

ФИО соискателя Касимова Анастасия Алексеевна

Название диссертации «Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*:
строение и расщепление деполимеразами бактериофагов»

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/>

7 марта 2024 года

Дата приема к защите

13 марта 2024 года

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

15 марта 2024 года

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

На правах рукописи



Касимова Анастасия Алексеевна

**КАПСУЛЬНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ
ACINETOBACTER BAUMANNII:
СТРОЕНИЕ И РАСЩЕПЛЕНИЕ
ДЕПОЛИМЕРАЗАМИ БАКТЕРИОФАГОВ**

1.4.9 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва 2024

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

Научный руководитель:

Книрель Юрий Александрович

Доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории углеводов и биоцидов им. академика Н. К. Кочеткова №21 ФГБУН Института органической химии им. 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 « 22 » мая 2024 г. в ____ часов на заседании Диссертационного ученого совета при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

Автореферат разослан « » марта 2024 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

Доктор химических наук



Газиева Г.А.

Общая характеристика работы

Актуальность работы:

Acinetobacter baumannii – неферментирующая грамотрицательная аэробная бактерия, которая на сегодняшний день является одним из наиболее значимых патогенов, ассоциированных с развитием внутрибольничных инфекций. *A. baumannii* может выступать причиной возникновения пневмонии, менингита, инфекций мочевыводящих путей, кожи и мягких тканей, а также инфекций кровотока. Резервуаром бактерий *A. baumannii* в больничных условиях могут быть различные поверхности и медицинские устройства.

Проблема широкого распространения *A. baumannii* в условиях больничной среды обостряется возникновением у данного вида резистентности к антибиотикам, которая вызвана, с одной стороны, необоснованным и неограниченным их применением, а с другой - способностью микроорганизма быстро приспосабливаться к неблагоприятным условиям среды. Ввиду увеличения спектра антибиотикоустойчивости, а также большого разнообразия циркулирующих внутри вида вариантов бактерий, становится актуальным поиск альтернативных способов борьбы с клиническими штаммами *A. baumannii*. Наиболее перспективным считается фаготерапия, заключающаяся в применении препаратов литических бактериофагов, инфицирующих бактериальные клетки с их последующим лизисом.

Одним из основных факторов вирулентности *A. baumannii* является капсульный полисахарид (КПС), который локализован на внешней поверхности клеточной стенки бактерии. Он создает вокруг бактериальной клетки вязкий поверхностный слой (капсулу), защищающий ее от неблагоприятных условий внешней среды, действия антибиотиков, биоцидов и бактериофагов. Вследствие широкого полиморфизма капсульного локуса биосинтеза КПС (К локус, KL) эти поверхностные гликополимеры отличаются большим структурным разнообразием - к 2024-ему году выявлено более 240 KL-типов и их число постоянно увеличивается.

Структурные ферменты бактериофагов, обладающие полисахарид-деполимеризующей активностью, с высокой специфичностью узнают и расщепляют по различным ферментативным механизмам КПС *A. baumannii*. Это позволяет фаговым частицам проникать через защитный капсульный слой бактерий, адсорбироваться на поверхности клетки и вводить внутрь нее свой генетический материал.

Цель работы

Установление строения капсульных полисахаридов, продуцируемых грамотрицательными бактериями вида *Acinetobacter baumannii*, и изучение расщепления капсульных полисахаридов деполимеразами бактериофагов.

Научная новизна и практическая значимость работы

В результате проведенного исследования установлено строение КПС 25 K-типов *Acinetobacter baumannii* с помощью химических методов, а также методов одномерной и двумерной спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C и масс-спектрометрии высокого разрешения. Произведен анализ генетических данных и отнесены предположительные функции генов, входящих в состав генных кластеров. Тем самым создана основа для классификации штаммов *A. baumannii*, необходимая для серодиагностики, эпидемиологического мониторинга, выявления источников инфекции и патогенных клеточных линий. В составе КПС *A. baumannii* обнаружены производные нонулозоновых кислот, некоторые впервые найдены в природе. Полученные данные могут быть использованы для разработки эффективных методов молекулярного типирования природных и клинических изолятов этих бактерий. Изучено расщепление КПС 15 типов рекомбинантными деполимеразами бактериофагов и установлено строение продуктов расщепления, что необходимо для создания основы фаготерапии инфекций, вызванных штаммами антибиотикорезистентного патогена *A. baumannii*.

Публикации и апробация результатов исследования

Результаты работы были опубликованы в одном обзоре в журнале «Biochemistry, Moscow» и 24 статьях в журналах «International Journal of Biological Macromolecules», «Biochemistry, Moscow», «PLoS One», «Glycobiology», «Carbohydrate Research», «Microbiology», «Microbiology Spectrum», «Viruses», «Journal of Virology» и «International Journal of Molecular Sciences». Результаты работы были представлены автором на трех международных и трех всероссийских конференциях. Работа удостоена золотой медали РАН для студентов в 2020 году.

Личный вклад соискателя

Соискатель самостоятельно проводил все химические эксперименты, включая выделение, анализ состава, очистку, модификацию и избирательное расщепление КПС, интерпретацию данных ЯМР и масс-спектров, обработку КПС фаговыми деполимеразам, выделение в чистом виде продуктов расщепления и их интерпретацию. Также автор принимал участие в функциональном анализе генов биосинтеза изученных К-типов. 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.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из следующих глав: Список условных обозначений, Введение, Литературный обзор, Обсуждение результатов, Экспериментальная часть, Выводы, Список литературы и Приложение.

Литературный обзор данной диссертационной работы посвящен краткой характеристике вида *A. baumannii*, освещению известных на момент исследования структур его капсульных полисахаридов и структуре его липоолигосахарида, а также краткой характеристике бактериофагов, механизмов их взаимодействия с бактериальной клеткой и освещению вопросов практического использования литических фагов.

В главе Обсуждение результатов приведены данные по изучению структур капсульных полисахаридов и аннотации генов их биосинтеза. Приводятся результаты расщепления капсульных полисахаридов рекомбинантными деполимеразами.

В Экспериментальной части описаны методики выделения капсульных полисахаридов, методы модификации, обработки фаговыми деполимеразами, проведение ЯМР- спектрометрических и масс-спектрометрических экспериментов.

Диссертация содержит 118 рисунков и 28 таблиц. Объем диссертации составляет 240 страниц. Библиография насчитывает 246 литературных источников.

Диссертационная работа обсуждена и одобрена на объединенном коллоквиуме лаборатории химии углеводов и биоцидов №21 ИОХ РАН.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.х.н. Книрелю Ю. А. за определение общего направления исследования, обучение всем методам изучения углеводов и интерпретации ЯМР спектров, поддержке на всем протяжении работы и помощи при подготовке статей для печати, к.х.н. Арбатскому Н. П., к.х.н. Шпирт А. М., к.х.н. Здоровенко Э. Л. и к.х.н. Сенченковой С. Н. за обучение химическим методам исследования углеводов, д.х.н. Шашкову А. С. за съемку ЯМР спектров и обучение их интерпретации, к.х.н. Дмитренку А. С. за съемку ЯМР спектров, к.х.н. Чижову А. О. за съемку масс-спектров и помощь в их интерпретации, всему коллективу лаборатории химии углеводов за ценные советы и поддержку, к.б.н. Шнейдеру М. М. и к.б.н. Поповой А. В. за культивирование клеток и подготовку рекомбинантных фаговых и профаговых деполимераз, а так же мужу Трифонову А. Л. за поддержку.

Основное содержание работы

Содержание работы представлено в трех частях. В первой части приведены методы структурного анализа и особенности их применения к КПС *A. baumannii*. Во второй части выявлены структурные особенности КПС вида *A. baumannii*. Третья часть посвящена расщеплению КПС рекомбинантными деполимеразми бактериофагов с целью создания основы для фаготерапии, направленной на инфекции *A. baumannii*, а также на получение в чистом виде олигосахаридов разной структуры и молекулярного состава.

1. Структурный анализ капсульных полисахаридов

В настоящей работе было изучено строение 25 ранее неизвестных структур КПС *A. baumannii*, включая КПС типов K3, K8, K13, K20, K21, K24, K26, K46, K54, K57, K70, K73, K82, K90, K93, K98, K106, K112, K116, K127, K128, K135, K139, K144, K218 и охарактеризованы соответствующие каждому КПС генные кластеры (KL). Выращивание бактерий проводилось в ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Россий, Оболенск) и Центре иммунологии и инфекционного контроля (Австралия, Брисбен) в рамках совместного проекта.

Выделение полисахаридов

Полисахариды выделяли водно-фенольной экстракцией сухих бактериальных клеток с последующим диализом экстракта, обработкой раствором трихлоруксусной кислоты, удалением осадка и гель-хроматографией супернатанта на геле Sephadex G-50. При подготовке образца КПС для структурного анализа применяли удаление липидных компонентов мягким кислотным гидролизом 2% уксусной кислотой. Об окончании реакции судили по исчезновению характерной для растворов КПС опалесценции или выпадению осадка, который отделяли центрифугированием, далее полисахарид был выделен с помощью гель-жидкостной хроматографии на геле TSK-40. В составе некоторых полисахаридов присутствуют кислотолабильные компоненты, такие как производные нонулозоновых кислот и ацеталь пировиноградной кислоты, которые частично удалялись в результате

данной модификации, что делало полисахарид нерегулярным, в данном случае необходим был дополнительный кислотный гидролиз.

Определение состава полисахаридов

Моносахаридный состав КПС *A. baumannii* определяли с использованием полного кислотного гидролиза полисахаридов для высвобождения присутствующих в КПС моносахаридных компонентов. Идентификацию нейтральных моносахаридов и гексозаминов в виде ацетатов полиолов, получаемых по стандартной методике, проводили с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Абсолютную конфигурацию моносахаридов и 3-гидроксипропановой кислоты определяли с помощью ГЖХ ацетилированных (*S*)-2-октилглицеридов или (*S*)-2-октиловых эфиров, соответственно. Производные 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот и уроновые кислоты идентифицировали с помощью ЯМР спектроскопии.

Мягкий кислотный гидролиз

Метод мягкого кислотного гидролиза был успешно использован для установления структур КПС благодаря кислотолабильности гликозидной связи, входящих в их состав производных 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот, а также ацетальных групп, что позволило упростить структуры некоторых полисахаридов. Например, с помощью мягкого кислотного гидролиза, который проводили 2% уксусной кислотой при 100 °С, модифицировали разветвленный КПС типа K218, превращая его в соответствующий линейный модифицированный полисахарид (МПС) за счет удаления боковых остатков производного псевдаминовой кислоты (Схема 1).

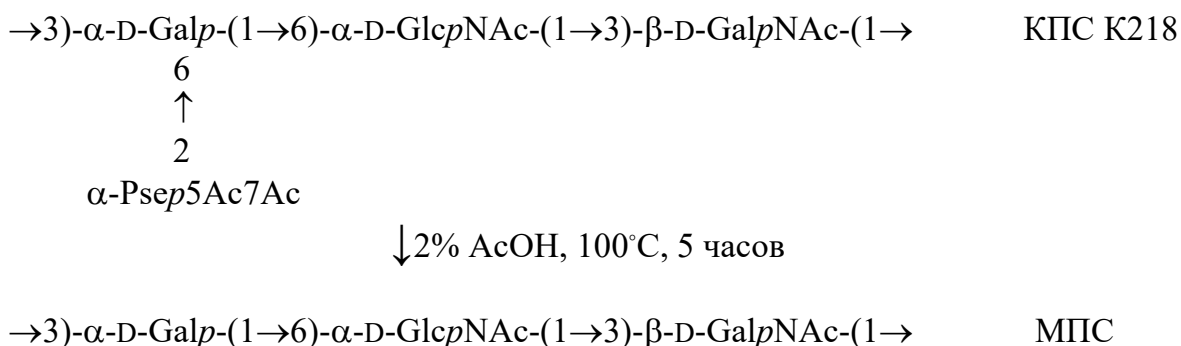


Схема 1. Кислотный гидролиз КПС *A. baumannii* K218.

В четырех КПС *A. baumannii* K20, K21, K82 и K98 присутствует ацеталь пировиноградной кислоты, который присоединяется к остатку Gal (КПС K20, K21 и K82) и GalNAc (КПС K98) в положения 4 и 6, образуя 1,3-диоксанный цикл (циклический ацеталь). При мягкой кислотной деградации КПС этот ацеталь частично расщеплялся, и в результате КПС терял свою регулярность. Для целей ЯМР-спектроскопического анализа полученный нерегулярный полисахарид полностью дезацеталировали путем гидролиза. Положение ацетала пировиноградной кислоты в исходном КПС определяли путем сравнения его спектров ЯМР со спектрами модифицированного полисахарида. В качестве примера приведена схема кислотного гидролиза полисахарида K98, содержащего ацеталь пировиноградной кислоты (Схема 2).

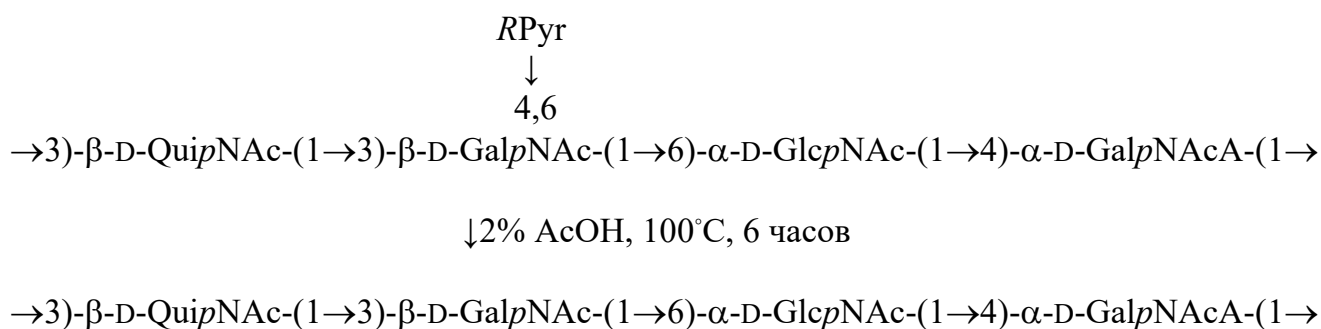


Схема 2. Кислотный гидролиз КПС *A. baumannii* K98.

Сольволиз трифторуксусной кислотой

Как и мягкий кислотный гидролиз, избирательное расщепление полисахаридов с помощью сольволиза безводными сильными кислотами основано на различной стабильности гликозидных связей, присутствующих в полисахариде, моносахаридных компонентов. Так, сольволиз трифторуксусной кислотой применялся для расщепления модифицированного КПС типа K8 (обозначен далее как K8*), образовавшегося в результате удаления из КПС бокового остатка легионаминовой кислоты. За 3 часа при 40°C из полисахарида K8* образовались олигосахариды, а в присутствии 2-метилпропанола – более удобные для выделения и идентификации изобутилгликозиды олигосахаридов [от трисахарида до гексасахарида 1-3 и выше]. Расщепление проходило по наиболее лабильной α -гликопиранозидной связи остатка FucNAc, который

превращался при этом в β -фуранозидную форму. Полученные гликозиды олигосахаридов **1-3** разделяли хроматографией на геле Fractogel TSK-HW 40S (Схема 3).

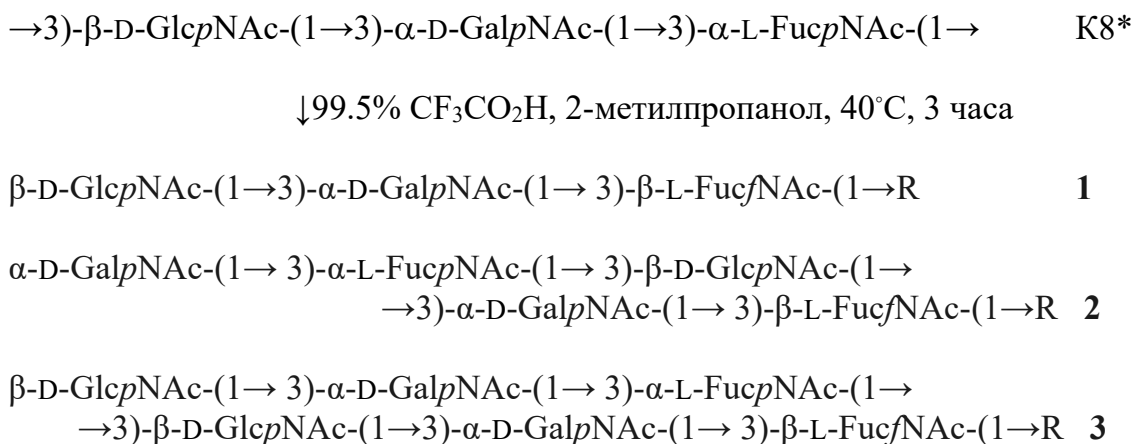


Схема 3. Сольволиз модифицированного КПС *A. baumannii* K8. R – изобутил.

О-деацетилирование

О-ацетильные группы в нестехиометрическом количестве присутствуют в трех исследованных КПС *A. baumannii* (K3, K26 и K46). Их наличие затрудняло отнесение спектров ЯМР из-за расщепления сигналов моносахаридов на несколько серий с различной интенсивностью. О-ацетильные группы удаляли в мягких щелочных условиях действием 12% раствора гидроксида аммония (37 °С, 16 часов). После отнесения сигналов в спектрах ЯМР О-деацетилированного полисахарида локализацию О-ацетильных групп в исходном КПС проводили путем сравнения спектров ЯМР О-деацетилированного и исходного полисахаридов с использованием известных закономерностей в эффектах О-ацетилировании.

Распад по Смитту

Распад по Смитту применялся для подтверждения структур КПС. Метод включает в себя исчерпывающее периодатное окисление свободных вицинальных гидроксильных групп, боргидридное восстановление образующегося полиальдегида в полигидроксильное производное и его избирательный кислотный гидролиз по ацетальным связям окисленных моносахаридов. Продукты выделяли с помощью гель-проникающей

хроматографии на геле TSK40 и анализировали с помощью одномерной и двумерной ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения. В результате в случае расщепления боковой цепи КПС получали модифицированный полисахарид, а в случае расщепления основной цепи – олигосахарид. Например, в результате расщепления КПС K106 был получен олигосахарид **4** при расщеплении остатка глюкозы со свободными гидроксильными группами при C3 и C4 (Схема 4).

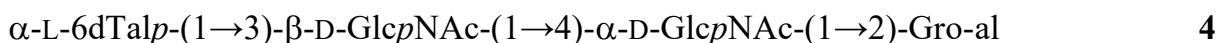
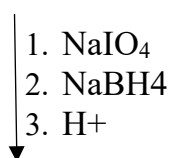
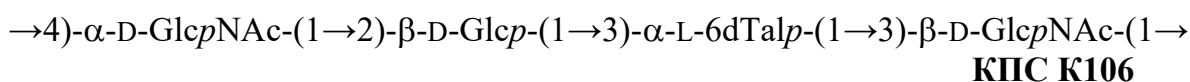


Схема 4. Распад по Смитсу полисахарида K106. Gro-al – глицеральдегид.

Масс-спектрометрия

Для определения молекулярной массы и тем самым подтверждения строения олигосахаридов, полученных после распада по Смитсу, сольволиза и расщепления фаговыми деполимеразами, использовалась масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением. В случае олигосахаридов, содержащих кислые компоненты, такие как производные нонулоновых или гексуриновых кислот, регистрировали отрицательные ионы, при анализе нейтральных олигосахаридов – отрицательные или положительные ионы.

ЯМР спектроскопия

Спектроскопия ^1H и ^{13}C ЯМР в настоящее время является важнейшим методом установления строения сложных углеводов, таких как олиго-, поли- или липополисахаридов. В спектроскопии ЯМР каждая структурная особенность оказывает влияние на резонансную частоту ядер и в следствии на величину химических сдвигов.

Одномерная спектроскопия ЯМР. Первым этапом спектрального анализа КПС являлось установление степени его регулярности. В спектрах ^1H ЯМР

интегральная интенсивность сигнала соответствует содержанию данного протона в исследуемом соединении. Нерегулярность образца КПС обычно связана с наличием в нестехиометрическом соотношении О-ацетильных, О-ацетальных заместителей или боковых моносахаридных остатков. Для установления природы такой нерегулярности КПС модифицировали химическими методами, удаляя соответствующие заместители. Природу, количество и место присоединения заместителя к молекуле КПС определяли путем сравнения спектров ЯМР образующегося регулярного МПС и исходного КПС.

С помощью анализа ^1H ЯМР спектров КПС получали первичную информацию о количестве моносахаридных остатков, присутствии необычных моносахаридов и неуглеводных заместителей. По числу сигналов аномерных протонов определяли размер повторяющегося звена. Их легко обнаружить в спектре, поскольку аномерные протоны дезэкранированы двумя атомами кислорода при аномерном атоме углерода и их сигналы смещены в более слабое поле (4.4–5.5 м.д.) по сравнению с химическими сдвигами сигналов других протонов в моносахаридных остатках. Поскольку в аномерной области протонного спектра могут появляться химические сдвиги протонов, связанных с углеродами при О-ацетатной группе, окончательный вывод о размере повторяющегося звена делался только после рассмотрения всех ЯМР экспериментов.

В спектроскопии сложных углеводов отнесение химических сдвигов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР осуществляют с помощью двумерной ЯМР спектроскопии. Спиновые системы каждого моносахарида в повторяющемся звене выявляли с помощью эксперимента COSY, в котором наблюдали корреляции соседних протонов каждого моносахаридного остатка. Эксперимент TOCSY использовали для выявления корреляций протонов в замкнутой спиновой системе каждого моносахарида в повторяющемся звене. Эксперименты COSY и TOCSY основаны на принципе переноса магнетизации. Он происходит наиболее эффективно между аксиальными протонами, поэтому

наиболее четкие корреляции выявляются у сахаров с *глюко*-конфигурацией и пиранозным циклом, в остальных случаях цепочка может обрываться. В связи с этим в спектре COSY могут, например, отсутствовать корреляции между H2 и H3 у моносахаридов с *манно*-конфигурацией, имеющих экваториальный протон H2 и КССВ $J_{2,3} < 2$ Гц.

Рассмотрим в качестве примера модифицированный полисахарид (МПС), полученный путем мягкого кислотного гидролиза КПС *A. baumannii* 52-249 (K218). В нем с помощью двумерных спектров $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY и $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY были выявлены три спиновые системы каждого моносахарида в повторяющемся звене МПС (α -Gal (**A**), α -GlcNAc (**B**), β -GalNAc (**C**)), находящиеся в пиранозной форме. Таким образом, можно было сделать вывод о том, что МПС содержит три различных моносахаридных остатка. Спектр $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY (рисунок 2) продемонстрировал следующие корреляции: H1/H2–H3 для остатка **C**, H1/H2–H4 для остатка **A** и H1/H2–H6 для остатка **B**. Остатки, для которых наблюдались корреляции H1 с H2–H4 или (в случае КССВ $J_{3,4} < 2$ Гц) H2–H3, были отнесены к моносахаридам с *галакто*-конфигурацией. Остаток **B**, характеризующийся корреляцией H1/H2–H6, был отнесен к моносахариду с *глюко*-конфигурацией.

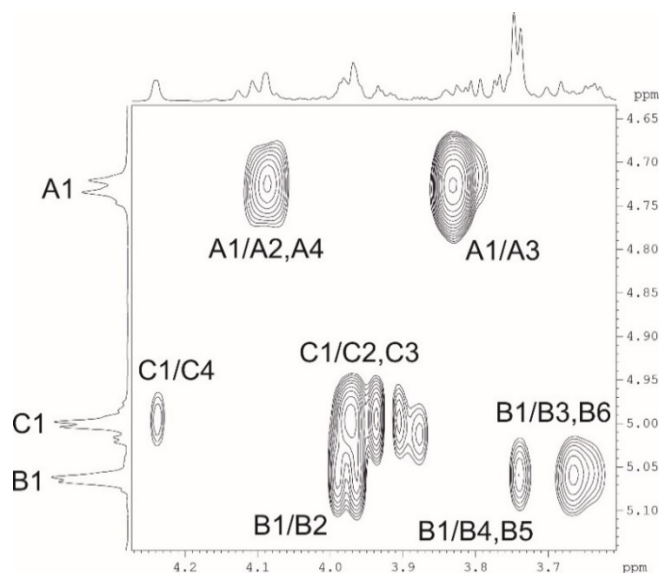


Рисунок 2. Фрагмент спектра $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY МПС *A. baumannii* 52-249 (K218) без псевдаминной кислоты.

Последовательность моносахаридных остатков в повторяющемся звене устанавливали с использованием ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в

спектрах ROESY. Этот эксперимент используется для выявления корреляций пространственно сближенных друг с другом протонов. С его помощью определяли также конфигурацию аномерного атома в каждом моносахаридом остатке. Так для моносахаридов с β -конфигурацией в спектре присутствовали корреляции аномерного протона H1 с H3 и H5, а для α -связанных моносахаридов – H1 с H2.

Эксперименты ЯЭО использовали также для определения типа N-заместителей аminosахаров на основании обнаружения в спектре пространственных корреляций их протонов с соответствующими NH-протонами моносахаридов, которые наблюдаются при съемке спектров в смеси H₂O/D₂O. Так, например, для определения положения N-ацильных заместителей спектр ¹H,¹H ROESY КПС B11911 со структурой, показанной на рисунке 3, снимали в смеси H₂O: D₂O (9:1) (рисунок 4), что позволило детектировать сигналы протонов, связанных с атомами азота. Сигналы трех протонов NH были обнаружены при δ_H 7.70, 7.82 и 7.93 м.д. и были отнесены к NH7 и NH5 псевдаминовой кислоты и NH2 галактозамина, соответственно, на основании корреляций с протонами CH псевдаминовой кислоты в спектре ¹H,¹H TOCSY: NH5/H-3акс,3экс,4,5 и NH7/H-6,7,8,9. Спектр ¹H,¹H ROESY выявил корреляции NH2 GalN и NH5 Pse с группами NAc при δ 7.93/2.03 и 7.82/2.02, соответственно, и NH7 Pse с H2 группы NHb (Hb – 3-гидроксипутаноил) при δ 7.70/2.35. Положение группы NHb подтверждалось кросс-пиком между H7 Pse и C1 NHb (CO группой) при δ 4.00/174.6 в спектре ¹H,¹³C HMBSC. Таким образом, в КПС присутствует Pse5Ac7RHb.

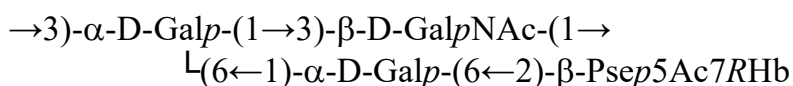


Рисунок 3. Структура КПС *A. baumannii* B11911 (K93). Hb – (R)3-гидроксипутаноил.

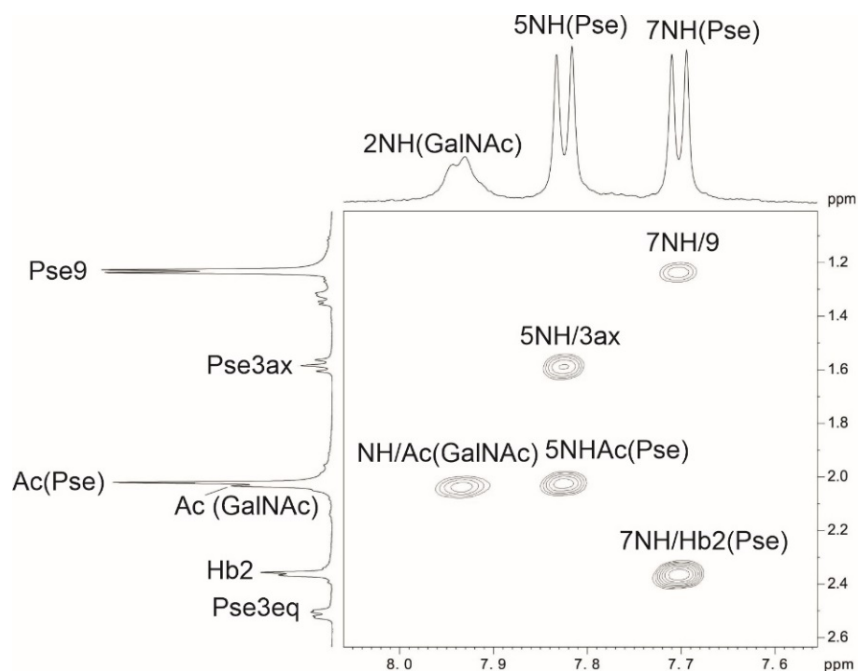


Рисунок 4. Фрагмент спектра ^1H , ^1H ROESY КПС *A. baumannii* B11911 (K93). Эксперимент проведен в смеси H_2O : D_2O (9:1).

При помощи гетероядерного эксперимента ^1H , ^{13}C HSQC проводили отнесение сигналов в ^1H и ^{13}C ЯМР спектрах по корреляциям химических сдвигов атомов углерода и связанных с ними протонов. В гетероядерном эксперименте ^1H , ^{13}C HMBC присутствовали корреляции атомов углерода и протонов, разделенных двумя или тремя связями, которые позволили подтвердить последовательность моносахаридов в повторяющемся звене и положение N-ацильных заместителей.

Характеристика генных кластеров

Анализ секвенированных генных кластеров различных K-типов выполнялся в сотрудничестве с австралийскими партнерами – микробиологами из Центра иммунологии и инфекционного контроля (Австралия, Брисбен). Для этого проводилось сравнение секвенированных генных кластеров с нуклеотидными последовательностями, представленными в доступной базе данных GenBank, с использованием онлайн программы BLAST и с учетом полученных данных о строении КПС.

Биосинтез КПС *A. baumannii* осуществляется по полимеразы-(Wzy)-зависимому пути, который начинается со сборки K-звена на липидном (ундекапренилдифосфатном) носителе, связанном с внутренней мембраной. В

этом процессе участвует иницирующая трансфераза Itr и гликозилтрансферазы, создающие специфические связи между моносахаридными компонентами. Затем продукт (К-звено, связанное с липидом) переносится транслоказой Wzx в периплазматическое пространство, где осуществляется полимеризация К-звена полимеразой Wzy, и готовый КПС затем переносится на клеточную поверхность с помощью белков Wza, Wzb и Wzc.

В генных кластерах биосинтеза КПС *A. baumannii* присутствовала общая для всех область, включающая гены экспорта капсулы (*wzc*, *wzb*, *wza*), гликозилтрансфераз, ген иницирующей трансферазы, полимеразы *wzy*, гены синтеза нуклеотид-активированных предшественников специфических компонентов КПС и другие. В генных кластерах КПС К8, К13, К46, К54, К73, К90 К93, К121 и К135 присутствовала группа генов, ответственная за синтез соответствующего производного нонулозоновой кислоты. Для всех изученных штаммов гены гликозилтрансфераз, найденные в генных кластерах, были отнесены по гомологии с помощью базы данных GenBank к гликозидным связям, в образовании которых они принимают участие.

Следует отметить, что химические методы исследования позволяют определить так называемое химическое повторяющееся звено КПС, в то время как изучение генного кластера КПС позволяет определить биологическое звено КПС. В качестве первого сахара в случае КПС *A. baumannii* чаще всего выступал моносахаридный остаток GalNAc, реже GlcNAc, FucNAc, QuiNAc4NAc и QuiNAc, что означает что биологическое звено, изученных в данной работе 25 структур КПС *A. baumannii*, начинается с этих моносахаридных остатков.

2. Состав и строение капсульных полисахаридов *Acinetobacter baumannii*

В результате проведенного исследования было установлено строение 25 новых структур КПС, представленные в Таблице 1. КПС *A. baumannii* К3, К8, К13, К20, К21, К24, К26, К46, К54, К57, К70, К73, К82, К90, К93, К98, К106, К112, К116, К127, К128, К135, К139, К144 и К218 построены из повторяющегося углеводного звена, включающего от 4 до 6 моносахаридных

остатков и имеющего как линейную, так и разветвленную структуру с боковой цепью. В боковой цепи присутствуют от 1 до 2 моносахаридных остатков (Таблица 1).

Наиболее часто в структурах КПС *Acinetobacter baumannii* встречаются остатки D-Glc, D-Gal, D-GlcNAc и D-GalNAc. Из гексасахаридов и гексааминосахаридов самыми редкими представителями являются D-Man, D-QuiNAc и ее производные (D-Qui4NAc, D-QuiNAc4NAc (**b**), D-QuiNAc4Hb (**d**)), L-6dTal (**a**) и L-6dTal4Ac. Довольно редко присутствуют кислые сахара (D-GlcA и D-GalA). Моносахариды в полисахаридах *A. baumannii* присутствуют исключительно в пиранозной форме. Остатки 6d-Tal (**a**), QuiNAc4NAc (**b**), GlcNAc3NAc4AcA (**c**) и QuiNAc4SHb (**d**) крайне редко встречаются в природе (Рисунок 1).

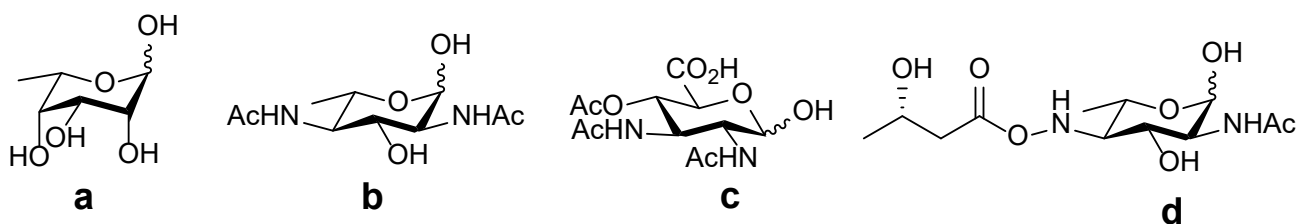


Рисунок 1. Редко встречающиеся в составе полисахаридов моносахариды, обнаруженные в составе КПС *A. baumannii*.

Некоторые полисахариды включают в себя неуглеводные компоненты, такие как O-ацетил (КПС KZ1098, NIPN329 и AB5001), (S/R)-3-гидроксибутаноил (КПС VAL097, A388, G21 и B11911) и (R)-ацеталь пировиноградной кислоты (КПС LUN5534, REV1184, G21 и A388). Последний обнаружен в положениях 4,6 моносахаридов, имеющих β -галакто конфигурацию (один случай β -GalN и три случая β -Gal). 3-Гидроксибутаноильная группа в двух случаях (КПС A388 и G21) присутствует в S-конфигурации при N4 QuiNAc4N и в двух случаях имеет R-конфигурацию при N7 легионаминовой и псевдаминовой кислот (КПС VAL097 и B11911, соответственно). O-Ацетильная группа присутствует в четырех полисахаридах в положении C4 остатков легионаминовой (Leg), псевдаминовой (Pse) кислот, GlcNAc3NAcA и 6dTal.

Отличительной особенностью КПС девяти типов *A. baumannii* (K8, K13, K46, K54, K73, K90, K93, K135 и K218), изученных в данной работе, является присутствие в их составе высших сахаров - изомеров 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновой кислоты. Они представляют собой семейство кислых кетоз, содержащих девять атомов углерода. У животных эти сахара отвечают за важные физиологические процессы, такие как клеточное распознавание и передачу сигнала между нейронами, а также за распространение метастазов раковых клеток по кровеносным сосудам. Они способствуют задержке иммунного ответа хозяина на патогенные бактерии за счет имитации последними паттерна гликозилирования хозяина. Типы *A. baumannii*, КПС которых содержат 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновые кислоты, приведены в Таблице 2.

Примечательно, что остаток нонулозоновой кислоты в КПС *A. baumannii*, описанных в данной работе, находится исключительно в боковой цепи полисахарида и замещается в 6 положение α -Gal в девяти случаях или α -GalNAc в случае двух КПС RCH52 и VAL097. В настоящей работе встречаются следующие производные нонулозоновой кислоты: псевдаминовая (Pse5Ac7Ac, L-глицеро-L-манно-конфигурация), легионаминовая (Leg5Ac7Ac, D-глицеро-D-галакто-конфигурация), ацинетаминная (Aci5Ac7Ac, L-глицеро-L-альтро), 8-эпиацинетаминная (8eAci5Ac7Ac, D-глицеро-L-альтро), а также 8-эпипсевдаминовая кислоты (Рисунок 2) (Таблица 2). Ацинетаминная кислота была впервые обнаружена в 2015 году в составе КПС штамма *A. baumannii* D36. В то время как C8-эпимер ацинетаминной кислоты (8eAci) был впервые обнаружен в составе КПС SGH0703 в 2017 году, структура которого установлена в настоящей работе. 8-Эпипсевдаминовая кислота была впервые обнаружена в КПС *A. baumannii* RES546 в настоящей работе.

Таблица 1. Структуры КПС *Acinetobacter baumannii*, установленные в данной работе.

К-тип	Штамм	Структура КПС
K3	AB5001	$\rightarrow 3)$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (4 \leftarrow 1)- β -D-GlcpNAc3NAcA4Ac
K8	BAL097	$\rightarrow 3)$ - α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (6 \leftarrow 2)- α -Legp5Ac7R R = Ac : (S)-3-гидроксипутаноил (~2.5:1)
K13	UMB001	$\rightarrow 4)$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-FucpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (6 \leftarrow 2)- α -Acip5Ac7Ac
K20	A388	$\rightarrow 2)$ - β -D-Galp4,6RPyр-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-QuipNAc4NR-(1 \rightarrow R = Ac : (S)-3-гидроксипутаноил (~1:1)
K21	G21	$\rightarrow 2)$ - β -D-Galp4,6RPyр-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- β -D-QuipNAc4NR-(1 \rightarrow R = Ac : (S)-3-гидроксипутаноил (~1:1)
K24	RCH51	$\rightarrow 3)$ - β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (3 \leftarrow 1)- β -D-Fucp3NAc
K26	KZ1098	$\rightarrow 2)$ - β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTalp4Ac-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (3 \leftarrow 1)- α -L-Rhap-(2 \leftarrow 1)- α -D-Glcp
K46	NIPH329	$\rightarrow 3)$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (6 \leftarrow 2)- β -Psep5Ac7Ac4Ac
K54	RCH52	$\rightarrow 4)$ - α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (6 \leftarrow 2)- α -Legp5Ac7Ac
K57	BAL212	$\rightarrow 3)$ - β -D-Quip4NAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (6 \leftarrow 1)- α -D-Glcp

K70	SGH807	$\rightarrow 3$)- α -D-GalpNAcA-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-FucpNAc-(1 \rightarrow L(4 \leftarrow 1)- α -L-FucpNAc
K73	SGH0703	$\rightarrow 4$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-FucpNAc-(1 \rightarrow L(6 \leftarrow 2)- α -8eAcip5Ac7Ac
K82	LUH5534	$\rightarrow 2$)- β -D-Galp4,6RPyr-(1 \rightarrow 3)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow
K90	LUH5553	$\rightarrow 3$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow L(6 \leftarrow 1)- α -D-Galp-(6 \leftarrow 2)- β -Psep5Ac7Ac
K93	B11911	$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow L(6 \leftarrow 1)- α -Galp-(6 \leftarrow 2)- β -Psep5Ac7RHb
K98	REV1184	$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc4,6RPyr-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpNAcA-(1 \rightarrow 3)- β -D-QuipNAc-(1 \rightarrow
K106	48-1789	$\rightarrow 4$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow
K112	MAR24	$\rightarrow 3$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow L(4 \leftarrow 1)- β -L-Rhap
K116	MAR303	$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow L(4 \leftarrow 1)- β -GalpNAc-(6 \leftarrow 1)- β -Glcp
K127	AB36- 1454	$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow L(6 \leftarrow 1)- β -GalpNAc-(6 \leftarrow 1)- β -Glcp
K128	KZ1093	$\rightarrow 4$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow L(6 \leftarrow 1)- β -GalpNAc-(6 \leftarrow 1)- β -Glcp
K139	MAR17- 1041	$\rightarrow 4$)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow L(6 \leftarrow 1)- β -D-Glcp
K144	46-1632	$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow

K135	RES546	$\rightarrow 3$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow L(6 \leftarrow 1)- α -D-Galp-(6 \leftarrow 2)- β -8ePsep5Ac7Ac
K218	52-249	$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow L(6 \leftarrow 2)- α -Psep5Ac7Ac

Таблица 2. Присутствие 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот в КПС различных типов *Acinetobacter baumannii*, установленных в данной работе.

Конфигурация	Аббревиатура	Тривиальное название	К-тип <i>A. baumannii</i>
L-глицеро-L-манно	Pse	Псевдаминовая кислота	K46, K90, K93, K218
D-глицеро-L-манно	8ePse	8-Эпипсевдаминовая кислота	K135
D-глицеро-D-галакто	Leg	Легионаминовая кислота	K8, K54,
L-глицеро-L-альтро	AcI	Ацинетаминовая кислота	K13
D-глицеро-L-альтро	8eAcI	8-Эпиацинетаминовая кислота	K73

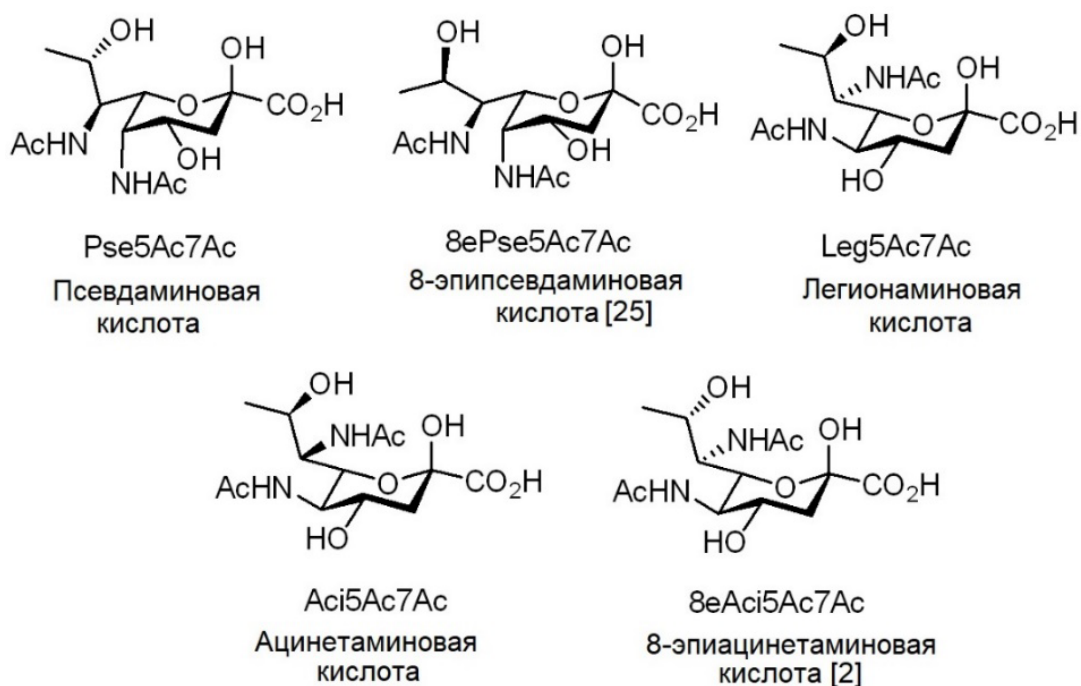


Рисунок 2. Производные нонулозоновых кислот, обнаруженные в составе КПС *A. baumannii*. 8-эпипсевдаминовая и 8-эпиацинетаминовая кислоты обнаружены впервые в природе в данной работе [2, 25].

Все исследованные выше КПС имеют уникальное строение, некоторые из них являются структурно родственными друг другу (Таблица 2). Во всех исследованных КПС с нонулозоновой кислотой, остаток кислоты присутствует исключительно в боковой цепи полисахарида. В случае КПС K8, K13, K46, K54,

K73 и K218 остаток нонулозоновой кислоты является единственным боковым остатком и замещается в основную цепь в остаток α -Gal (K13, K46, K73, K93 и K218) или α -GalNAc (K8 и K54). В КПС K90, K93 и K135 остатки β -Psep5Ac7Ac, β -Psep5Ac7Rnb и β -8ePsep5Ac7Ac входят в состав дисахаридной боковой цепи, включающей дополнительно остаток α -Gal, который замещается в основную цепь полисахарида $\alpha(1\rightarrow6)$ связью.

Расщепление капсульных полисахаридов *A. baumannii* с помощью фаговых и профаговых рекомбинантных деполимераз

КПС является первичным рецептором для большого числа бактериофагов *A. baumannii*, имеющих хвостовые шипы – белки, способные узнавать и деполимеризовать КПС. Для определения специфичности взаимодействия белков хвостовых шипов с КПС было изучено расщепление КПС *A. baumannii* рекомбинантными деполимеразами бактериофагов и деполимеразами, кодируемыми в профагах *A. baumannii*. Рекомбинантные деполимеразы были получены молекулярными биологами и микробиологами из ИБХ РАН и ФБУН ГНЦ ПМБ в рамках совместного исследовательского проекта.

Для расщепления использовали очищенные препараты КПС. Полученные при расщеплении олигосахариды исследовали методом масс-спектрометрии высокого разрешения с регистрацией отрицательных или положительных ионов и спектроскопии ^1H и ^{13}C ЯМР, включая двумерные эксперименты $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC. В результате в каждом случае были идентифицированы места расщепления в КПС и определен механизм деполимеризации (гидролиз или β -элиминирование).

Анализ масс-спектров полученных олигосахаридов показал, что они являются мономерами и/или олигомерами повторяющихся звеньев КПС. Моносахарид, находящийся на восстанавливаемом конце каждого олигосахариды, был идентифицирован благодаря появлению в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР сигналов его α - и β -аномеров. Эти данные позволили определить

гликозидную связь, которая была расщеплена деполимеразой. Конфигурации других гликозидных связей, положения замещения и последовательности моносахаридов в олигосахаридах были установлены с учетом опубликованных данных о структурах соответствующих КПС и подтверждены независимо путем анализа двумерных спектров ЯМР. В настоящей работе описано расщепление 15 КПС *A. baumannii* фаговыми и профаговыми деполимеразами.

Расщепление КПС *A. baumannii* B05 (K9), B8300 (K92), AYE (K1), AB5256 (K14), ACICU (K2), B11911 (K93), MAR303 (K116), AB5001 (K3), KZ1101 (K37), KZ1093 (K128), KZ1098 (K26), D4 (K16), RES2490 (K106), AB36-1454 (K127) и MAR55-66 (K86) приводило, главным образом, к образованию мономеров, димеров или тримеров К-звеньев. В Таблице 3 показаны места разрыва полисахаридной цепи. Один из фаговых белков являлся де-О-ацетилазой, и в результате обработки КПС KZ1098 этим белком был получен дезацетилированный полисахарид.

В качестве примера рассмотрено расщепление КПС *A. baumannii* D4. КПС представляет из себя трисахаридное повторяющееся звено, содержащее остатки β -D-Galp, β -Pse5Ac7Ac и β -D-GalpNAc. Обработка КПС деполимеразой gp47 фага APK16 привела к образованию мономера К-звена с разрывом связи между остатками β -D-Galp и β -D-GalpNAc (Схема 5). Строение олигосахарида **5** было подтверждено масс-спектрометрией высокого разрешения, где был обнаружен ион [M-H]⁻ m/z 862.3276 (расчетное значение m/z 862.3310), соответствующий мономеру К-звена полисахарида D4.

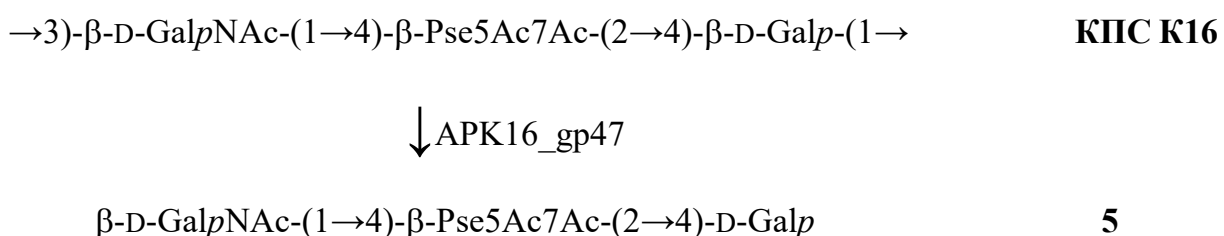


Схема 5. Расщепление КПС *A. baumannii* D4 фаговой деполимеразой APK16_gp47.

С помощью фаговых и профаговых деполимераз были получены олигосахариды разного моносахаридного состава и размера от трисахарида до генэйкосахарида (Таблица 3). В состав олигосахаридов входили разнообразные моносахариды, включая редко встречающиеся в природе, например, псевдаминую кислоту (КПС К16) (Схема 5). Таким образом, фаговые и профаговые деполимеразы можно рассматривать в химии углеводов как реагент, который используется в реакции в небольших количествах и приводит к образованию разнообразных олигосахаридов, некоторые из которых получить синтетически очень сложно.

В приведенном исследовании механизм действия всех деполимераз был гидролитическим. Деполимеразы gp43 фага APK2, gp44 фага APK116, gp45 фага APK128, gp47 фага APK16, gp49 фага APK37.1 привели к разрыву одинаковой связи β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp в КПС ACICU, B11911, MAR303, KZ1093, D4, AB5001 и KZ1101. Деполимераза gp41 фага Aristophanes привела к селективному разрыву β dGal \leftarrow 4OAc, что может рассматриваться в химии углеводов как избирательное дезацетилирование в нейтральных условиях (pH реакции 7.5) и может применяться в кислых полисахаридах, включающих уроновые кислоты, которые могут подвергаться β -элиминированию.

Таблица 3. Разрываемые связи в КПС при расщеплении рекомбинатными деполимеразами фагов и профагов.

Штамм <i>A. baumannii</i> (К тип)	Фаговая деполимераза	Разрываемая связь в КПС	Олигомеры
B05 (K9)	gp48 фага APK09	β -D-GlcpNAc-(1→3)- α -D-GalpNAcA	$[\alpha$ -D-GalpNAcA-(1→3)- α -L-FucpNAc-(1→3)- β -D-GlcpNAc] _n L(4←1)- α -L-FucpNAc n=2,3
B8300 (K83)	DpoB8300	α -L-Rhap-(1→3)- β -D-Galp	$[\beta$ -D-Galp-(1→4)- α -L-Rhap-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)- α -L-Rhap] _n L(3←1)- α -L-Rhap n=1,2
AYE (K1)	DpoAB5075	β -D-QuipNAc4R-(1→4)- α -D-GlcpNAc	$[\alpha$ -D-GlcpNAc-(1→4)- α -D-GalpNAcA-(1→3)- β -D-QuipNAc4NR] _n R = Ac : (S)-3-гидроксибутаноил (~1:1) n=1,2
Ab5256 (K14)	gp49 фага APK14	α -D-GalpNAc-(1→4)- β -D-GalpNAc	$[\beta$ -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→3)- α -D-GalpNAc] _n L(6←1)- β -D-Glcp n=1,2
ACICU (K2)	gp43 фага APK2	β -D-GalpNAc-(1→3)- β -D-Galp	$[\alpha$ -D-Galp-(1→3)- β -D-GalpNAc] _n L(6←1)- α -Glcp-(6←2)- β -Psep5Ac7Ac n=1,2
B11911 (K93)	gp43 фага APK2	β -D-GalpNAc-(1→3)- β -D-Galp	$[\alpha$ -D-Galp-(1→3)- β -D-GalpNAc] _n L(6←1)- α -Galp-(6←2)- β -Psep5Ac7RHb n=1,2
MAR303 (K116)	gp44 фага APK116	β -D-GalpNAc-(1→3)- β -D-Galp	$[\alpha$ -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→3)- β -D-GalpNAc] _n L(4←1)- β -GalpNAc-(6←1)- β -Glcp n=1,2
KZ1098 (K26)	gp41 фага Aristophanes	6dTal←4OAc	→2)- β -D-Manp-(1→4)- β -D-Glcp-(1→3)- α -L-6dTalp-(1→3)- β -D-GlcpNAc-(1→ L(3←1)- α -L-Rhap-(2←1)- α -D-Glcp

AB5001 (K3)	gp49 φara APK37.1	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp	$[\alpha$ -D-Galp-(1→6)- β -D-Glcp-(1→3)- β -D-GalpNAc] _n L(4←1)- β -D-GlcpNAc3NAcA4Ac(50%)	n=1,2
KZ1101 (K37)		β -D-GalpNAc-(1→4)- α -D-Galp	$[\alpha$ -D-Galp-(1→6)- β -D-Glcp-(1→3)- β -D-GalpNAc] _n L(4←1)- β -GalpNAc-(6←1)- β -Glcp	n=1,2,3
KZ1093 (K128)	gp45 φara APK128	β -D-GalpNAc-(1→4)- α -D-Galp	$[\alpha$ -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→3)- β -D-GalpNAc] _n L(6←1)- β -GalpNAc-(6←1)- β -Glcp	n=2
D4 (K16)	gp47 φara APK16	β -D-Galp-(1→3)- β -D-GalpNAc	β -GalpNAc-(1→4)- β -Psep5Ac7Ac-(2→4)- β -D-Galp	
RES2490 (K106)	gp50 φara APK106	β -D-GalpNAc-(1→4)- α -D-GlcpNAc	$[\alpha$ -D-GlcpNAc-(1→2)- β -D-Glcp-(1→3)- α -L-6dTalp-(1→3)- β -D-GlcpNAc] _n	n=1,2
Ab36-1454 (K127)	gp47 φara APK127v	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp	α -D-Galp-(1→6)- β -D-Glcp-(1→3)-D-GalpNAc L(6←1)- β -GalpNAc-(6←1)- β -Glcp	
MAR55-66 (K86)	gp49 φara APK86	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -L-Rhap	$[\alpha$ -L-Rhap-(1→2)- β -D-GlcpA-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)- β -D-GlcpNAc] _n L(2←1)- β -D-GlcpA-(4←1)- α -L-Rhap-(3←1)- α -L-Rhap	n=1,2,3

Выводы

1. Установлено строение 25 новых типов капсульных полисахаридов *Acinetobacter baumannii*. Все они имеют уникальное строение. Полученные данные являются химической основой для классификации штаммов этих бактерий, необходимой для диагностики вызываемых ими заболеваний и эпидемиологического мониторинга.
2. В составе капсульных полисахаридов *A. baumannii* обнаружено пять изомеров 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот (псевдаминовая, 8-эпипсевдаминовая, легионаминовая, ацинетаминовая и 8-эпиацинетаминовая кислоты).
3. Два из этих изомеров – 8-эпиацинетаминовая и 8-эпипсевдаминовая кислоты, имеющие *D-глицеро-L-альтро* и *D-глицеро-L-манно*-конфигурацию, соответственно, – впервые обнаружены и идентифицированы в природе в настоящей работе в составе КПС *A. baumannii* SGH0703 и RES546.
4. Показано соответствие установленных структур капсульных полисахаридов составу генных кластеров биосинтеза капсул, определены предположительные функции генов, участвующих в биосинтезе капсульных полисахаридов.
5. Изучено расщепление 15 капсульных полисахаридов *A. baumannii* рекомбинантными деполимеразами бактериофагов и профагов. Все они обладали гликозидазной активностью и расщепляли капсульные полисахариды по гидролитическому механизму.
6. Были выделены олигосахариды разного моносахаридного состава и размера, включающие от 3 до 21 моносахаридов. Некоторые олигосахариды включали такие редкие моносахаридные остатки как псевдаминовую кислоту, 6-дезокситалозу, 2,4-диаминохинавозу и уроновые кислоты.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. **A. A. Kasimova**, M. M. Shneider, N. P. Arbatsky, A.V. Popova, A. S. Shashkov, K. A. Miroshnikov, V. Balaji, I. Biswas, Y. A. Knirel. Structure and gene cluster of the K93 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* B11911 containing 5-N-acetyl-7-N-[(R)-3-hydroxybutanoyl]pseudaminic acid. *Biochemistry (Moscow)*. 2017, 82, 4, 483-489.
2. J. J. Kenyon, **A. A. Kasimova**, A. Notaro, N. P. Arbatsky, I. Speciale, A. S. Shashkov, C. De Castro, R. M. Hall, Y.A. Knirel. *Acinetobacter baumannii* K13 and K73 capsular polysaccharides differ only in K-unit side branches of novel non-2-ulosonic acids: di-N-acetylated forms of either acinetaminic acid or 8-epiacinetaminic acid. *Carbohydr. Res.*, 2017, 452, 149-155.
3. J. Kenyon, **A. Kasimova**, M. Shneider, A. Shashkov, N. Arbatsky, A. Popova, K. Miroshnikov, R. Hall, Y. Knirel. The KL24 gene cluster and a genomic island encoding a Wzy polymerase contribute genes needed for synthesis of the K24 capsular polysaccharide by the multiply antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* isolate RCH51. *Microbiology*, 2017, 163 (3), 355-363.
4. J.J. Kenyon, **A.A. Kasimova**, A.S. Shashkov, R.M. Hall, Y.A. Knirel. *Acinetobacter baumannii* isolate BAL_212 from Vietnam produces the K57 capsular polysaccharide containing a rarely occurring amino sugar N-acetylvirosamine. *Microbiology*, 2018, 164 (2), 217-220.
5. **A.A. Kasimova**, J.J. Kenyon, N.P. Arbatsky, A.S. Shashkov, A.V. Popova, Y.A. Knirel, R.M. Hall. Structure of the K82 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* LUH5534 containing a D-galactose 4,6-pyruvic acid acetal. *Biochemistry (Moscow)*, 2018, 83, 831-835.
6. **A.A. Kasimova**, J.J. Kenyon, N.P. Arbatsky, A.S. Shashkov, A.V. Popova, M.M. Shneider, Y.A. Knirel, R.M. Hall. *Acinetobacter baumannii* K20 and K21 capsular polysaccharide structures establish roles for UDP-glucose dehydrogenase Ugd2, pyruvyl transferase Ptr2 and two glycosyltransferases. *Glycobiology*. 2018, 28, 11, 876-884.
7. N. P. Arbatsky, J. J. Kenyon, **A. A. Kasimova**, A. S. Shashkov, M. M. Shneider, A.V. Popova, Y.A. Knirel, R.M. Hall. K units of the K8 and K54 capsular polysaccharides produced by *Acinetobacter baumannii* BAL 097 and RCH52 have the same structure but contain different di-N-acyl derivatives of legionaminic acid and are linked differently. *Carbohydr. Res.* 2019, 483, 107745.
8. J.J. Kenyon, N.P. Arbatsky, M.M. Shneider, A.V. Popova, A.S. Dmitrenok, **A.A. Kasimova**, A.S. Shashkov, R.M. Hall, Y.A. Knirel. The K46 and K5 capsular polysaccharides produced by *Acinetobacter baumannii* NIPH 329 and SDF have related structures and the side-chain non-ulosonic acids are 4-O-acetylated by phage-

encoded O-acetyltransferases. *PLoS One*, 2019, 14, e0218461.

9. S.N. Senchenkova, J.J. Kenyon, T. Jia, A.V. Popova, M.M. Shneider, **A.A. Kasimova**, A.S. Shashkov, B. Liu, R.M. Hall, Y.A. Knirel. The K90 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* LUH5553 contains di-N-acetylpsseudaminic acid and is structurally related to the K7 polysaccharide from *A. baumannii* LUH5533. *Carbohydr. Res.* 2019, 479, 1-5.

10. N.P. Arbatsky, **A.A. Kasimova**, A.S. Shashkov, M.M. Shneider, A.V. Popova, D.A. Shagin, A.A. Shelenkov, Y.V. Mikhailova, Y.G. Yanushevich, I.S. Azizov, M.V. Edelstein, R.M. Hall, J.J. Kenyon, Y.A. Knirel. Structure of the K128 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* KZ-1093 from Kazakhstan. *Carbohydr. Res.* 2019, 485, 107814.

11. A.S. Shashkov, S.M. Cahill, N.P. Arbatsky, A.C. Westacott, **A.A. Kasimova**, M.M. Shneider, A.V. Popova, D.A. Shagin, A.A. Shelenkov, Y.V. Mikhailova, Y.G. Yanushevich, M.V. Edelstein, J.J. Kenyon, Y.A. Knirel. *Acinetobacter baumannii* K116 capsular polysaccharide structure is a hybrid of the K14 and revised K37 structures. *Carbohydr. Res.* 2019, 484, 107774.

12. A.V. Popova, M.M. Shneider, N.P. Arbatsky, **A.A. Kasimova**, S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, A.S. Dmitrenok, A.O. Chizhov, Y.V. Mikhailova, D.A. Shagin, O.S. Sokolova, O.Y. Timoshina, R.S. Kozlov, K.A. Miroshnikov, Y.A. Knirel. Specific interaction of novel *Friunavirus* phages encoding tailspike depolymerases with corresponding *Acinetobacter baumannii* capsular types. *J. Virol.* 2021, 95, 5, e01714-20.

13. J.J. Kenyon, **A.A. Kasimova**, A.N. Sviridova, A.M. Shpirt, M.M. Shneider, Y.V. Mikhaylova, A.A. Shelenkov, A.V. Popova, A.V. Perepelov, A.S. Shashkov, A.S. Dmitrenok, A.O. Chizov, Y.A. Knirel. Correlation of *Acinetobacter baumannii* K144 and K86 capsular polysaccharide structures with genes at the K locus reveals the involvement of a novel multifunctional rhamnosyltransferase for structural synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 193 (Pt B), 1294-1300.

14. **A.A. Kasimova**, N.P. Arbatsky, O.Y. Timoshina, M.M. Shneider, A.S. Shashkov, A.O. Chizhov, A.V. Popova, R.M. Hall, J.J. Kenyon, Y.A. Knirel. The K26 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* KZ-1098: Structure and cleavage by a specific phage depolymerase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2021, 191, 182-191.

15. **A.A. Kasimova**, N.P. Arbatsky, J. Tickner, J.J. Kenyon, R.M. Hall, M.M. Shneider, A.A. Dzhaparova, A.S. Shashkov, A.O. Chizhov, A.V. Popova, Y.A. Knirel. *Acinetobacter baumannii* K106 and K112: Two Structurally and Genetically Related 6-Deoxy-l-talose-Containing Capsular Polysaccharides. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11, 5641.

16. O.Y. Timoshina, M.M. Shneider, P.V. Evseev, A.S. Shchurova, A.A. Shelenkov,

- Y.V. Mikhaylova, O.S. Sokolova, **A.A. Kasimova**, N.P. Arbatsky, A.S. Dmitrenok, Y.A. Knirel, K.A. Miroshnikov, A.V. Popova. Novel *Acinetobacter baumannii* bacteriophage Aristophanes encoding structural polysaccharide deacetylase. *Viruses*. 2021, 13, 9, 1688.
17. **A.A. Kasimova**, S.M. Cahill, A.M. Shpirt, A.G. Dudnik, M.M. Shneider, A.V. Popova, A.A. Shelenkov, Y.V. Mikhailova, A.O. Chizhov, J.J. Kenyon, Y.A. Knirel. The K139 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* MAR17-1041 belongs to a group of related structures including K14, K37 and K116. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021,193(Pt B), 2297-2303.
18. **A. A. Kasimova**, A. G. Dudnik, A. S. Shashkov, M. M. Shneider, A. Christofferson, A. A. Shelenkov, Y. V. Mikhailova, J. J. Kenyon, Y. A. Knirel. The K218 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* isolate 52-249 includes 5,7-di-N-acetylpsseudaminic acid linked by a KpsS3 glycosyltransferase. *Int J Biol Macromol.* 2022, 218, 310-316.
19. **A.A. Kasimova**, M.M. Shneider, M.V. Edelstein, A.A. Dzhaparova, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, J.J. Kenyon. Structure of the K98 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* REV-1184 containing a cyclic pyruvic acid acetal. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022, 218, 447-455.
20. N.P. Arbatsky, **A.A. Kasimova**, A.S. Shashkov, M.M. Shneider, A.V. Popova, D.A. Shagin, A.A. Shelenkov, Y.V. Mikhailova, Y.G. Yanushevich, R.M. Hall, Y.A. Knirel, J.J. Kenyon. Involvement of a phage-encoded Wzy protein in the polymerization of K127 units to form the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* isolate 36-1454. *Microbiol. Spectr.* 2022, 10, 3, e0150321.
21. Y.A. Knirel, **A.A. Kasimova**, N.P. Arbatsky, M.M. Shneider, A.V. Popova, F.A. Brovko, A.S. Shashkov, S.N. Senchenkova, A.V. Perepelov, A.M. Shpirt. 5,7-Diamino-3,5,7,9-tetraoxynon-2-ulosonic Acids in the Capsular Polysaccharides of *Acinetobacter baumannii*. *Biochemistry (Moscow)*. 2023, 88, 2, 202-210.
22. O.Y. Timoshina, **A.A. Kasimova**, M.M. Shneider, N.P. Arbatsky, A.S. Shashkov, A.A. Shelenkov, Y.V. Mikhailova, A.V. Popova, R.M. Hall, Y.A. Knirel, J.J. Kenyon. Loss of a branch sugar in the *Acinetobacter baumannii* K3-type capsular polysaccharide due to frameshifts in the *gtr6* glycosyltransferase gene leads to susceptibility to phage APK37.1. *Microbiol. Spectr.* 2023, 11, 1, e0363122.
23. O.Y. Timoshina, **A.A. Kasimova**, M.M. Shneider, I.O. Matyuta, A.Y. Nikolaeva, P.V. Evseev, N.P. Arbatsky, A.S. Shashkov, A.O. Chizhov, A.A. Shelenkov, Y.V. Mikhaylova, P.V. Slukin, N.V. Volozhantsev, K.M. Boyko, Y.A. Knirel, K.A. Miroshnikov, A.V. Popova. *Friunavirus* phage-encoded depolymerases specific to different capsular types of *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 10, 9100.
24. **A.A. Kasimova**, N.S. Sharar, S.J. Ambrose, Y.A. Knirel, M.M. Shneider, O.Y.

Timoshina, A.V. Popova, A.V. Perepelov, A.S. Dmitrenok, L.Y. Hsu, R.M. Hall, J.J. Kenyon. The *Acinetobacter baumannii* K70 and K9 capsular polysaccharides consist of related K-units linked by the same Wzy polymerase and cleaved by the same phage depolymerases. *Microbiol Spectr.* 2023, 11(6), e0302523.

25. A. S. Shashkov, **A. A. Kasimova**, N. P. Arbatsky, S. N. Senchenkova, A. V. Perepelov, A. S. Dmitrenok, A. O. Chizhov, Y. A. Knirel, M. M. Shneider, A. V. Popova, J. J. Kenyon, Complete chemical structure of the K135 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* RES-546 that contains 5,7-di-N-acetyl-8-epipseudaminic acid. *Carbohydr. Res.* 2023, Volume 523,2023,108726, ISSN 0008-6215.

26. **А.А. Касимова**, М.М. Шнейдер, Н.П. Арбатский, Ю.А. Книрель, Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*: строение и расщепление фаговыми деполимеразами, *XVII Всероссийская школа-конференция «Актуальные проблемы химии и биологии»*, 4-9 сентября 2017, Владивосток, Россия, с. 33.

27. **А.А. Kasimova**, N.P. Arbatsky, A.V. Popova, M.M. Schneider, Y.A. Knirel, Capsular polysaccharides of *Acinetobacter baumannii*: structure and cleavage by phage depolymerases, *29th International Carbohydrate Symposium*, 14-19 July 2018, Lisbon, Portugal. P-A14.

28. **А.А. Kasimova**, N.P. Arbatsky, A.V. Popova, M.M. Schneider, Y.A. Knirel, Capsular polysaccharides of *Acinetobacter baumannii*: structure and cleavage by phage depolymerases. *20th European Carbohydrate Symposium*, 30 June–5 July 2019, Leiden, The Netherlands. P. 143.

29. **А.А. Касимова**, М.М. Шнейдер, Н.П. Арбатский, Ю.А. Книрель, Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*: строение и расщепление фаговыми деполимеразами, *VI Съезд биохимиков России 2019*, 1-6 октября, Сочи-Дагомыс, Россия, с. 273.

30. **А.А. Касимова**, М.М. Шнейдер, А.А. Шпирт, С.Н. Сенченкова, Н.П. Арбатский, Ю.А. Книрель, Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*: строение и расщепление фаговыми деполимеразами, *VII Съезд биохимиков России*, 3-7 октября 2022, Сочи, Россия, с. 49-50.

31. **А.А. Касимова**, М.М. Шнейдер, А.А. Шпирт, С.Н. Сенченкова, Н.П. Арбатский, Ю.А. Книрель, Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*: строение и расщепление фаговыми деполимеразами, *Фундаментальная гликобиология*, 11-15 сентября 2023, Мурманск, Россия, с. 94.