

**Тезисы работ победителей
Конкурса «Юниор»-2013 по химии (11 класс)**

Структура О-специфического полисахарида *Escherichia coli* O36

Евгения Александровна Левина¹, Ольга Геннадьевна Овчинникова^{2*}, А. В. Перепелов,
А. С. Шашков, Ю. А. Книрель

¹ГБОУ лицей №1303, 111033, Таможженный пр., д. 4, Москва, Россия — 11 класс

²Институт Органической Химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Липополисахарид (ЛПС, эндотоксин) является важным компонентом клеточной оболочки грамотрицательных бактерий. Эндотоксическая активность ЛПС определяется липидной частью – липидом А, который погружен в наружную мембрану и выступает в роли якоря, удерживающего за счет гидрофобных взаимодействий молекулу ЛПС на поверхности клетки. Полисахаридная цепь ЛПС (О-полисахарид, О-антиген) присоединяется к липиду А через олигосахарид, называемый кором, и ориентирована в сторону окружающей среды. Химическая структура О-полисахарида определяет специфичность иммунного ответа организма хозяина на инфицирующий микроорганизм, что широко используется для серотипирования штаммов бактерий и серодиагностики.

Кишечная палочка (*Escherichia coli*) отличается большим разнообразием О-антигенных форм, которое, как предполагают, способствует адаптации бактерии в различных экологических нишах [1]. Строение О-полисахаридов *E. coli* активно изучается и к настоящему времени установлены структуры более 130 из общего числа 186 О-серогрупп. Настоящая работа посвящена структурному анализу ранее неисследованного О-полисахарида *E. coli* O36.

ЛПС выделяли из сухих бактериальных клеток водно-фенольной экстракцией [2] и расщепляли мягким кислотным гидролизом по кислотолабильной связи между липидом А и кором. После отделения осадка липида А центрифугированием водорастворимый углевод-содержащий супернатант фракционировали гель-хроматографией на колонке с гелем Sephadex G-50, получая высокомолекулярный О-полисахарид.

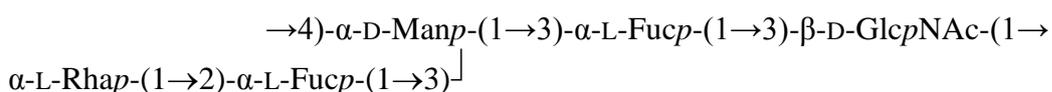
Основным подходом к структурному анализу О-полисахарида была комбинация спектроскопии ¹H и ¹³C ЯМР высокого разрешения и химических методов анализа. Полный кислотный гидролиз полисахарида с последующей конверсией высвободившихся моносахаридов в ацетаты полиолов и анализом методом ГЖХ выявил наличие 6-дезоксимааннозы (рамнозы, Rha), маннозы (Man), 6-дезоксигалактозы (фукозы, Fuc) и N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) (содержание Fuc в два раза превышало содержание остальных моносахаридов). D-Конфигурация Man и GalN и L-конфигурация 6-дезоксисахаров была установлена методом ГЖХ ацетилированных (S)-2-октил гликозидов. ГЖХ/МС анализ частично метилированных ацетатов полиолов, полученных из метилированного О-

полисахарида, выявил терминальную 6-дезоксигексозу, 2- и 3-замещенные 6-дезоксигексозу, 3,4-дизамещенную гексозу и 3-замещенный гексозамин.

Полная структура О-полисахарида была установлена методом спектроскопии ^1H и ^{13}C ЯМР. Отнесение сигналов в спектрах ЯМР проводилось с помощью двумерной гомоядерной спектроскопии $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY и гетероядерного эксперимента $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC, коррелирующего химические сдвиги атомов углерода и присоединенных к ним протонов. Последовательность моносахаридных остатков определяли с помощью двумерного эксперимента ядерного эффекта Оверхаузера (ROESY), коррелирующего химические сдвиги сближенных в пространстве протонов соседних моносахаридных остатков. С этой целью также использовали эксперимент $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC, коррелирующий химические сдвиги атомов углерода и присоединенных к ним протонов.

Дополнительное подтверждение структуры было получено путем селективного расщепления О-полисахарида, для которого был использован распад по Смитсу. Распад по Смитсу включал исчерпывающее периодатное окисление ПС, боргидридное восстановление образующегося полиальдегида в соответствующее полигидроксильное производное и его избирательный гидролиз по ацетальным связям окисленных моносахаридов. В результате произошло отщепление боковой цепи О-полисахарида и получен линейный полисахарид, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев. Его структура была установлена методом спектроскопии ЯМР аналогично структуре О-полисахарида.

На основании полученных данных был сделан вывод о том, что О-полисахарид *E. coli* O36 имеет следующую структуру:



Данные о структуре вносят вклад в создание молекулярной основы серологической классификации штаммов кишечной палочки, необходимой для серодиагностики и эпидемиологического мониторинга.

Список литературы

- [1] Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens // *FEMS Microbiol Rev*, **2006**, 30, 382-403.
- [2] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure // *Methods Carbohydr Chem*, **1965**, 5, 83-91.