

ФИО соискателя Науменко Олеся Игоревна

Название диссертации «Установление строения и характеристика генных кластеров биосинтеза О-специфических полисахаридов нового вида энтеробактерий *Escherichia albertii*, близкородственного *Escherichia coli*»

Шифр специальности – 1.4.9 – Биоорганическая химия

Химические науки

Шифр диссертационного совета 24.1.092.01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: sci-secr@ioc.ac.ru

Дата размещения полного текста диссертации на сайте Института
<http://zioc.ru/>

9 марта 2023 года

Дата приема к защите

15 марта 2023 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК <https://vak.minobrnauki.gov.ru>

16 марта 2023 года

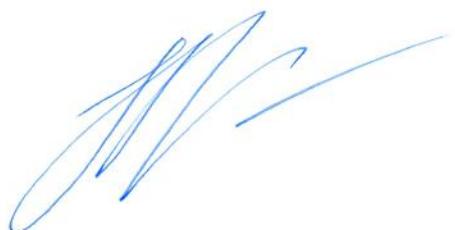
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им.
Н. Д. ЗЕЛИНСКОГО

Науменко Олеся Игоревна

УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕННЫХ
КЛАСТЕРОВ БИОСИНТЕЗА О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ
НОВОГО ВИДА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA ALBERTII*,
БЛИЗКОРОДСТВЕННОГО *ESCHERICHIA COLI*

Специальность 1.4.9 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Москва - 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского» Российской академии наук (ИОХ РАН)

Научный руководитель:

Перепелов Андрей Вячеславович

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории углеводов и биоцидов им. академика Н.К. Кочеткова №21 ФГБУН Института органической химии имени Н. Д. Зелинского Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Бовин Николай Владимирович

доктор химических наук, профессор, заведующий отделом химической биологии гликанов и липидов, главный научный сотрудник лаборатории углеводов ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук

Львов Вячеслав Леонидович

кандидат химических наук, заведующий лабораторией препаративной биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Институт иммунологии» ФМБА

Ведущая организация:

ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук (г. Саратов)

Защита состоится «___» мая 2023 г. в ___ часов на заседании Диссертационного ученого совета при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

Автореферат разослан « 16 » марта 2023 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор химических наук

Газиева

Газиева Г. А.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Липополисахарид (ЛПС) является одним из основных компонентов внешней мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий. Он играет важную роль в жизни этих микроорганизмов, поскольку, с одной стороны стабилизирует мембрану и является препятствием для воздействия на клетку вредных внешних факторов, например, анионных неспецифических пептидов, а с другой стороны является мишенью для иммунной системы организма-хозяина. ЛПС включает в себя три различные по составу и функциональному назначению области: О-специфический полисахарид (ОПС, О-антитело), на который и направлен иммунный ответ макроорганизма, олигосахарид кора (от англ. core – сердцевина) – олигосахарид, расположенный между ОПС и липидом А. Липид А, как гидрофильный компонент, служит для закорчивания ЛПС в бислойной клеточной мембране. На основе ОПС разработаны серологические схемы классификации на основе специфических иммунных сывороток для важных в медицинском отношении бактерий, и их серотипирование на основании О-антителов традиционно долгое время является одним из основных методов идентификации штаммов бактерий.

Структурное разнообразие ОПС обусловлено главным образом полиморфизмом генного кластера биосинтеза О-антитела (ГКО), расположенного в хромосоме в виде локуса между так называемыми генами «домашнего хозяйства», специфическими для каждого вида, что и позволяет проводить их ПЦР-амплификацию с последующим секвенированием и аннотированием.

Изучение строения ОПС грамотрицательных бактерий, путей их биосинтеза и иммуннохимических способствует более глубокому пониманию механизмов патогенеза инфекционных заболеваний, а также путей эволюционной диверсификации штаммов на основе оценки гомологии между ГКО бактерий как внутри одного вида, так и между видами.

Выяснение этих вопросов является актуальной проблемой современной науки о жизни, вызывающей постоянный интерес как в области фундаментальных научных дисциплин, таких как биоорганическая химия, биохимия, эволюционная геномика, так и имеет важное значение для практических целей медицинской диагностики и фармакологии. биохимиков, генетиков, иммунологов. Полученные результаты могут стать основой для разработки новых вакцин, включая гликоныюгатные вакцины на основе векторов из генно-модифицированных штаммов непатогенных бактерий, а также средств быстрой ПЦР-диагностики и идентификации бактериальных инфекций по специфическим генам.

Escherichia albertii – недавно обнаруженный возбудитель спорадических и эпидемических кишечных инфекций у людей и птиц, близкородственный кишечной палочке (*Escherichia coli*). Первоначально эти бактерии были отнесены к виду *Hafnia alvei*, но в 2003 году для них был предложен новый вид в роду *Escherichia*. Из-за отсутствия эффективных методов их идентификации и конкретных биохимических характеристик штаммы *E. albertii* часто ошибочно относят к виду *E. coli* или родам *Hafnia alvei*, *Salmonella enterica* или *Yersinia ruckeri*. Вследствие этого распространенность штаммов *E. albertii* может быть недооценена.

Большинство эшерихий является компонентом нормальной кишечной микрофлоры и не представляют угрозы для организма человека. Однако встречаются и вирулентные штаммы, которые могут вызывать гастроэнтериты, воспаления мочеполовой системы и менингит у новорожденных. Наиболее опасными являются энтерогеморрагические штаммы, вызывающие геморрагические колиты и гемолитический уремический синдром.

Кишечная палочка отличается большим разнообразием О-антигенных форм, и в настоящее время штаммы *E. coli* объединяют в 187 О-серогрупп. Строение и серологическая специфичность О-антигенов *E. coli* интенсивно исследовались на протяжении последних 60 лет, но актуальность их изучения сохраняется до сих пор, например, потому, что постоянно выявляются новые штаммы в клинических

изолятах разных регионах мира. Естественно, в поле зрения исследователей попадают и ОПС нового вида кишечных бактерий *E. albertii*.

Цель работы

Основной целью настоящей работы было создание химической основы для классификаций бактерий *E. albertii* на основе ОПС и выяснение генетического контроля их биосинтеза. Для достижения данной цели необходимо было установить строение всех О-антителенных полисахаридов этого вида. Другой не менее важной задачей исследования было применение и оптимизация использования безводных кислот как эффективного реагента для расщепления гликозидных связей, который позволял бы адекватно решать задачи структурного анализа таких сложных объектов, какими являлись исследуемые ОПС рода *Escherichia*.

Научная новизна и практическая значимость работы

В результате проведенных исследований установлены структуры ОПС всех девяти известных О-серогрупп *E. albertii*. Тем самым создана химическая основа для классификации штаммов *E. albertii*, необходимой для серодиагностики, эпидемиологического мониторинга, выявления источников инфекции и патогенных клеточных линий. Полученные данные могут быть использованы для разработки эффективных методов молекулярного типирования природных и клинических изолятов этих бактерий.

Продемонстрированы применимость и эффективность сольволиза сильными органическими кислотами для избирательного расщепления гликозидных связей, что позволило рекомендовать эти реагенты для структурного анализа сложных полисахаридов.

Публикации и апробация работы

Основное содержание диссертации опубликовано в двух обзора в журналах "Успехи химии" и "Биоорганическая химия", а также в девяти экспериментальных статьях в рецензируемых журналах, таких как "Биохимия", "Известия Академии наук. Серия химическая", "Carbohydrate Research" и "International Journal of Biological Macromolecules". Результаты работы были

представлены на одной всероссийской и четырех международных конференциях.

Диссертационная работа обсуждена и одобрена на коллоквиуме лаборатории углеводов и биоцидов ИОХ РАН.

Личный вклад соискателя

Соискатель самостоятельно проводил все химические эксперименты, включая анализ состава, выделение, очистку, модификацию и избирательное расщепление ОПС, интерпретацию данных ЯМР и масс-спектров. Также автор принимал участие в функциональном анализе генов биосинтеза изученных О-антител. Обсуждение результатов и сделанные выводы основаны на данных, полученных автором лично или при его участии в совместных исследованиях с соавторами, перечисленными в списке публикаций. Все статьи по материалам диссертации подготовлены при непосредственном участии автора.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из следующих глав: Введение, Литературный обзор, Результаты, Экспериментальная часть и Выводы, а также включает Список сокращений, Список литературы и Приложение (табулированные данные спектров ЯМР и масс-спектров высокого разрешения).

В литературном обзоре рассмотрены известные методы избирательного расщепления гликозидных связей, применяющиеся в структурном анализе бактериальных полисахаридов. В их числе специфические методы, такие как дезаминирование гексозаминов, щелочное β -элиминирование, перегруппировка Гофмана-Веермана, распад по Смиту и дефосфорилирование фтороводородной кислотой, и неспецифические методы, включая частичный кислотный гидролиз, ацетолиз и сольволиз безводными органическими кислотами. Обсуждаются условия и особенности проведения реакций.

В главе Результаты приведены данные по установлению строения ОПС бактерий *E. albertii* с использованием методов избирательного расщепления и аннотации генов их биосинтеза с учетом установленных структур. Проводится

сравнение устойчивости различных гликозидных связей и выявление закономерностей их избирательного расщепления.

В Экспериментальной части описаны методики выделения полисахаридов, их химического анализа, проведения ЯМР-спектроскопических и массспектрометрических экспериментов.

Диссертация изложена на 110 страницах, содержит 56 рисунков, 15 таблиц и 92 литературные ссылки.

Основное содержание работы

Строение О-полисахаридов бактерий *Escherichia albertii*

На основании результатов серологических исследований О-антителов штаммы *E. albertii* разделены на девять О-серогрупп. В настоящей работе установлены следующие структуры ОПС всех девяти серогрупп:

E. albertii O1

$\rightarrow 4)$ - β -D-ManpNAc3NAcA-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc3NAcA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow Am обозначает ацетимидоил

E. albertii O2

α -L-Fucp (~70%)
1
↓
3
OAc
↓
4
 $\rightarrow 3)$ - β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc 1 \rightarrow

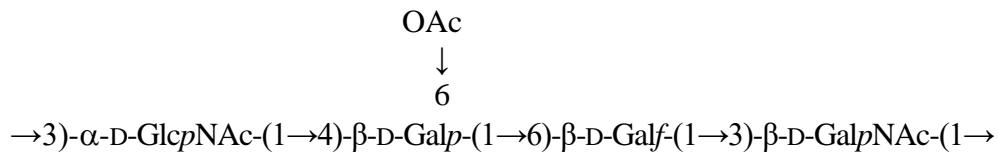
E. albertii O3

α -L-QuipNAc
1
↓
3
 $\rightarrow 3)$ - α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-1-P-(O \rightarrow 4)- α -L-QuipNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow

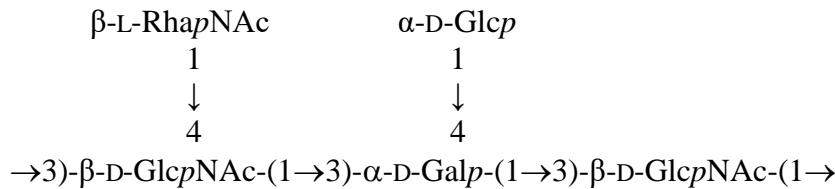
E. albertii O4

$\rightarrow 2)$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow

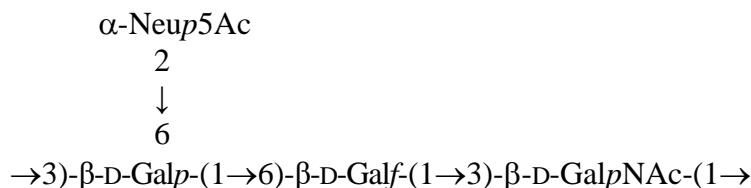
E. albertii O5



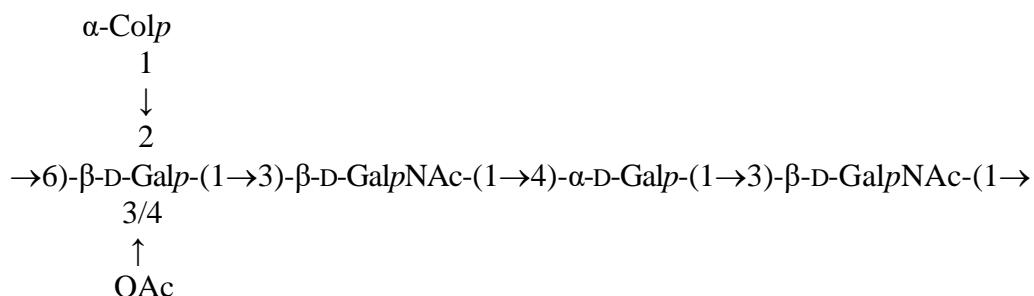
E. albertii O6



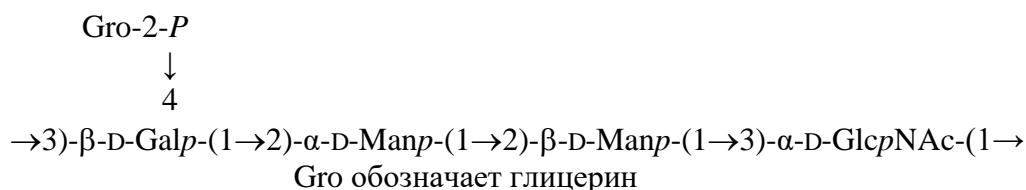
E. albertii O7



E. albertii O8

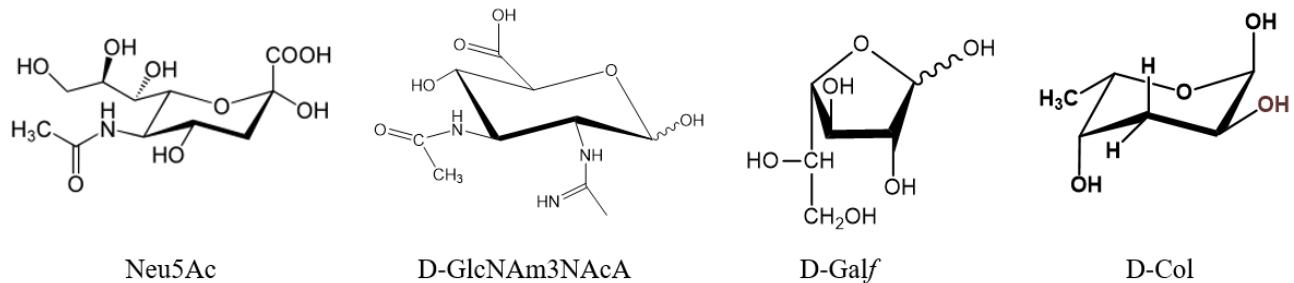


E. albertii O9



В состав ОПС *E. albertii* входят моносахариды, широкораспространенные в природе, такие как D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, L-фукоза, а также D-глюкуроновая кислота, D-галактуроновая кислота, N-ацетил-D-глюкозамин и N-ацетил-D-галактозамин. Из сахаров, менее распространенных в бактериальных полисахаридах, в изученных ОПС обнаружены N-ацетилнейраминовая кислота (Neu5Ac) в серогруппе O7, колитоза (3,6-дидезокси-D-ксило-гексоза, Col) в серогруппе O8, галактоза в фуранозной форме (D-Galp) в

серогруппах O5 и O7 и 3-ацетамидо-2-ацетимидаиламино-2,3-дидезокси-D-глюкуроновая кислота (D-GlcNAm3NAcA) в серогруппе O1.



ОПС трех из восьми серогрупп *E. albertii* отличаются нестехиометрическим О-ацетилированием. Остаток D-Gal серогруппы O8 несет О-ацетильную группу в положении 3 (~30%) или 4 (~50%), а остаток D-Gal в ОПС серогруппы O5 и остаток L-Fuc в ОПС серогруппы O2 О-ацетилированы на 70%. В ОПС серогруппы O2 отмечается нестехио-метрическое L-фукозилирование остатка D-GlcNAc.

Большинство ОПС бактерий *E. albertii* имеют уникальное строение, но некоторые ОПС имеют общие олигосахаридные фрагменты; например, общий трисахаридный фрагмент присутствует в ОПС серогрупп О5 и О7.

Для ряда ОПС *E. albertii* наблюдается структурное сходство с ОПС *E.-coli*. Так, структура линейной части О-звена ОПС *E. albertii* O7 такая же, как в ОПС *E. coli* O124 и O164 и *Shigella dysenteriae* типа 3. Структура ОПС *E.-albertii* O3 идентична известной структуре ОПС *E. coli* O181 за исключением того, что в ОПС *E. coli* остаток d-GalNAc O-ацетилирован в положении 6, тогда как в ОПС *E. albertii* О-ацетильные группы отсутствуют.

Характеристика генных кластеров О-антигенов *Escherichia albertii*

Анализ секвенированных генных кластеров О-антигенов *E. albertii* выполнялся в сотрудничестве с микробиологами из Китайского центра контроля и предотвращения болезней (Пекин, КНР) путем сравнения секвенированных генных кластеров О-антигенов (ГКО) с нуклеотидными последовательностями, представленными в доступной базе данных GenBank, с использованием онлайновой программы BLAST и с учетом полученных данных о строении ОПС. В ГКО обнаружены все гены, участвующие в биосинтезе изученных ОПС, в том

числе а) гены для синтеза нуклеотид-активированных предшественников специфических компонентов ОПС, б) гены гликозилтрансфераз, последовательно переносящих моносахариды на растущее повторяющееся звено, сборка которого происходит на липидном носителе на цитоплазматической стороне внутренней мембраны, и в) гены процессинга О-антитела, которые кодируют флиппазу и полимеразу, ответственные за перенос повторяющегося звена на липидном носителе через мембрану и соединение звеньев в полисахаридную цепь, соответственно.

Для большинства изученных штаммов на основании гомологии с представленными в базе данных GenBank ферментами, имеющими известные функции, гликозилтрансферазы, кодируемые в ГКО, отнесены к гликозидным связям, в образовании которых они принимают участие.

Ниже в качестве примера приведены структура ОПС и схематическое изображение ГКО *E. albertii* O4 (рис. 1).

→2)- α -L-Rhap-(1→2)- α -L-Fucp-(1→2)- β -D-Galp-(1→3)- α -D-GalpNAc-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→

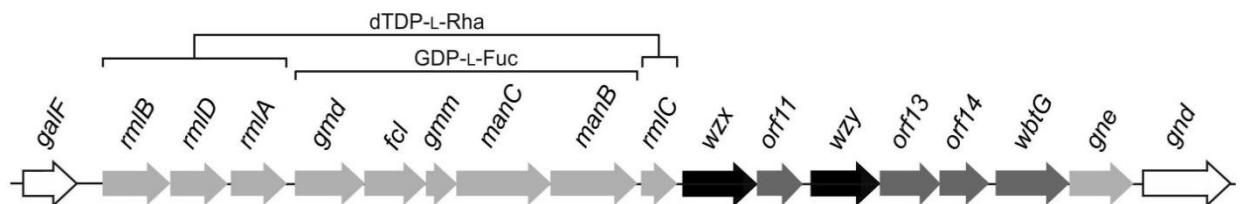


Рис. 1. Структура ОПС и организация ГКО *E. albertii* O4. Гены процессинга О-антитела показаны черным цветом, гены гликозилтрансфераз – темно-серым, гены синтеза нуклеотидных предшественников сахаров – светло-серым, фланкирующие гены – белым цветом.

В геноме *E. albertii* O9 обнаружены два генных кластера для биосинтеза полисахаридов, один из которых ответственен за биосинтез уникального О-антитела, отличающегося присутствием фосфоглицерина (структура этого О-антитела приведена выше), а второй – за биосинтез линейного маннана, имеющего такую же структуру, как резервный маннан, продуцируемый бактерий *E. coli* O8.

Структурный анализ полисахаридов

Выделение и деградация липополисахаридов

Липополисахариды (ЛПС) выделяли из сухих бактериальных клеток *E. albertii* экстракцией горячим водным фенолом по методу Вестфала, экстракт диализовали без разделения водного и фенольного слоев и полученные сырье препараты ЛПС очищали осаждением нуклеиновых кислот и белков трихлоруксусной кислотой с последующим центрифугированием.

Для структурного анализа ОПС и области кора проводили разделение углеводной и липидной частей деградацией ЛПС мягким кислотным гидролизом 2% уксусной кислотой при 100 °C в течение 2 часов. Об окончании реакции судили по исчезновению характерной для растворов ЛПС опалесценции и выпадению осадка липида А, который затем отделяли центрифугированием. Из полученного супернатанта выделяли ОПС с помощью гель-проникающей хроматографии на полимерном носителе Sephadex G-50 Superfine.

Гликозидные связи большинства моносахаридных компонентов ОПС устойчивы в приведенных выше условиях деградации ЛПС. Исключение составляет колитоза (3,6-дидезокси-D-ксило-гексоза), которая частично отщеплялась при мягком кислотном гидролизе ЛПС *E. albertii* О8.

Определение моносахаридного состава полисахаридов

Установление моносахаридного состава ОПС *E. albertii* проводилось с использованием полного кислотного гидролиза полисахарида для высвобождения присутствующих моносахаридов. Гидролиз проводили 2 М трифторуксусной кислотой при 120 °C в течение 2-4 часов. Идентификацию нейтральных моносахаридов в виде получаемых по стандартной методике ацетатов полиолов проводили с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Анализ позволил установить относительное содержание моносахаридов в ОПС, а при использовании внутреннего стандарта также количественный состав ОПС. Уроновые кислоты идентифицировали в виде метиловых эфиров метилгликозидов, получаемых кислотным метанолизом полисахаридов.

Избирательное расщепление полисахаридов

Распад по Смиту

Распад по Смиту применялся для отщепления боковых моносахаридных остатков или для получения олигосахаридных фрагментов полисахаридов. Метод включает в себя исчерпывающее периодатное окисление полисахарида, боргидридное восстановление образующегося полиальдегида в полигидроксильное производное и его избирательный кислотный гидролиз по ацетальным связям окисленных моносахаридов. Продукты выделяли с помощью гель проникающей хроматографии и анализировали ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией.

С помощью распада по Смиту нерегулярный разветвленный ОПС *E. albertii* O2 превращали в регулярный линейный модифицированный полисахарид (схема 1) за счет деградации и последующего удаления боковых остатков α -Fuc, присутствующих в нестехиометрическом количестве. Эта модификация существенно упростила дальнейший структурный анализ полисахарида с помощью спектроскопии ЯМР.

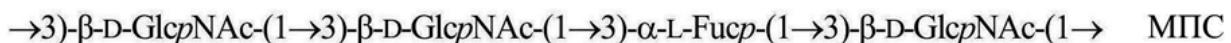
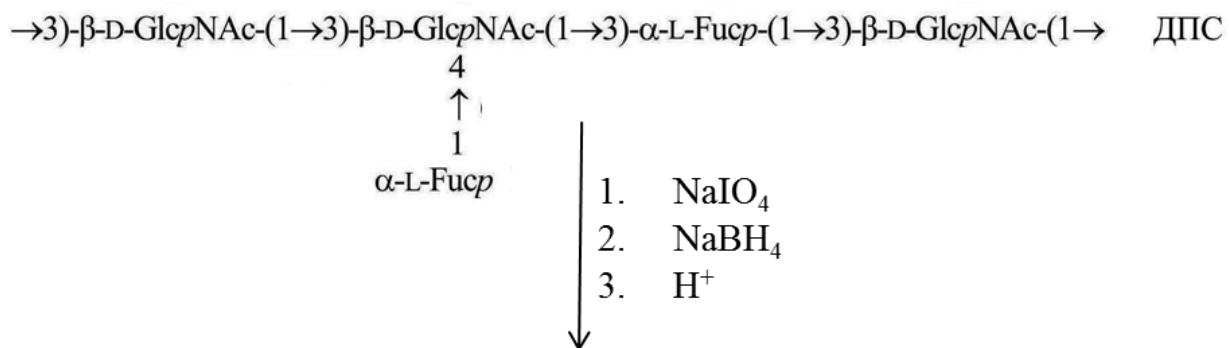


Схема 1. Распад по Смиту О-дезацетилированного ОПС (ДПС) *E. albertii* O2. МПС обозначает модифицированный ОПС.

Мягкий кислотный гидролиз

Этот метод использовался с той же целью, что и описанный выше распад по Смиту. С его помощью разветвленный ОПС *E. albertii* O8 с нестехиометрическим содержанием бокового остатка колитозы, гликозидная связь которого является кислотолабильной, превращали в регулярный линейный модифицированный полисахарид за счет удаления этих боковых остатков с помощью мягкого кислотного гидролиза, который проводили 2% уксусной кислотой при 100 °C в течение 2 часов.

Сольволиз безводными кислотами

Избирательное расщепление полисахаридов с помощью сольволиза безводными сильными кислотами основано на различной лабильности гликозидных связей присутствующих моносахаридных компонентов. В данной работе с этой целью применялись трифторуксусная и трифторметансульфоновая (трифликовая) кислоты, которые оказались удобными сольволитическими реагентами.

Так, в исследовании ОПС *E. albertii* O1 использовался сольволиз безводной $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$, который при 20 °C избирательно расщеплял гликозидную связь остатка α -GlcNAc (схема 2). Эта связь была устойчива к действию безводной $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ даже при повышенной температуре.

Escherichia albertii O1

$\rightarrow 4$)- β -D-ManpNAc3NAcA-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc3NAcA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow



β -D-ManpNAc3NAcA-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc3NAcA-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc 1

Схема 2. Сольволитическое расщепление ОПС *E. albertii* O1 действием $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$.

Структура ОПС из *E. albertii* O4 была подтверждена сольволизом действием $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, который в течение 4 часов при 50 °C привел к расщеплению наиболее лабильных гликозидных связей и образованию нескольких продуктов, которые были разделены хроматографией на геле Fractogel TSK-HW 40S. Основная полученная фракция представляла собой смесь олигосахаридов 2-4,

включая пентасахарид **4**, являющийся основным продуктом сольволиза и соответствующий повторяющемуся звену ОПС (схема 3). Пентасахарид **4** образовался в результате избирательного расщепления гликозидной связи остатка α -Fuc **D**, которая, таким образом, является наиболее лабильной связью.

Для удобства последующего ЯМР-спектроскопического анализа полученные олигосахариды превращали боргидридным восстановлением в соответствующие олигозилполиолы **5-7** (схема 3), которые выделяли гель-хроматографией на том же носителе Fractogel TSK-HW 40S. Доминирующий продукт представлял собой олигозилполиол **7**, образовавшийся при восстановлении пентасахарида **4**.

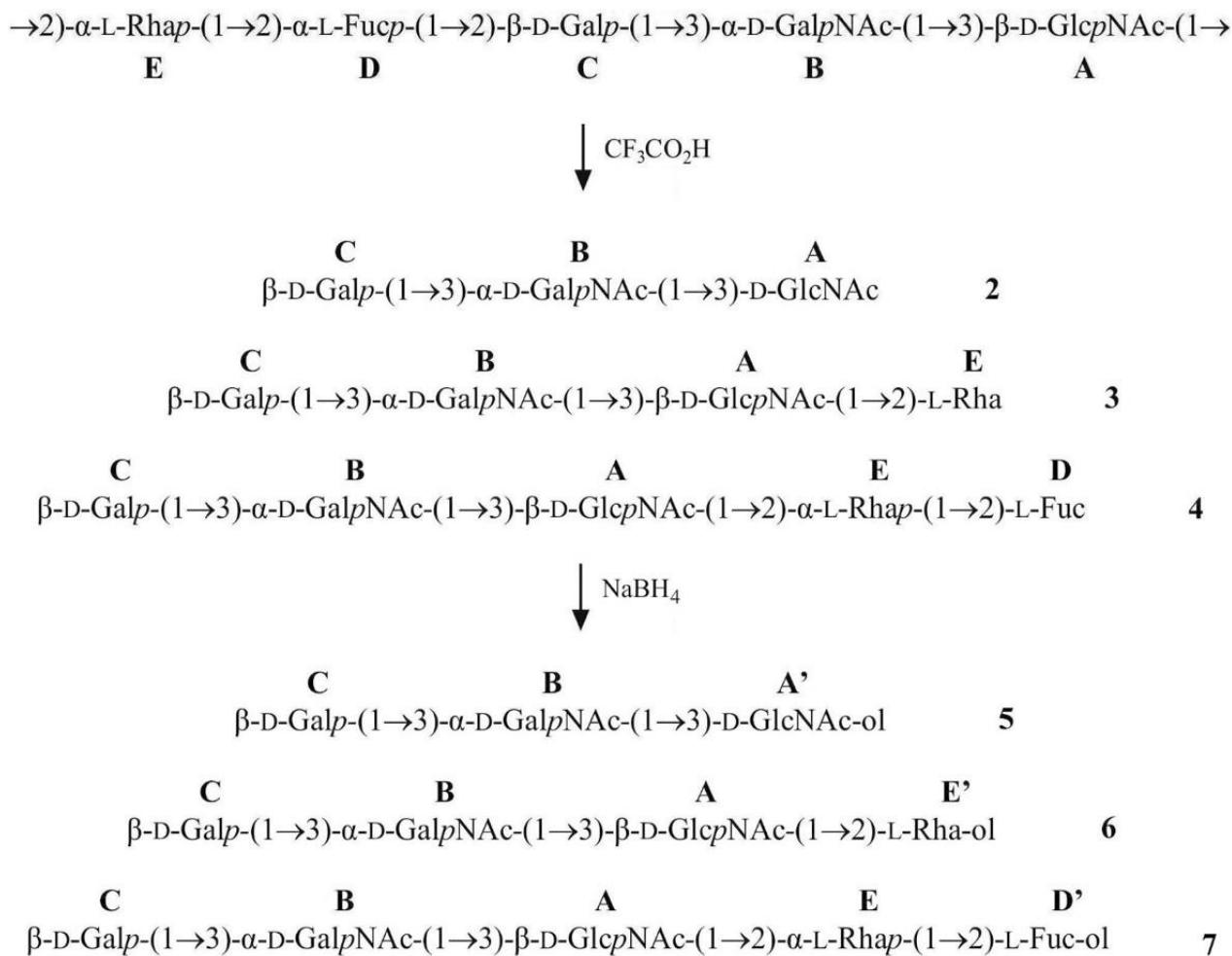


Схема 3. Сольволитическое расщепление ОПС *E. albertii* O4 действием $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ и последующее боргидридное восстановление полученных олигосахаридов **2-4** в олигозилполиолы **5-7**. GlcNAc-ol, Rha-ol и Fuc-ol обозначают N-ацетилглюкозаминитол (2-ацетамидо-2-дезоксиглюкозитол), рамнитол и фуцитол, соответственно.

В настоящей работе было изучено действие трифторуксусной кислоты на гликозидные связи б-дезоксигексоз, что подтверждает сольволиз *E. albertii* O4 и *E. coli* O60, моносахаридов в фуранозной форме (*Galf* в случае *E. albertii* O5 и *Ribf* в случае *E. coli* O54) и N-ацетил- β -гексозаминов в результате сольволиза *E. albertii* O4 и *E. coli* O54 (схема 4).

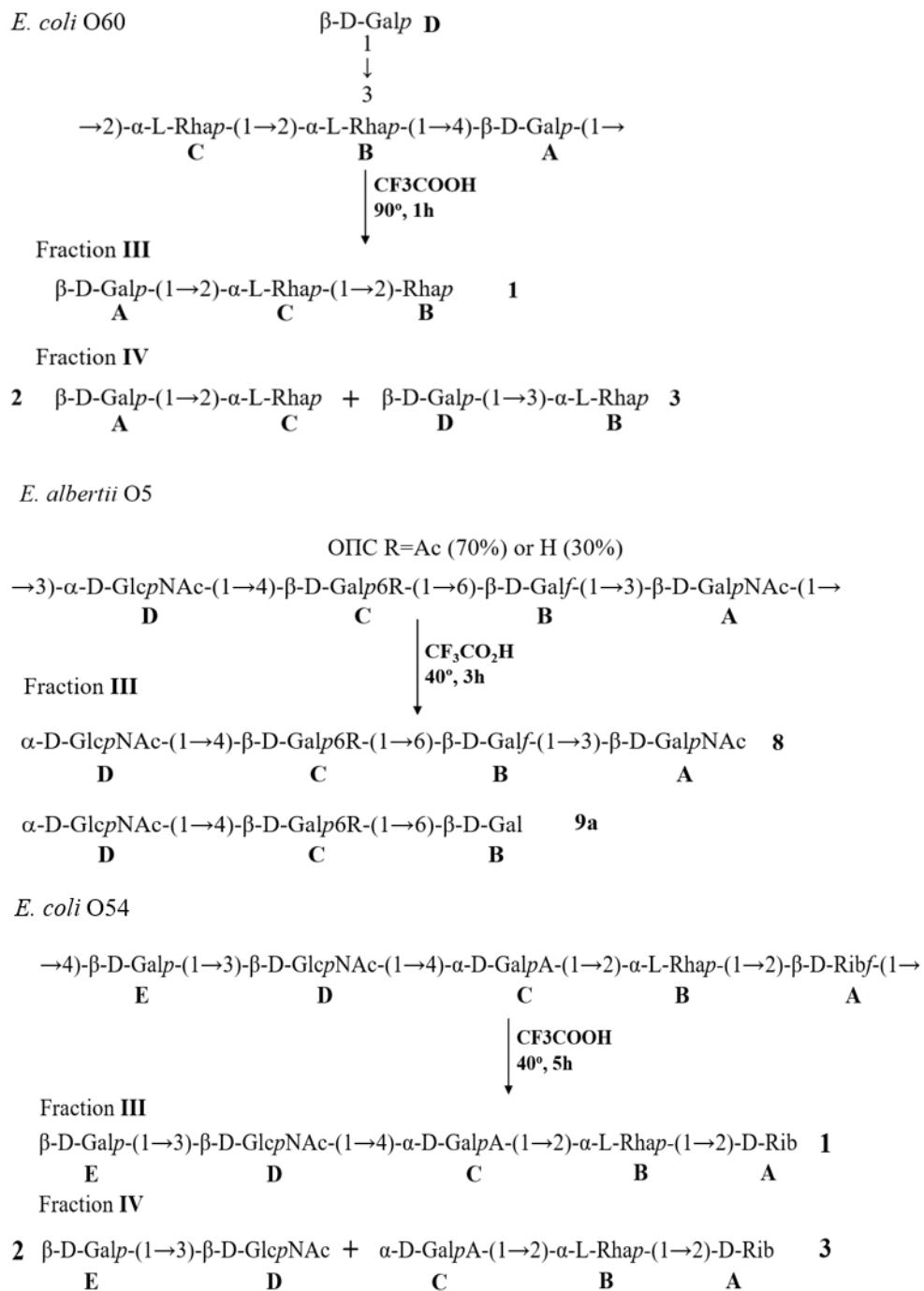


Схема 4. Сольволитическое расщепление ОПС *E. albertii* O5 и *E. coli* O60, O54 действием $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$.

В результате проделанной работы можно сделать вывод, что трифторуксусная кислота является более щадящей и избирательно расщепляет не все гликозидные связи. Второй же реагент, такой как трифторметансульфоновая кислота, избирательно расщепляет устойчивую к действию $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ гликозидную связь α -GlcNAc в ОПС *E. albertii* O1 даже при высокой температуре, а значит является более сильным реагентом.

Спектроскопия ЯМР

Одномерные спектры ЯМР содержали информацию о размере проворяющегося звена, его регулярности, а также о присутствии тех или иных моносахаридных остатков и заместителей неуглеводной природы, которые можно идентифицировать по химическим сдвигам. В частности, спектры ^{13}C -ЯМР позволяли определить положение аминогрупп в аминосахарах и неуглеводных аминокомпонентах, а также эффекты гликозилирования, которые использовались для установления характера замещения моносахаридных остатков. В качестве примера ниже приведены структура и спектр ^{13}C -ЯМР ОПС *E. albertii* O4 (рис. 2).

$\rightarrow 2)$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 2)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow

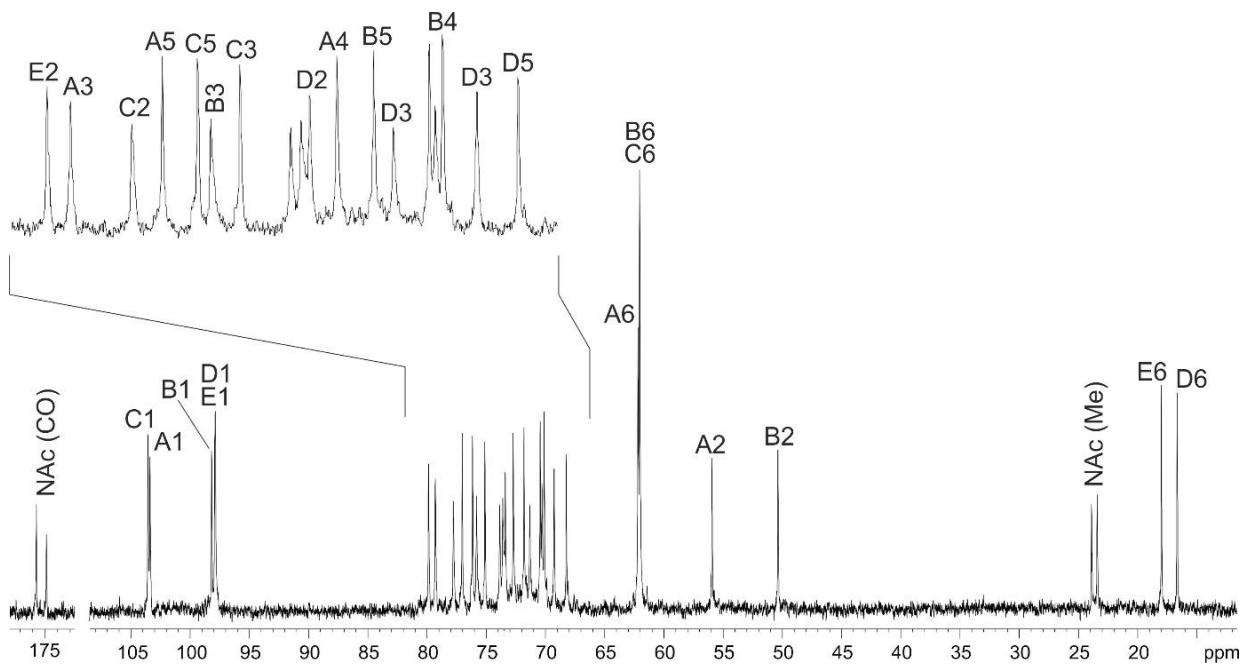


Рис. 2. Структура и спектр ^{13}C ЯМР ОПС *E. albertii* O4.

Для отнесения сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР использовались двумерные гетероядерные эксперименты $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC с детектированием протонов, коррелирующие химические сдвиги атомов углерода и присоединенных к ним протонов (рис. 4).

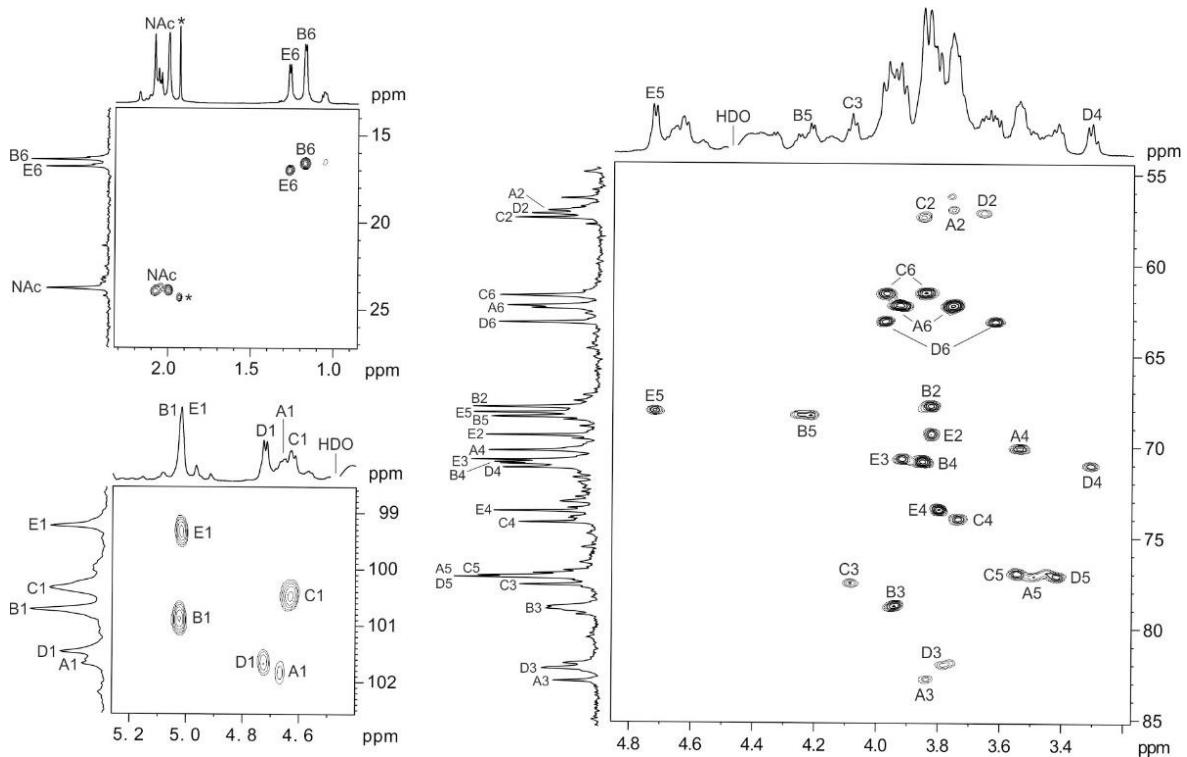
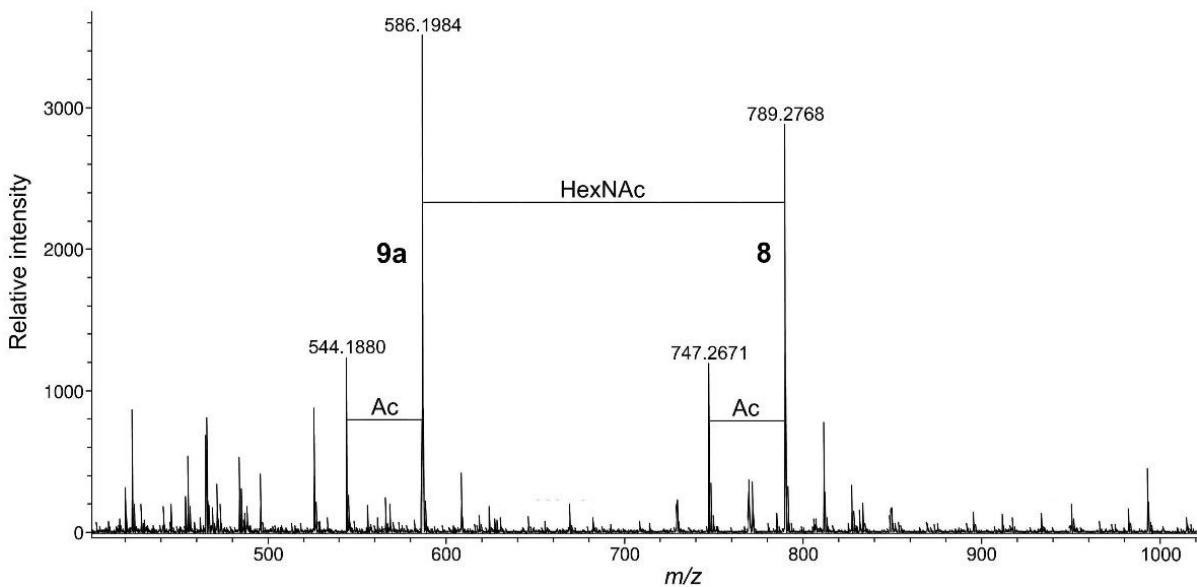


Рис. 4. Части спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC О-дезацетилированного ОПС *E. albertii* O2. Соответствующие части одномерных спектров ЯМР ^1H и ^{13}C показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей, соответственно.

Масс-спектрометрия

Масс спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением использовалась для определения молекулярной массы и тем самым подтверждения строения олигосахаридов, полученных при избирательном расщеплении ОПС. Для олигосахаридов, содержащих кислотные компоненты, такие как гексуроновые кислоты, регистрировали отрицательные ионы (например, рис. 4), для нейтральных олигосахаридов – отрицательные или положительные ионы.



β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp6Ac-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal **8**

α -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp6Ac-(1 \rightarrow 6)- β -D-Gal **9a**

Рис. 4. Масс-спектр высокого разрешения с ионизацией электрораспылением и регистрацией отрицательных ионов олигосахаридной фракции, полученной из ОПС *E. albertii* O5 сольволизом $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$. HexNAc обозначает N-ацетилгексозамин. Ниже приведено строение доминирующих олигосахаридов **8** и **9a**.

Заключение

Настоящая работа является структурным исследованием О-специфических полисахаридов важного в медицинском отношении вида эшерихий – *Escherichia albertii*. В результате этого исследования установлено строение ОПС всех девяти известных настоящее время О-серогрупп *E. albertii*.

Результаты данной работы представляют собой химическую основу для классификации штаммов *E. albertii*, которая необходима для эпидемиологического мониторинга и улучшенной диагностики инфекционных заболеваний, вызываемых этими бактериями. Они открывают путь для аннотации генов в генных кластерах биосинтеза О-антителов, включая высокоспецифические гены процессинга *wzx* и *wzy*, которые являются удобной мишенью для полимеразной цепной реакции, позволяющей осуществлять экспресс-диагностику инфекционных заболеваний.

Проведенное структурное исследование позволило определить функции генов биосинтеза ОПС изученных бактерий путем сравнения с последовательностями, представленными в доступной базе данных GenBank, с

учетом полученных данных о строении ОПС. Обнаружены все нужные для биосинтеза ОПС гены, в том числе гены, кодирующие ферменты путей синтеза специфических компонентов ОПС, и гены необходимого числа гликозилтрансфераз для сборки повторяющихся звеньев.

Основным методом структурного анализа ОПС была одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C . Она давала информацию о размере повторяющегося звена, природе моносахаридов и неуглеводных заместителей, конфигурации гликозидных связей, положении гликозилирования и О-ацетилирования моносахаридов, а также последовательности моносахаридов в повторяющемся звене. Для подтверждения строения использовалось избирательное расщепление ОПС с образованием олигосахаридов или модифицированных полисахаридов. Продукты расщепления идентифицировали с помощью спектроскопия ЯМР и (для олигосахаридов) методом масс-спектрометрии.

Для избирательного расщепления ОПС использовался как “классический” метод – распад по Смиту, так и недавно введенное нами в практику анализа углеводов избирательное сольволитическое расщепления безводными сильными органическими кислотами ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ и $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$), получившее дальнейшее развитие в настоящем исследовании.

Выводы

1. Установлено строение О-полисахаридов типовых штаммов всех девяти известных О-серогрупп *Escherichia albertii* и подтверждена обоснованность отнесения изученных штаммов к отдельным О-серогруппам,
2. Полученные данные о строении О-полисахаридов, являются химической основой для классификации штаммов бактерий *E. albertii*, необходимой для диагностики и эпидемиологического мониторинга.
3. Выявлена межвидовая идентичность одной пары и близкое структурное родство другой пары О-полисахаридов *E. albertii* и кишечной палочки *Escherichia coli*.
4. Показано соответствие установленных структур О-полисахаридов составу генных кластеров О-антителов *E. albertii* и с использованием полученных структурных данных определены предположительные функции генов, участвующих в биосинтезе О-полисахаридов.
5. Для структурного анализа ОПС успешно использован и оптимизирован на новых объектах разработанный в нашей лаборатории удобный и эффективный метод получения олигосахаридных фрагментов полисахаридов сольволизом безводными кислотами, такими как трифторметансульфокислота и трифтормукусная кислоты.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

Научные обзоры

1. Ю. А. Книрель, **О. И. Науменко**, С. Н. Сенченкова, А. В. Перепелов. Химические методы избирательного расщепления гликозидных связей в структурном анализе бактериальных полисахаридов. *Успехи химии*, 2019, 88, № 4, 406-424.

DOI 10.1070/RCR4856

2. **О. И. Науменко**, С. Н. Сенченкова, Ю. А. Книрель. О-Специфические полисахариды нового вида энтеробактерий *Escherichia albertii*, близкородственных *E. coli*. *Биоорган. химия*, 2019, 45, № 6, 576-587.

DOI: 10.1134/S0132342319060320

Экспериментальные статьи

3. H. Zheng, A. S. Shashkov, Y. Xiong, **O. I. Naumenko**, H. Wang, S. N. Senchenkova, J. Wang, Y. A. Knirel. Structure and gene cluster of the O-antigen of *Escherichia albertii* O1 resembling the O-antigen of *Pseudomonas aeruginosa* O5. *Carbohydr. Res.* 2017, 446-447, 28-31. DOI: 10.1016/j.carres.2017.04.024

4. **O. I. Naumenko**, H. Zheng, S. N. Senchenkova, H. Wang, Q. Li, A. S. Shashkov, J. Wang, Y. A. Knirel, Y. Xiong. Structures and gene clusters of the O-antigens of *Escherichia albertii* O3, O4, O6, and O7. *Carbohydr. Res.* 2017, 449, 17-22. DOI: 10.1016/j.carres.2017.06.008

5. **O. I. Naumenko**, H. Zheng, Y. Xiong, S. N. Senchenkova, H. Wang, A. S. Shashkov, A. O. Chizhov, Q. Li, Y. A. Knirel, J. Wang. Structure elucidation of the O-specific polysaccharide by NMR spectroscopy and selective cleavage and genetic characterization of the O-antigen of *Escherichia albertii* O5. *Carbohydr. Res.* 2018, 457, 25-31.

DOI: 10.1016/j.carres.2017.12.010

6. **O. I. Naumenko**, Y. Xiong, H. Zheng, S. N. Senchenkova, H. Wang, A. S. Shashkov, Q. Li, J. Wang, Y. A. Knirel. Studies on the O-polysaccharide of *Escherichia albertii* O2 characterized by non-stoichiometric O-acetylation and non-

- stoichiometric side-chain L-fucosylation. *Carbohydr. Res.* 2018, 461, 80-84. DOI: 10.1016/j.carres.2018.02.013
7. H. Zheng, **O. I. Naumenko**, H. Wang, Y. Xiong, J. Wang, A. S. Shashkov, Q. Li, Y.A. Knirel. Colitose-containing O-polysaccharide structure and O-antigen gene cluster of *Escherichia albertii* HK18069 related to those of *Escherichia coli* O55 and *E. coli* O128. *Carbohydr. Res.* 2019, 480, 73-79. DOI: 10.1016/j.carres.2019.05.013
8. **O. I. Naumenko**, H. Zheng, A. S. Shashkov, Y. Sun, S. N. Senchenkova, L. Bai, J. Wang, H. Wang, Q. Li, Y. A. Knirel, Y. Xiong. *Escherichia albertii* SY149 (O9) harbors two polysaccharide gene clusters for synthesis of the O-antigen by the Wzx/Wzy-dependent pathway and a mannan shared by *Escherichia coli* O8 by the Wzm/Wzt-dependent pathway. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 142, 609-614. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.135
9. **O. I. Naumenko**, X. Guo, S. N. Senchenkova, P. Geng, A. V. Perepelov, A. S. Shashkov, B. Liu, Y. A. Knirel. Structure and gene cluster of the O-antigen of *Escherichia coli* O54. *Carbohydr. Res.* 2018, 462, 34-38. DOI: 10.1016/j.carres.2018.04.001
10. A. V. Perepelov, **O. I. Naumenko**, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel. Structure of the O-polysaccharide of *Escherichia coli* O60. *Russ. Chem. Bull.*, 2018, 67, 2131-2134. DOI:10.1007/s11172-018-2340-z
11. S. N. Senchenkova, W. Hou, **O. I. Naumenko**, P. Geng, A. S. Shashkov, A. V. Perepelov, B. Yang, Y. A. Knirel. *Carbohydr. Res.* 2018, 460, 47-50. DOI:10.1016/j.carres.2018.02.008

Тезисы докладов на научных конференциях

12. **O. I. Naumenko**, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, H. Zheng, Y. Xiong, H. Wang, J. Wang. Structure and genetics of biosynthesis of the O-antigens of *Escherichia albertii*. *19th European Carbohydrate Symposium*, 2-6 July 2017, Barcelona, Spain. P283.
13. **O. I. Naumenko**, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, H. Zheng, Y. Xiong, H. Wang, J. Wang. Structure and genetics of biosynthesis of the O-antigens of *Escherichia albertii*. *15th Finnish Microbial Pathogenesis Days*, 21-23 August 2017, Helsinki, Finland. P. 18.
14. **О. И. Науменко**, С. Н. Сенченкова, А. С. Шашков, Ю. А. Книрель, Х. Чжэн, Я. Сюн, Х. Ван, Ц. Ли, Ц. Ван. Структурно-генетическая характеристика О-специфических полисахаридов (О-антителов) *Escherichia albertii*. *IV Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология»*, 23-28 сентября 2018 г., Киров. С. 79-80.
15. **O. I. Naumenko**, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, A. O. Chizhov, Y. A. Knirel. Structural and genetic studies on the O-antigens of *Escherichia albertii*, a recently recognized close relative of *Escherichia coli*. *29th International Carbohydrate Symposium*, 14-19 July 2018, Lisbon, Portugal. P-A4.
16. **O. I. Naumenko**, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, Y. A. Knirel, H. Zheng, Y. Xiong, H. Wang, Q. Li, J. Wang. Structure and genetics of biosynthesis of the O-specific polysaccharides of nine types of the enteric bacterium *Escherichia albertii*. *20th European Carbohydrate Symposium*, 30 June–5 July 2019, Leiden, The Netherlands. P. 165.