенного остатков галактозы (таблица), степень гликозилирования составляла ~70%. Цепь poly(LacNAc) в штамме 98-181 оказалась сходной с цепями трех других штаммов, но степень фукозилирования звеньев LacNAc была меньше (~30%).

Структура 4 подтверждена распадом ОПС по Смитсу, в результате которого за счет удаления концевых остатков фукозы и глюкозы образовалась линейная цепь polyLacNAc, строение которой было подтверждено метилированием и спектроскопией ^1H ЯМР (данные не представле-

ны). Глюкозилирование polyLacNAc по положению 4 остатка β -Galp является новой структурной особенностью ЛПС *H. pylori*, в то время как глюкозилирование или галактозилирование β -GlcNAc по положению 6 было описано ранее [9].

Характеристика концевых олигосахаридных звеньев и соответствие фенотипу хозяина. Структуры концевых звеньев на невосстанавливаемом конце ОПС исследовали с помощью двумерной корреляционной спектроскопии $^1\text{H}, ^1\text{H}$ (COSY), как описано ранее [7, 18]. Анализ характеристичных корреляций H5/H6 в остатках Fuc оказался полезным для идентификации концевых олигосахаридных звеньев в ОПС *H. pylori*.

В ОПС всех изученных штаммов остатки фукозы находились в определенных положениях кора (рис. 4, в) (H5/H6 при 4,33/1,14 м.д.) и во внутреннем фукозилированном звене LacNAc (рис. 4, г) (H5/H6 при 4,80/1,13 м.д.). В

родительском штамме J166 дополнительные остатки фукозы присутствовали в составе концевых звеньев Le^y (H5/H6 при 4,87/1,22 м.д. и 4,24/1,25 м.д.) и H типа 1 (H5/H6 при 4,29/1,24 м.д.) (рис. 4, а). Ни один из дочерних штаммов не давал таких же корреляций Fuc H5/H6, как родительский штамм, из-за отсутствия одного или обоих этих типов концевых олигосахаридных звеньев. Таким образом, звено H типа 1 отсутствует во всех трех дочерних штаммах (рис. 4, б–д), и только штамм 98-181 сохранил звено Le^y (рис. 4, з). Штаммы 98-149 и 98-169 экспрессировали звено Le^x вместо звена Le^y (рис. 4, б, в).

Экспрессия Le^y изолятом 98-181 соответствует статусу секретиции обезьяны-хозяина, который характеризовался фенотипом Le^b. Отсутствие экспрессии концевой звена Le^x штаммом 98-181 сопровождалось меньшим уровнем фукозилирования внутренних звеньев LacNAc, что

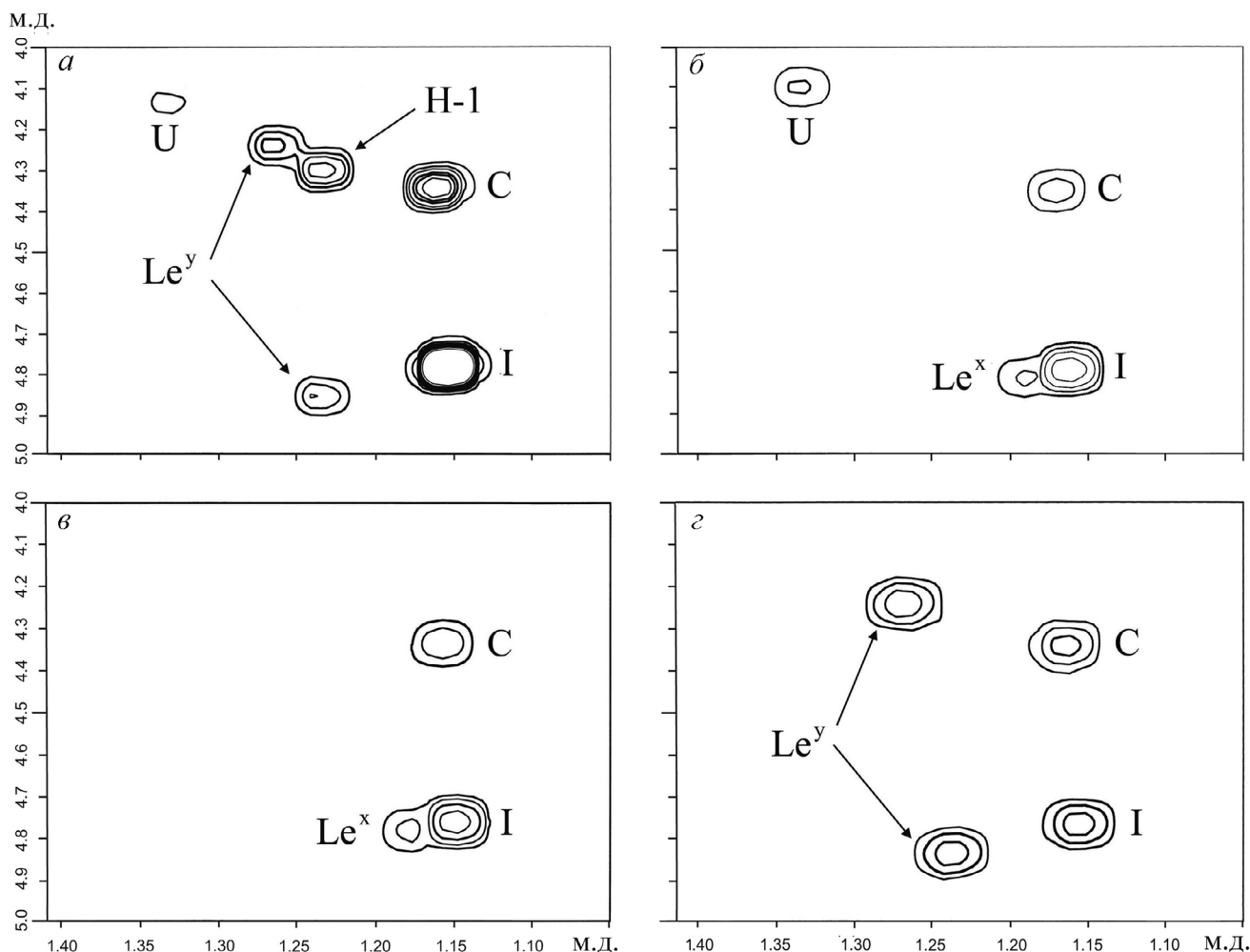


Рис. 4. Фрагменты спектров $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY ОПС из *H. pylori* J166 (а), 98-149 (б), 98-169 (в) и 98-181 (г). Показаны корреляции H5/H6 остатков фукозы в коре (С), внутренних звеньях ОПС (I), концевых звеньях Льюис X (Le^x), Льюис Y (Le^y) и H типа 1 (H-1), а также в неизвестном положении (U)

не способствовало синтезу также внутренних звеньев Le^x. С другой стороны, изоляты 98-149 и 98-169 различались более высокой экспрессией как терминальных, так и внутренних звеньев Le^x, которые соответствовали фенотипу Le^a в животных-хозяевах. Таким образом, сделано заключение, что, поскольку Le^a и Le^b являются изомерами Le^x и Le^y соответственно (рис. 1), обнаруженные корреляции являются формами адаптации или селекции штаммов *H. pylori* в слизистой оболочке индивидуальных организмов-хозяевах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

Благодарности. Авторы благодарят М. Дж. Блайзера (Нью-Йоркский университет, США) за предоставление штаммов *H. pylori*, А. П. Морана (Национальный университет Ирландии, Ирландия) за культивирование бактерий и ценное обсуждение, профессора П.-Э. Янссона (Каролинский институт, Клинический исследовательский центр, Университетский госпиталь Худдинге, Худдинге, Швеция) за предоставление доступа к лабораторному оборудованию, включая ЯМР-спектрометр и ГЖХ-масс-спектрометр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kusters, J.G., van Vliet, A.H., and Kuipers, E.J. (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Clin Microbiol Rev.*, **19**, 449–490, doi: 10.1128/CMR.00054-05.
- Chmiela, M., and Kupcinskis, J. (2019) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter*, **24**, 2638, doi: 10.1111/hel.12638.
- Moran, A.P., Lindner, B., and Walsh, E.J. (1997) Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides, *J. Bacteriol.*, **179**, 6453–6463, doi: 10.1128/jb.179.20.6453-6463.1997.
- Altman, E., Chandan, V., Li, J., and Vinogradov, E. (2011) A reinvestigation of the lipopolysaccharide structure of *Helicobacter pylori* strain Sydney (SS1), *FEBS J.*, **278**, 3484–3493, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08270.x.
- Moran, A.P. (1996) The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **10**, 39–50, doi: 10.1046/j.1365-2036.1996.22164004.x.
- Moran, A.P., and Aspinall, G.O. (1998) Unique structural and biological features of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **397**, 37–49.
- Knirel, Y.A., Kocharova, N.A., Hynes, S.O., Widmalm, G., Andersen, L.P., Jansson, P.-E., and Moran, A.P. (1999) Structural studies on lipopolysaccharides of serologically non-typable strains of *Helicobacter pylori*, AF1 and 007, expressing Lewis antigenic determinants, *Eur. J. Biochem.*, **266**, 123–131, doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00831.x.
- Wang, G., Ge, Z.M., Rasko, D.A., and Taylor, D.E. (2000) Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation, *Mol. Microbiol.*, **36**, 1187–1196, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01934.x.
- Monteiro, M.A. (2001) *Helicobacter pylori*: a wolf in sheep's clothing: the glycoform families of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides expressing histo-blood groups: structure, biosynthesis, and role in pathogenesis, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **57**, 99–158, doi: 10.1016/s0065-2318(01)57016-x.
- Moran, A.P. (2008) Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*, *Carbohydr. Res.*, **343**, 1952–1965, doi: 10.1016/j.carres.2007.12.012.
- Chmiela, M., Mischczyk, E., and Rudnicka, K. (2014) Structural modifications of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: an idea for how to live in peace, *World J. Gastroenterol.*, **20**, 9882–9897, doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9882.
- Li, H., Liao, T., Debowski, A.W., Tang, H., Nilsson, H.O., Stubbs, K.A., Marshall, B.J., and Benghezal, M. (2016) Lipopolysaccharide structure and biosynthesis in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter*, **21**, 445–461, doi: 10.1111/hel.12301.
- Monteiro, M.A., Chan, K.H.N., Rasko, D.A., Taylor, D.E., Zheng, P.Y., Appelmek, B.J., Wirth, H.P., Yang, M.Q., Blaser, M.J., Hynes, S.O., Moran, A.P., and Perry, M.B. (1998) Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides, *J. Biol. Chem.*, **273**, 11533–11543, doi: 10.1074/jbc.273.19.11533.
- Wirth, H.-P., Manqiao, Y., Edgardo, S.-V., Berg, D.E., Dubois, A., and Blaser, M.J. (2006) Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys, *FASEB J.*, **20**, 1534–1536, doi: 10.1096/fj.05-5529fje.
- Moran, A.P., Helander, I.M., and Kosunen, T.U. (1992) Compositional analysis of *Helicobacter pylori* rough-form lipopolysaccharides, *J. Bacteriol.*, **174**, 1370–1377, doi: 10.1128/jb.174.4.1370-1377.1992.
- Westphal, O., and Jann, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure, *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 83–91.
- Hakomori, S.-I. (1964) A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide, *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205–208.
- Moran, A.P., Knirel, Y.A., Senchenkova, S.N., Widmalm, G., Hynes, S.O., and Jansson, P.-E. (2002) Phenotypic variation in molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. Acid-induced phase variation in Lewis(x) and Lewis(y) expression by *H. pylori* lipopolysaccharides, *J. Biol. Chem.*, **277**, 5785–5795, doi: 10.1074/jbc.M108574200.
- Monteiro, M.A., Rasko, D., Taylor, D.E., and Perry, M.B. (1998) Glucosylated *N*-acetylglucosamine *O*-antigen chain in the lipopolysaccharide from *Helicobacter pylori* strain UA861, *Glycobiology*, **8**, 107–112, doi: 10.1093/glycob/8.1.107.
- Aspinall, G.O., Monteiro, M.A., Pang, H., Walsh, E.J., and Moran, A.P. (1996) Lipopolysaccharide of the *Helicobacter pylori* type strain NCTC 11637 (ATCC 43504): structure of the *O*-antigen chain and core oligosaccharide regions, *Biochemistry*, **35**, 2489–2497, doi: 10.1021/bi951852s.

VARIATIONS IN THE EXPRESSION OF TERMINAL OLIGOSACCHARIDE UNITS AND GLYCOSYLATION OF POLY(*N*-ACETYLLACTOSAMINE) CHAIN IN THE *Helicobacter pylori* LIPOPOLYSACCHARIDE UPON COLONIZATION OF RHESUS MACAQUES***A. V. Perepelov**, S. N. Senchenkova, and Yu. A. Knirel***Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
19991 Moscow, Russia; E-mail: andreivperepelov@gmail.com*

Received October 4, 2019

Revised November 29, 2019

Accepted November 30, 2019

Helicobacter pylori is an important human pathogen that causes gastritis, gastric and duodenal ulcers, and gastric cancer. O-polysaccharides of *H. pylori* lipopolysaccharides (LPS) are composed of (β 1 \rightarrow 3)-poly(*N*-acetylglucosamine) (polyLacNAc) decorated with multiple α -L-fucose residues. In many strains, their terminal LacNAc units are mono- or di-fucosylated to mimic Lewis X (Le^x) and/or Lewis Y (Le^y) oligosaccharides. The studies in rhesus macaques as a model of human infection by *H. pylori* showed that this bacterium adapts to the host during colonization by expressing host Lewis antigens. Here, we characterized LPS from *H. pylori* strains used in the previous study, including the parental J166 strain and the three derivatives (98-149, 98-169, and 98-181) isolated from rhesus macaques after long-term colonization. Chemical and NMR spectroscopic analyses of the LPS showed that the parental strain expressed Le^x , Le^y , and H type 1 terminal oligosaccharide units. The daughter strains were similar to the parental one in the presence of the same LPS core and fucosylated polyLacNAc chain of the same length but differed in the terminal oligosaccharide units. These were Le^x in the isolates 98-149 and 98-169, which corresponded to the Le^a phenotype of the host animals, and Le^y was found in the 98-181 isolate from the macaque characterized by the Le^b phenotype. As Le^a and Le^b are isomers of Le^x and Le^y , respectively, the observed correlation confirmed adaptation of the expression of terminal oligosaccharide units in *H. pylori* strains to the properties of the host gastric mucosa. The 98-181 strain also acquired glycosylation of the polyLacNAc chain and was distinguished by a lower expression of fucosylated internal LacNAc units (internal Le^x) as a result of decoration of polyLacNAc with β -glucopyranose, which may also play a role in the bacterial adaptation.

Keywords: *Helicobacter pylori*, lipopolysaccharide, O-polysaccharide, poly(*N*-acetylglucosamine), glycosylation, Lewis antigen expression, bacterial adaptation, rhesus macaque