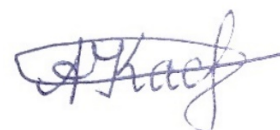


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. Н. Д. ЗЕЛИНСКОГО
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Касимова Анастасия Алексеевна

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

Специальность 1.4.9 – Биоорганическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Книрель Юрий Александрович

Москва - 2024

Оглавление

Список используемых сокращений.....	4
Введение.....	7
2. Литературный обзор	11
2.1. Краткая характеристика микроорганизма <i>Acinetobacter baumannii</i>	11
2.1.1. Капсульный полисахарид (КПС) <i>A. baumannii</i>	13
2.1.2. Липоолигосахарид <i>A. baumannii</i>	19
2.2. Общие сведения о бактериофагах	23
2.2.1. Деполимеразы бактериофагов	28
2.2.2. Применение бактериофагов	31
Применение бактериофагов в животноводстве	31
Использование бактериофагов в агрономии	34
Бактериофаги в пищевой промышленности.....	37
Использование бактериофагов для лечения людей.....	40
Бактериофаговая терапия, направленная на борьбу с <i>A. baumannii</i>	43
2.3. Заключение по литературному обзору.....	49
3. Результаты и их обсуждение.....	51
3.1. Структурный анализ КПС	51
3.2. Состав и строение КПС <i>A. baumannii</i>	68
3.3. Структуры КПС <i>A. baumannii</i>	77
3.3.1. КПС <i>A. baumannii</i> , содержащие нон-2-улозоновые кислоты	77
КПС <i>A. baumannii</i> 52-249 (K218)	80
КПС <i>A. baumannii</i> B11911 (K93).....	91
КПС <i>A. baumannii</i> SGH0703 (K73) и UMB001 (K13)	97
КПС <i>A. baumannii</i> BAL097 (K8) и RCH52 (K54).....	104
КПС <i>A. baumannii</i> NIPH329 (K46)	110
КПС <i>A. baumannii</i> LUH5553 (K90)	113
КПС <i>A. baumannii</i> RES546 (K135)	116
3.3.2. КПС <i>A. baumannii</i> , содержащие дезоксипиранозиды.....	121
КПС <i>A. baumannii</i> SGH807 (K70)	121

КПС <i>A. baumannii</i> RCH51 (K24)	125
КПС <i>A. baumannii</i> BAL212 (K57).....	128
КПС <i>A. baumannii</i> 46-1632 (K144)	129
КПС <i>A. baumannii</i> KZ1098 (K26)	134
КПС <i>A. baumannii</i> 48-1789 (K106) и MAR24 (K112)	138
КПС <i>A. baumannii</i> A388 (K20) и G21 (K21)	143
КПС <i>A. baumannii</i> REV1184 (K98).....	150
3.3.3. КПС <i>A. baumannii</i> , состоящие из гекса- и гексааминопираниозидов	155
3.4. Расщепление КПС с помощью фаговых и профаговых деполимераз	157
4. Экспериментальная часть	177
4.1. Выделение КПС	177
4.2. Гель-проникающая хроматография.....	178
4.3. Определение состава КПС	178
4.3.1. Анализ моносахаридов методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов.....	178
4.3.2. Определение абсолютных конфигураций компонентов	179
4.4. Модификация КПС	179
4.4.1. Мягкий кислотный гидролиз	179
4.4.2. О-дезацетилирование	180
4.4.3. О-дезацеталирование	180
4.4.4. Распад по Смитту	180
4.4.5. Сольволиз.....	180
4.5. Расщепление КПС рекомбинантными деполимеразами.....	180
4.6. Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением	181
4.7. Спектроскопия ЯМР	181
4.8. Биоинформатический анализ	182
Выводы	183
Список литературы	190
Приложение	217

Список используемых сокращений

COSY	– корреляционная спектроскопия (COrrelation SpectroscopY)
ESKAPE	– <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и представители рода <i>Enterobacter</i>
Gtr	– гликозилтрансфераза
HMBC	– гетероядерная мультисвязевая корреляция (Heteronuclear Multi-Bond Correlation)
HSQC	– гетероядерная одноквантовая когеренция (Heteronuclear Single-Quantum Coherence)
Itr	– иницилирующая трансфераза
KL	– генный капсульный локус
Ppm	– миллионная доля
ROESY	– спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)
TOCSY	– полная корреляционная спектроскопия (TOtal Correlation SpectroscopY)
UndP	– ундекапренилфосфат
UndPP	– ундекапренилдифосфат
UND	– уридиндифосфат
Wzx	– флиппаза
Wzy	– полимераза
Wzz	– регулятор длины цепи
Акс/ах	– аксиальный
ГЖХ	– газо-жидкостная хроматография
Гц	– герц
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЭР МС	– масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением
КПС	– капсульный полисахарид

КССВ	– константа спин-спинового взаимодействия
ЛОС	– липоолигосахарид
ЛПС	– липополисахарид
м.д.	– миллионная доля
МПС	– модифицированный полисахарид
ОС	– олигосахарид
РНК	– рибонуклеиновая кислота
Экв/eq	– экваториальный
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
ЯЭО	– ядерного эффекта Оверхаузера

Моносахариды, аминокислоты и неуглеводные компоненты

Пентозы

Rib – рибоза

Гексозы и 6-дезоксигексозы

6dTal – 6-дезокситалоза

Fuc – фукоза (6-дезоксигалактоза)

Gal – галактоза

Glc – глюкоза

Man – манноза

Qui – хиновоза (6-дезоксиглюкоза)

Rha – рамноза (6-дезоксиманноза)

Аминосахара

Fuc3N – 3-аминофукоза (3-амино-3,6-дезоксигалактоза)

FucN – фукозамин (2-амино-2,6-дезоксигалактоза)

GalN – галактозамин (2-амино-2-дезоксигалактоза)

GlcN – глюкозамин (2-амино-2-дезоксиглюкоза)

ManN – маннозамин (2-амино-2-дезоксиманноза)

Qui4N – 4-аминохиновоза (4-амино-4,6-дезоксиглюкоза)

QuiN – хиновозамин (2-амино-2,6-дезоксиглюкоза)

RhaN – рамнозамин (2-амино-2,6-дезоксиманноза)

Гексуроновые и гексуроновые кислоты

GalA – галактуроновая кислота

GalNA – 2-амино-2-дезоксигалактуроновая кислота

GlcA – глюкуроновая кислота

GlcNA – 2-амино-2-дезоксиглюкуроновая кислота

Октулозоновые кислоты

Kdo – 3-дезоксид-манно-окт-2-улозоновая кислота

Нонулозоновые кислоты

8eAci5Ac7Ac – 8-эпиацинетаминовая кислота (5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-Д-глицеро-Л-альтро-нон-2-улозоновая кислота)

Pse5Ac7Ac – псевдааминовая кислота (5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-Л-глицеро-Л-манно-нон-2-улозоновая кислота)

8ePse5Ac7Ac – 8-эпипсевдааминовая кислота (5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-Д-глицеро-Л-манно-нон-2-улозоновая кислота)

Leg5Ac7Ac – легионаминовая кислота (5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-Д-глицеро-Д-галакто-нон-2-улозоновая кислота)

Aci5Ac7Ac – ацинетаминовая кислота (5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-Л-глицеро-Л-альтро-нон-2-улозоновая кислота)

Полиолы

Gro – глицерин

Gro-al – глицериновый альдегид

Ацильные группы – заместители аминогрупп аминсахаров

3Nb – 3-гидроксидбутаноил

Ac – ацетил

Rug – ацеталь пировиноградной кислоты

Аминокислоты

Ala – аланин

Введение

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 [1,2].

Проблема широкого распространения *A. baumannii* в условиях больничной среды обостряется возникновением у данного вида микроорганизма резистентности к антибиотикам, которая вызвана, с одной стороны, необоснованным и неограниченным их применением, а с другой - способностью микроорганизма быстро приспосабливаться к неблагоприятным условиям среды [2]. 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-ому 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*. Что позволяет фаговым частицам проникать через защитный капсульный слой бактерий, адсорбироваться на поверхности клетки и вводить внутрь нее свой генетический материал [3].

Цель работы:

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

Задачи исследования:

1. Выделение и изучение строения капсульных полисахаридов новых типов *Acinetobacter baumannii* с помощью химических методов исследований в совокупности с данными 1D и 2D ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения;
2. Анализ генных кластеров биосинтеза капсул и демонстрация их соответствия установленным структурам капсульных полисахаридов;
3. Изучение продуктов расщепления капсульных полисахаридов фаговыми и профаговыми деполимеразами;

Публикации на тему диссертации:

Результаты работы опубликованы в 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».

Апробация результатов исследования:

Результаты работы были представлены автором на трех международных и трех всероссийских конференциях. Работа удостоена золотой медали РАН для студентов в 2020 году.

Объем и структура работы:

Диссертационная работа содержит список условных обозначений, введение, литературный обзор, обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы, список литературы и приложение. Диссертация содержит 118 рисунков и 28 таблиц. Объем диссертации составляет 240 страниц. Библиография насчитывает 246 литературных ссылок.

Личный вклад автора

Соискатель самостоятельно проводил все химические эксперименты, включая выделение КПС, анализ моносахаридного состава, модификацию и избирательное расщепление КПС, интерпретацию данных ЯМР и масс-спектров, обработку КПС фаговыми деполимеразами, выделение и интерпретацию продуктов расщепления. 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.

Диссертационная работа выполнена в № 21 лаборатории химии углеводов и биоцидов ИОХ РАН в сотрудничестве с молекулярными биологами и микробиологами из ИБХ РАН, ФБУН ГНЦ ПМБ и австралийскими коллегами из Центра иммунологии и инфекционного контроля Австралия, Брисбен. Рекомбинантные фаговые и профаговые деполимеразы были получены сотрудниками Института биоорганической химии РАН к.б.н. Шнейдером М.М. и Тимошиной О.Ю. и к.б.н. Поповой А.В. из ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

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 также мужу Трифонову А. Л. за поддержку.

2. Литературный обзор

Данный литературный обзор 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.

2.1. Краткая характеристика микроорганизма *Acinetobacter baumannii*.

A. baumannii – неферментирующая грамотрицательная аэробная коккобацилла (Рисунок 1), которая является одним из наиболее значимых внутрибольничных патогенов, вызывающих пневмонию, менингит, бактериемию и ряд других заболеваний, опасных для пациентов с ослабленной иммунной системой.

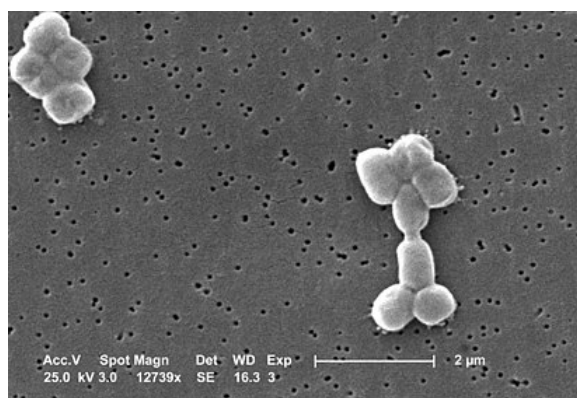


Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия клеток *A. baumannii* [2].

Микроорганизм *Acinetobacter baumannii* был впервые выделен из почвы голландским бактериологом Beijerinck в 1911 году и описан как *Micrococcus calcoaceticus* [4]. В последующие 50 лет эта бактерия была выделена многократно разными учеными и имела разные названия, такие как *Moraxella lwoffii*, *Alcaligenes hemolysans*, *Mirococcus calco-aceticus* и *Herellea vaginicola*. Спустя четыре десятилетия Brisou и Prevot намеревались включить ее в род *Achromobacter*, основываясь на ее неспособности двигаться и отсутствии пигментации, однако в 1968 году Baumann и соавторы объединили все подобные изоляты в один род *Acinetobacter*, который четыре года спустя был принят комитетом по таксономии *Moraxella* и *Allied Bacteria* [5]. В 1986 году, основываясь на сходстве ДНК, Bouvet

и Grimont распределили представителей этого рода в 12 групп [6]. В настоящее время виды *Acinetobacter* таксономически классифицируются как γ -протеобактерии отряда *Pseudomonadales* семейства *Moraxellaceae* [7]. Согласно таксономическому справочнику NamesForLife, предложенному Университетом Штата Мичиган в качестве альтернативы классификатору Берджи и содержащему номенклатуру эубактерий и архебактерий, род *Acinetobacter* включает в себя 68 видов бактерий: *A. calcoaceticus*, *A. albensis*, *A. apis*, *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. beijerinckii*, *A. bereziniae*, *A. bohemicus*, *A. boissieri*, *A. bouvetii*, *A. brisouii*, *A. celticus*, *A. chinensis*, *A. colistiniresistens*, *A. courvalinii*, *A. cumulans*, *A. defluvii*, *A. dijkshoorniae*, *A. dispersus*, *A. equi*, *A. gandensis*, *A. gernerii*, *A. grimontii*, *A. guangdongensis*, *A. guillouiae*, *A. gyllenbergii*, *A. haemolyticus*, *A. halotolerans*, *A. harbinensis*, *A. indicus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. kookii*, *A. lactucae*, *A. larvae*, *A. lwoffii*, *A. modestus*, *A. nectaris*, *A. nosocomialis*, *A. pakistanensis*, *A. parvus*, *A. piscicola*, *A. pittii*, *A. populi*, *A. pragensis*, *A. proteolyticus*, *A. pseudolwoffii*, *A. puyangensis*, *A. qingfengensis*, *A. radioresistens*, *A. rudis*, *A. schindleri*, *A. seifertii*, *A. sichuanensis*, *A. soli*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. ursingii*, *A. variabilis*, *A. venetianus*, *A. vivianii*, *A. wuhouensis*, а также неутвержденные виды *A. kyonggiensis*, *A. oleivorans*, *A. pediculi*, *A. plantarum* и *A. refrigeratorensis* [8].

Род бактерий *Acinetobacter* вызывает растущий интерес в научном сообществе и, в частности, в смежных областях биомедицинских наук. Как следствие, число опубликованных исследовательских работ, найденных в базе данных PubMed по теме «*Acinetobacter*», увеличивается каждый год. Причина интереса кроется в значительной роли *Acinetobacter* в колонизации и инфицировании пациентов в больницах по всему миру, наряду с появлением мультирезистентных штаммов, устойчивых сразу к нескольким противомикробным препаратам [9-11]. *A. baumannii* устойчив к карбапенему, колистину, тигециклину и другим клинически используемым антибиотикам [12-14]. Данный микроорганизм входит в группу патогенов ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и представители рода *Enterobacter*), для которых

характерны широкий спектр природной и приобретенной антибиотикорезистентности, что осложняет лечение инфицированных ими пациентов. Во время эпидемии COVID-19 в 2020-2021 годах было показано, что пациенты, находящиеся на лечении с использованием различных медицинских приборов (ИВЛ, ИКМО), часто также приобретали инфекции, вызванные *A. baumannii* [15].

2.1.1. Капсульный полисахарид *A. baumannii*.

Важным фактором вирулентности *A. baumannii* является капсульный полисахарид (КПС), который образует толстый защитный слой (капсулу) вокруг бактериальной клетки (Рисунок 2). Наиболее важным свойством КПС является его антигенность. Антигеном принято называть любое чужеродное для данного организма высокомолекулярное вещество, которое при попадании в организм вызывает у него ответную реакцию, проявляющуюся, в частности, в образовании специфических белков - антител.

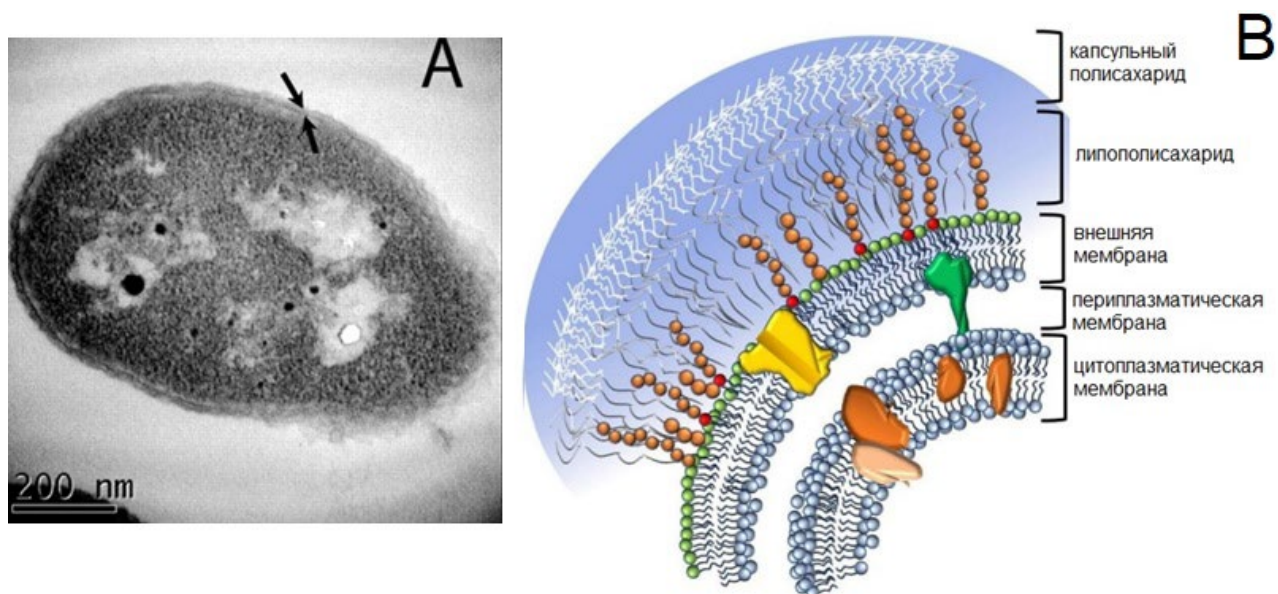


Рисунок 2. А. Электронная микрофотография клетки *A. baumannii*, стрелками показана капсула, состоящая из КПС [16]. В. Строение клеточной стенки грамотрицательной бактерии [17].

КПС является основным поверхностным К-антигеном *A. baumannii*, повторяющееся звено КПС, в следствии этого, обозначается как К-звено. Он включает специфические углеводные участки (эпитопы), против которых

направлен иммунный ответ хозяина. Структуры КПС отличаются широким разнообразием вследствие полиморфизма генного капсульного локуса (KL-локуса), который включает гены, кодирующие ферменты, ответственные за синтез и экспрессию капсулы (инициирующую трансферазу, гликозилтрансферазы, флиппазу, полимеразу, транслоказу и другие). Это структурное разнообразие позволяет бактериям избегать действия специфического иммунного ответа организма хозяина [18].

До начала данного исследования, в которое входит структурный анализ 25 новых К-типов КПС *A. baumannii*, были известны структуры 41 К-типа КПС *A. baumannii*, включая К1 [19], К2 [20], К4 [21], К5 [22], К6 [23], К7 [24], К11 [25], К12 [26], К14 [27], К15 [28], К16 [29], К17 [30], К19 [31], К22 [32], К25 [33], К27 [34], К30 [35], К32 [36], К33 [37], К35 [28], К37 [38], К39 [39], К42 [40], К43 [41], К44 [34], К45 [35], К47 [41], К48 [35], К49 [42], К53 [43], К55 [44], К63 [45], К74 [44], К83 [25], К85 [44], К86 [46], К87 [47], К88 [41], К89 [48], К91 [49], К92 [50]. В состав полисахаридов входят как широко распространенные в природе моносахариды (галактоза, глюкоза, глюкозамин, глюкуроновая кислота и другие), так и редкие, например, в КПС *A. baumannii* К17 в боковой цепи присутствует остаток D-аланин (D-Ala) в 6 положении остатка галактозаминуроновой кислоты (GalNAcA) (Рисунок 3) [30]. На данный момент это единственный случай обнаружения аминокислотного остатка в составе КПС *A. baumannii*.

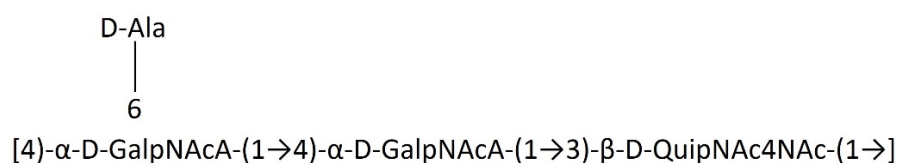


Рисунок 3. Структура повторяющегося звена КПС *A. baumannii* К17 [30].

Структура КПС *A. baumannii* К35 включает три остатка галактозаминуроновой кислоты (GalNAcA) в основной цепи полисахарида, а также редко встречающийся остаток диаминохиनावомина (QuiNAc4NAc). Повторяющееся звено КПС необычно так же присутствием О-ацетильных групп в остатках GalNAcA в положениях 3 и 4 (Рисунок 4) [28]. О-ацетильные группы в

составе КПС *A. baumannii* встречаются достаточно редко, в данном случае почти вся цепь КПС О-ацетилирована.

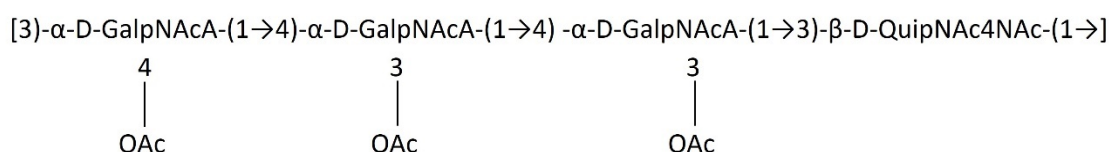


Рисунок 4. Структура повторяющегося звена КПС *A. baumannii* K35 [28].

В составе повторяющегося звена КПС *A. baumannii* K42 присутствует D-рибоза (D-Rib), на данный момент это единственный случай, когда в составе КПС *A. baumannii* присутствует пентосахарид. D-рибоза в составе КПС K42 находится в основной дисахаридной цепи, в 4 положение которой входит остаток псевдаминовой кислоты (Pse5Ac7RHb) (Рисунок 5) [40].

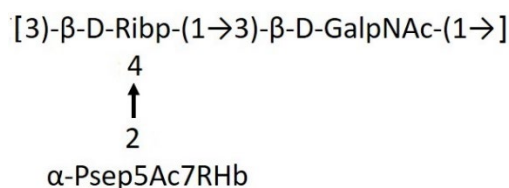


Рисунок 5. Структура повторяющегося звена КПС *A. baumannii* K42 [40].

Довольно редко в составе природных полисахаридов обнаруживаются остатки маннозаминуруновой кислоты (ManNAcA), которые в составе КПС K91 присутствуют в основной цепи линейного полисахарида. Оба остатка представлены в β -конфигурации и гликозилированы в 4 положение (Рисунок 6) [49].

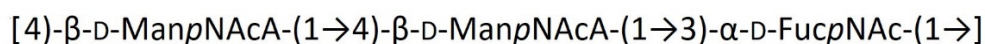


Рисунок 6. Структура повторяющегося звена КПС *A. baumannii* K91 [49].

В состав повторяющегося звена КПС *A. baumannii* входят обычно от 3 до 8 моносахаридных остатков. КПС K55 на данный момент является единственным представителем, обладающим октасахаридным повторяющимся звеном. В состав

Псевдаминовая кислота (Pse) и легионаминовая кислота (Leg) являются наиболее распространенными высшими моносахаридами в составе КПС *A. baumannii*. Реже встречаются 8-эпилегионаминовая (8eLeg) и ацинетаминовая (Aci) кислоты (Таблица 2) (Рисунок 8).

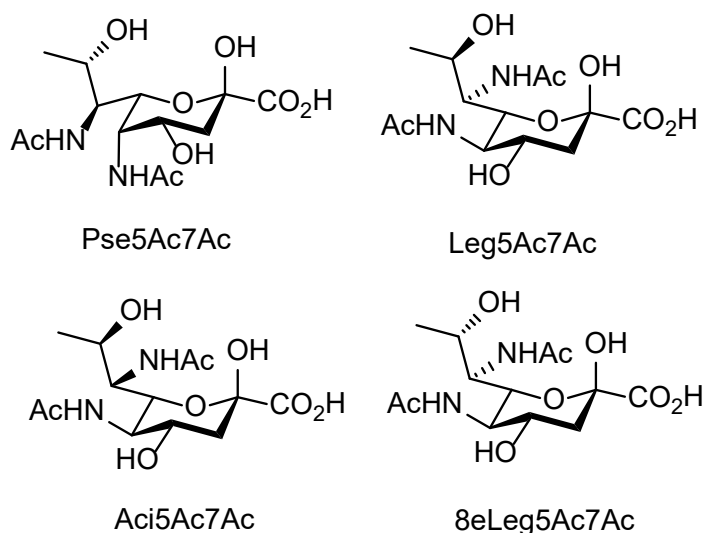


Рисунок 8. Производные нонулоновых кислот, обнаруженные в составе КПС *A. baumannii*.

Таблица 2. Нонулоновые кислоты в КПС *Acinetobacter baumannii*.

Тривиальное название и аббревиатура	Конфигурация	Впервые найден в бактериях	Присутствует в КПС К-типа <i>Acinetobacter baumannii</i>
Псевдаминовая кислота, Pse	L-глицеро-L-манно	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K2, K6, K16, K33, K42
Легионаминовая кислота, Leg	D-глицеро-D-галакто	<i>Legionella pneumophila</i>	K5, K7, K27, K63
8-Эпилегионаминовая кислота, 8eLeg	L-глицеро-D-галакто	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K49
Ацинетаминовая кислота, Aci	L-глицеро-L-альтро	<i>Acinetobacter baumannii</i>	K12

Как и другие специфические полисахариды бактерий, КПС *A. baumannii*, содержащие нонулоновые кислоты, построены из повторяющихся олигосахаридных звеньев (К-звеньев), размер которых варьируется от трисахаридных до пентасахаридных. Большинство полисахаридов являются разветвленными, но нередки и линейные полимеры, например, такие, как КПС

типов K6, K16, K33 (все включают Pse) [23, 29, 37], K49 и K63 (включают 8eLeg и Leg, соответственно) [42, 45]. Наиболее длинная основная цепь K-звена – тетрасахарид. Наиболее типичным K-звеном является разветвленный тетрасахарид с одним моносахаридным или дисахаридным ответвлением (топология 3+1 или 2+2, соответственно). Остаток нонулозоновой кислоты может входить как в основную, так и в боковую цепь полисахарида. У многих разветвленных КПС, содержащих нонулозоновую кислоту в боковой цепи, основная цепь построена из дисахаридных повторяющихся звеньев, одним из компонентов которых является β -D-GalpNAc.

Обычным заместителем аминогрупп в положениях 5 и 7 остатков нонулозоновых кислот является ацетильная группа, но в некоторых КПС *A. baumannii* в одном из этих положений присутствуют различные ацильные заместители [в одних K-звеньях ацетильная, а в других – (R)- или (S)-3-гидроксibuтаноильная группа (RNb или SNb)].

2.1.2. Липоолигосахарид *A. baumannii*.

Долгое время считалось, что клеточная стенка представителей рода *Acinetobacter* имеет типичное для грамотрицательных бактерий строение, и бактерия *A. baumannii* обладает липополисахаридом (ЛПС), в котором липид А через олигосахарид кора связан с О-полисахаридной цепью (О-антигеном). Однако в геномном кластере биосинтеза ЛПС *A. baumannii* отсутствует ген, кодирующий лигазу, необходимую для связывания углеводного полимера (О-полисахарида) с липоолигосахаридом, состоящим из кора и липида А [51]. Таким образом, эти данные свидетельствуют в пользу того, что ЛПС *A. baumannii* на самом деле является липоолигосахаридом (ЛОС).

Липоолигосахарид (ЛОС) представляет из себя липидно-углеводную структуру, присущую только внешней мембране грамотрицательных бактерий. ЛОС играет важную роль в подвижности клеток, поверхностной адгезии, устойчивости к антимикробным пептидам в сыворотке человека, а также в стимуляции провоспалительного иммунного ответа [52, 53]. Также было показано, что модификации ЛОС или его полная потеря приводят к устойчивости

Acinetobacter baumannii к полимиксиновым антибиотикам, таким как колистин [52]. ЛОС необходим для стабильности внешней мембраны и выживания бактериальной клетки [54]. Однако у *Acinetobacter baumannii* были выделены жизнеспособные штаммы, лишенные ЛОС [52].

ЛОС состоит из двух компонентов: липида А, который закрепляет молекулу во внешнем слое мембраны, и олигосахарида. Олигосахарид кора состоит из внутреннего кора, который обычно является консервативным у вида, и внешнего кора, который заметно отличается у разных штаммов по составу углеводных остатков и связей между ними [55]. В штаммах *A. baumannii* ATCC 19606 [56] и SMAL [57] внешний кор состоит из четырех остатков Glc, двух остатков GalN и одного GlcNAc. Внешний кор штамма ATCC 17904 [58] сильно отличается по моносахаридному составу от кора ATCC 19606 [56] и SMAL [57], в него входят четыре остатка Rha, и по одному остатку GlcNAc, GlcNA и Kdo (Рисунок 9).

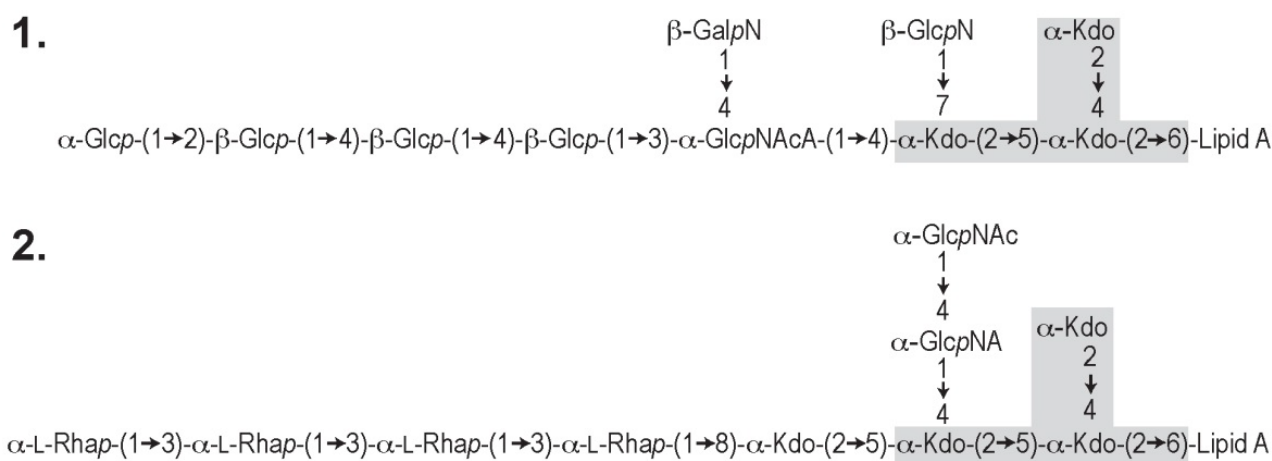


Рисунок 9. Структуры ЛОС, обнаруженные в *A. baumannii*. **1** - ЛОС, выделенный из штаммов ATCC 19606 [56] и SMAL [57]. **2** - из штамма ATCC 17904 (NCTC 10303) [58]. Внутренний кор выделен серым цветом.

Классический липид А представляет собой бисфосфорилированный дисахарид, состоящий из двух остатков D-глюкозамина (D-GlcN) в качестве основной цепи, каждый из которых ацилирован жирными кислотами. Разные виды бактерий имеют разное количество и длину ацильных цепей из-за различий в путях

биосинтеза липида А (обычно с четырьмя-семью ацильными цепями). Чаще всего липид А гексаацетилован, то есть шесть ацильных цепей различной длины этерифицированы в дисахаридный фрагмент. Первичные ацильные цепи непосредственно этерифицируются сахарным фрагментом, а так называемые «вторичные ацильные цепи» образуют сложноэфирные связи с гидроксильными группами первичных ацильных цепей. «Симметрично» ацетилованный липид А означает, что каждый фрагмент глюкозамина несет одинаковое количество ацильных цепей. ЛПС *E. coli* является примером содержания «асимметрично» ацетилованного липида А, поскольку 4 из 6 ацильных цепей переносятся первым глюкозамином (Рисунок 10). Все первичные ацильные цепи липида А *E. coli* представляют собой 3-гидроксимиристаты, одна из двух вторичных ацильных цепей представляет собой миристант, а другая лаурат.

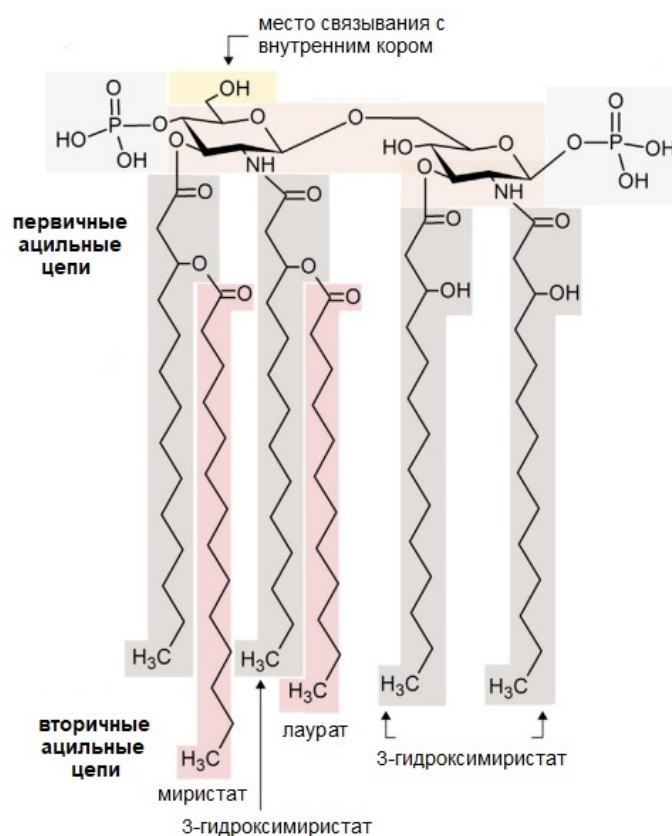


Рисунок 10. Подробная структура липида А микроорганизма *E. coli*. Гидроксильная группа GlcN, которая связывает липид А с внутренним кором обозначена желтым цветом, первичные ацильные цепи - серым, вторичные ацильные цепи – красным.

Липид А встроен во внешний слой наружной мембраны бактерии посредством электростатических и главным образом гидрофобных взаимодействий. Диглюкозаминовая часть липида А ориентирована во внешнюю среду, тогда как ацильные цепи липида А цепи ориентированы во внутреннюю часть мембраны.

В ЛОС *A. baumannii* присутствует смесь гепта- (а) и гексаацильных (а) видов липида А с гептаацилированным липидом А в качестве доминирующей формы (Рисунок 11). Гептаацилированный липид А состоит из двух остатков β-глюкозамина соединенных 1→6 связью, трех цепей лаурата, по одной цепи 2-гидроксилаурата и 3-гидроксилаурата и двух цепей 3-гидроксимиристата. Гексасахаридное производное отличается отсутствием одной вторичной цепи лаурата.

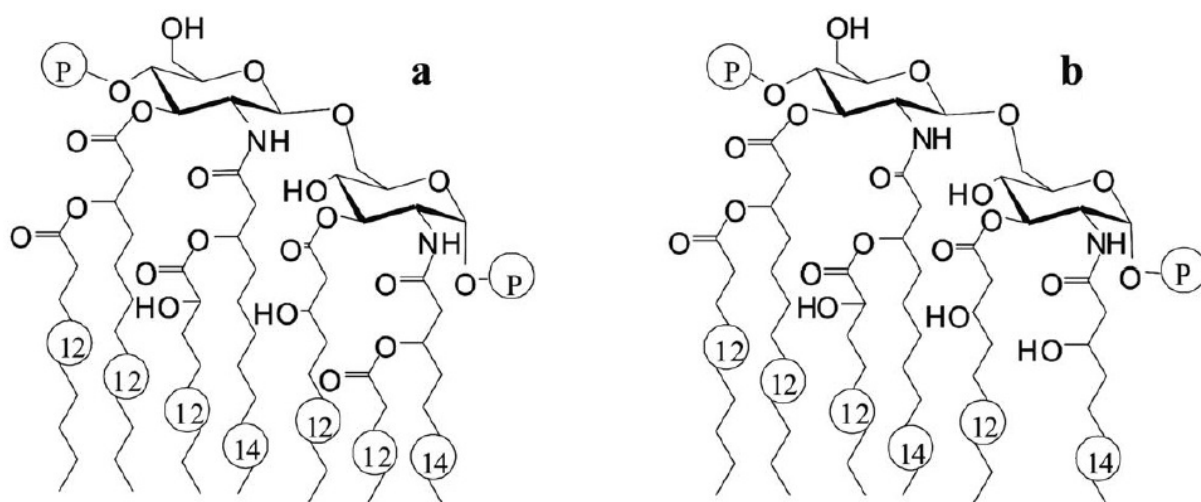


Рисунок 11. Структура гепта- (а) и гексаацилированного (b) липида А, выделенного из штамма SMAL *A. baumannii* [59].

Как отмечалось ранее, *A. baumannii* обладает широким спектром устойчивости к различным антибиотикам вплоть до полной резистентности, в связи с чем актуальным является вопрос подбора альтернативного метода лечения заболеваний, вызываемых данным госпитальным патогеном [60]. Одним из

подходов для борьбы с инфекциями, вызываемыми *A. baumannii*, может стать фаготерапия, основанная на применении препаратов бактериофагов, лизирующих штаммы *A. baumannii*. Литические фаги уже успели зарекомендовать себя как эффективные антибактериальные агенты по отношению к различным видам бактерий, однако против *A. baumannii* коммерчески доступного препарата до сих пор не зарегистрировано. Диапазон практического применения бактериофагов охватывает не только их возможное использование в медицине, но также и для контроля распространения бактериальных патогенов, вызывающих различные заболевания растений и животных.

2.2 Общие сведения о бактериофагах

Бактериофаги (фаги) – вирусы, которые инфицируют бактериальные клетки, а литические (или вирулентные) фаги затем уничтожают ее после проникновения внутрь клетки и репликации фаговых частиц. Ранее бактериофагами называли и вирусы архей, однако в настоящее время этот термин принято относить исключительно к бактериальным вирусам. Бактериофаги широко распространены в природе и являются естественными регуляторами численности бактерий [61].

Типичная фаговая частица состоит из головки и хвоста (Рисунок 12). Длина хвоста обычно в 2-4 раза больше диаметра головки. В головке содержится генетический материал — одноцепочечная или двуцепочечная РНК или ДНК с ферментом транскриптазой в неактивном состоянии, окружённая белковой или липопротеиновой оболочкой — капсидом, сохраняющим геном вне клетки.

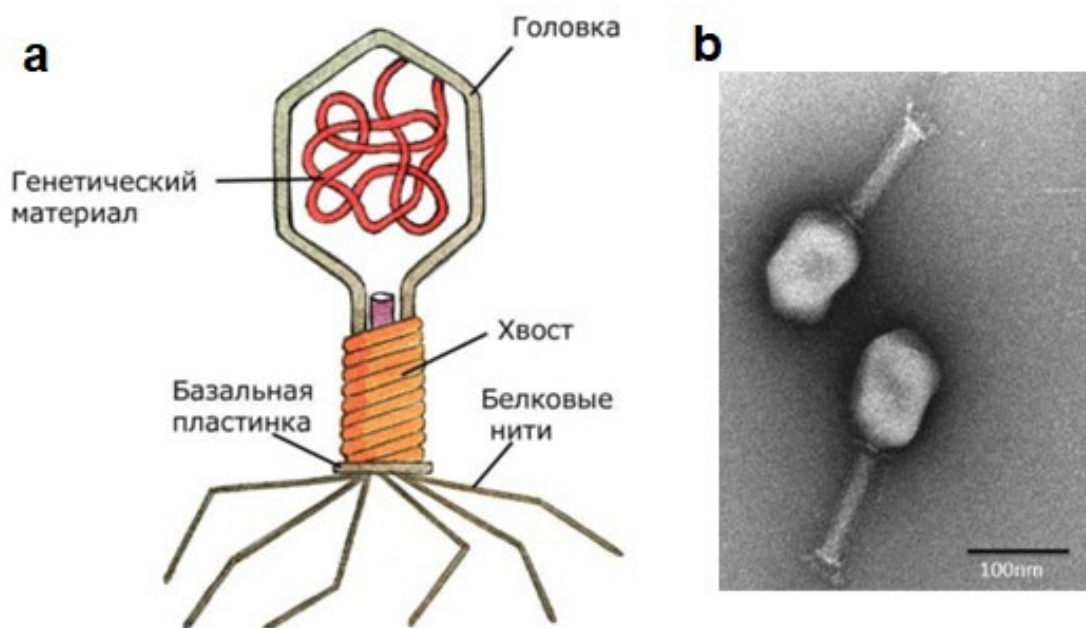


Рисунок 12. а. Строение бактериофага. **б.** Электронная микрофотография фаговых частиц, содержащих вытянутую головку, длинный сократимый хвостовой отросток и базальную пластинку. [62].

Впервые фаги были применены для лечения бактериальных инфекций одним из первооткрывателей бактериальных вирусов французом Феликсом д'Эрелем еще в 1919 году [63]. Однако, в середине 20-го века после открытия антибиотиков интерес к фагам заметно ослабел, но фаги продолжали использовать в Советском Союзе и странах Восточной Европы. В последнее время из-за широкого распространения антибиотикоустойчивых возбудителей бактериальных инфекций этот вид терапии переживает ренессанс [64].

В качестве альтернативы традиционной антибиотикотерапии фаговая терапия имеет ряд преимуществ, благодаря высокой специфичности в отношении определенного вида бактерий, в частности, минимальное влияние на микрофлору хозяина, саморепликация в бактериальных клетках и отсутствие критических побочных эффектов [65].

Эффективность действия бактериофагов обусловлена их литической активностью по отношению к бактериальным клеткам. В настоящее время во многих лабораториях ведутся исследования по характеристике и выяснению

механизмов антибактериальной активности различных белков, закодированных в геномах бактериофагов [66-68].

Взаимодействие бактериофагов с бактериальными клетками может осуществляться по двум возможным путям: литическому или лизогенному [66-68] (Рисунок 13). Жизненный цикл вирулентных (литических) фагов протекает в несколько этапов и заканчивается лизисом (разрушением) бактериальной клетки, репродукцией новых полноценных фаговых частиц и их переносом в окружающую среду.

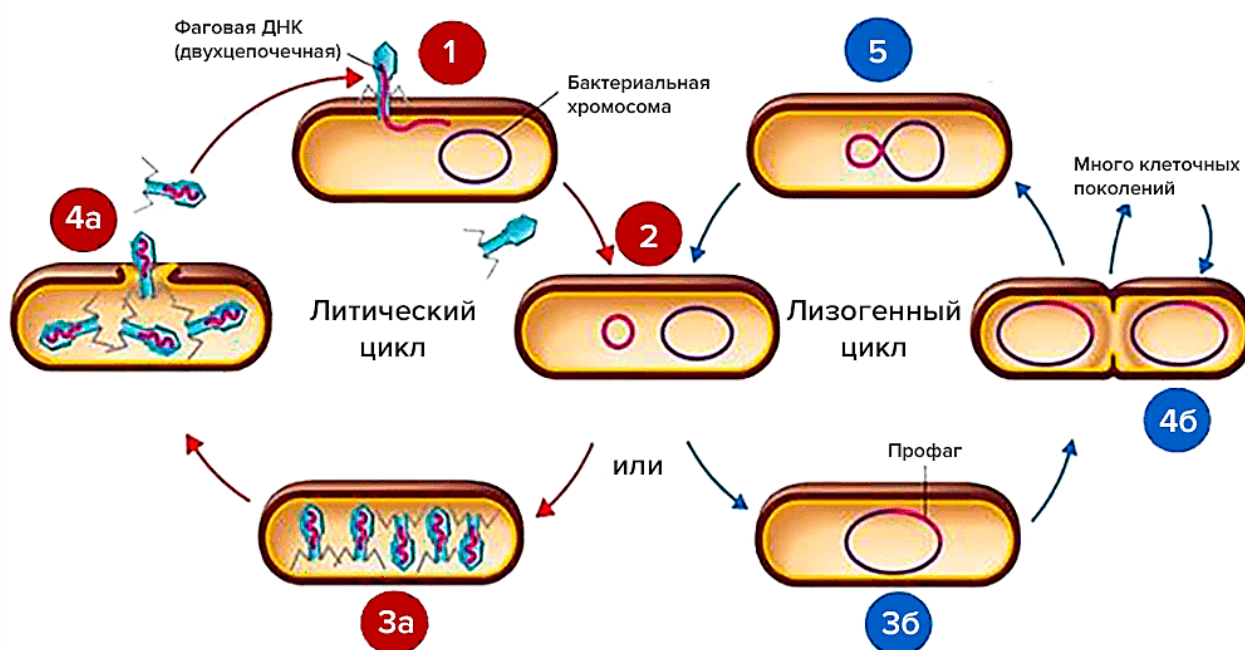


Рисунок 13. Литический и лизогенный циклы бактериофагов [69].

В случае лизогенного (умеренного, невирулентного) цикла (Рисунок 13) фаг не приводит к лизису клетки, а использует ее в качестве «убежища», в котором он существует в состоянии покоя. После проникновения ДНК фага в клетку бактерии, она интегрируется в геном бактериального хозяина с помощью кодируемых фагом интеграз или присутствует в клетке в свободном плазмидоподобном состоянии. Интегрированный в бактериальной хромосоме участок фагового генома называется профагом. Генетический материал профага затем реплицируется и распределяется по дочерним бактериальным клеткам в соответствии с репликацией и делением бактерии [70].

Если бактерия, содержащая профаг, подвергается воздействию стрессоров (ультрафиолетовое излучение, условия с низким содержанием питательных веществ или при обработке определенными химическими веществами, например, митомицином С), профаг может самопроизвольно вырезаться из генома хозяина вследствие процесса, называемого индукцией, и запускать литический цикл развития. Однако, в ходе данного процесса в бактериальной хромосоме могут оставаться фрагменты генетического материала профага и, наоборот, при вырезании из генома бактерии профаг может захватить фрагменты ДНК хозяина, что способствует появлению химерных вирионов. Если сформированные таким образом фаговые частицы затем заражают новую бактериальную клетку, они могут осуществить перенос участков бактериальной ДНК от одного штамма к другому в процессе, называемом трансдукцией. Это один из способов, с помощью которого гены устойчивости к антибиотикам, гены, кодирующие токсины и суперантигены, и другие факторы вирулентности бактерий могут распространяться в бактериальной популяции [71].

В ходе литического цикла (Рисунок 13) сразу после инфицирования клетки-хозяина - инъекции генома фага, внутри нее начинают синтезироваться закодированные в геноме фага белки, которые расщепляют ДНК бактерии и позволяют фагу контролировать клеточные механизмы. Затем внутри бактериальной клетки начинают синтезироваться новые фаговые частицы. При этом головки фаговых частиц с упакованным в них генетическим материалом и хвостовые отростки собираются отдельно, после чего происходит их соединение и формирование новых дочерних фаговых частиц. Далее, вследствие масштабного синтеза в бактериальной клетке закодированных в геноме фагов эндוליзинов, происходит разрушение клеточной стенки бактерии с последующим высвобождением фагового потомства в окружающую среду [70].

Среди всех бактериальных вирусов фаги порядка *Caudovirales* (от лат. *cauda* – хвост) являются самыми распространенными. В настоящее время они являются наиболее изученными вирусами бактерий. Среди всех секвенированных фаговых геномов более 95% представлено геномами хвостатых фагов. Хвостовые отростки

фагов необходимы для распознавания клетки-хозяина и используются фагами для прикрепления к поверхности бактериальной клетки. Структурный состав хвостового отростка может варьировать от единичного хвостового шипа до более сложной структуры, состоящей из базальной пластинки с дополнительными элементами в виде хвостовых волокон и хвостовых шипов [72]. Гены, кодирующие структурные элементы хвостового отростка, являются наиболее варибельной частью фагового генома [73]. Хвостовые белки фагов разнообразны и способны распознавать почти каждый компонент поверхности бактериальной клетки хозяина, включая КПС [74].

Способность бактериофага инфицировать ограниченный круг хозяев обуславливается спецификой адсорбционного процесса, зависящего от структурных особенностей рецепторов на поверхности бактериальной клетки. Важную роль играет локализация, количество и плотность рецепторов на различных участках клеточной поверхности. Природа рецепторов различна у разных представителей таксономических групп бактерий и в основном определяется составом клеточной стенки и другими поверхностными структурами клетки. Белки, локализованные на мембране бактериальной клетки, а также различные участки КПС могут являться первичными рецепторами для бактериофагов. В большинстве случаев фаги требуют наличия двух типов рецепторов [75]. Некоторые бактерии экранируют рецепторы за счет синтеза капсулы, состоящей из КПС [76]. Для преодоления углеводного барьера бактерий фаги используют полисахарид-деградирующие ферменты, которые распознают, связывают и расщепляют КПС, обеспечивая доступ к первоначально недоступному рецептору клеточной стенки бактерии [77]. Это приводит к направленному движению фаговых частиц вглубь полисахаридного слоя. Достигнув поверхности клетки, фаг связывается со следующим рецептором. На конце хвостового шипа фага присутствует белок или белковый комплекс, имеющий вид жесткой иглы, у основания которой могут иметься пептидогликан-гидролазные участки, с помощью которых фаг транспортирует свой генетический материал внутрь бактериальной клетки [75].

2.2.1 Дедолмеразы бактериофагов

В результате тесной коэволюции фагов и их бактериальных хозяев сформировалось большое разнообразие полисахаридных компонентов клеточных стенок бактерий. Что подразумевает наличие у фагов такого же разнообразия структурных элементов, обеспечивающих первичное взаимодействие фага с бактериальной клеткой.

Дедолмеразы бактериофагов отличаются широким структурным разнообразием, однако имеют общие особенности. Они являются фибриллярными белками с параллельной β -складчатой структурой [78] и, как правило, образуют удлиненные гомотримеры, по форме напоминающие шип. Такая конфигурация позволяет расширить активный участок для распознавания и связывания фага с рецептором. Сложная β -складчатая структура дедолмеразы определяет ее специфичность и стабильность [79].

Общая архитектура дедолмераз чаще всего включает три белковых участка: N-концевой, центральный и C-концевой (Рисунок 14). Небольшой N-концевой участок обеспечивает присоединение дедолмеразы к хвостовым структурам бактериофага, он не влияет на ферментативную активность [80]. Крупный центральный домен необходим для распознавания бактериальной клетки, а также обладает ферментативной активностью. C-концевой домен ответственен за тримеризацию белка и в основном работает как внутримолекулярный шаперон, то есть участвует в сохранении и восстановлении правильной конформации белковой молекулы. Многие исследователи считают, что C-концевой домен ответственен также за распознавание клеточного рецептора [78]. N-концевой, а также C-концевой домены дедолмераз консервативны среди фагов, принадлежащих к одной таксономической группе, в то время как специфичный для клетки хозяина центральный домен является переменным, обеспечивая тем самым изменение диапазона хозяев или адаптацию к новой среде. Подавляющее большинство фаговых дедолмераз входит в состав структурных компонентов фаговой частицы – в основном это белки хвостового аппарата [81].



Рисунок 14. Кристаллическая структура деполимеразы gp48 фага APK09 [82].

По механизму ферментативного действия фаговые деполимеразы разделяют на два основных класса – гидролазы и лиазы (Рисунок 15). Оба класса ферментов расщепляют полисахариды на олигосахариды, что приводит к разрушению углеводного барьера бактериальной клетки. Большинство гидролаз принадлежит к группе O-гликозилгидролаз, которые используют молекулу воды для расщепления O-гликозидных связей в молекулах полисахаридов. Деполимеразы, принадлежащие к классу лиаз, расщепляют гликозидную связь по механизму β-элиминирования с сопутствующим образованием двойной связи.

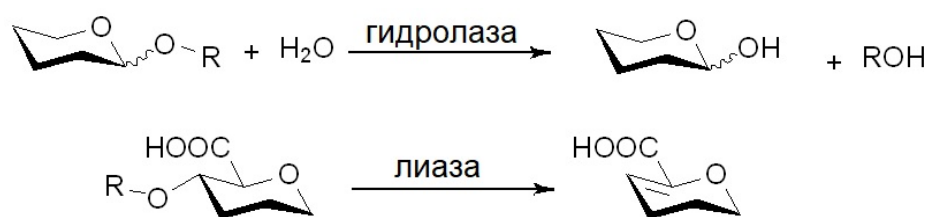


Рисунок 15. Механизм действия фаговых деполимераз: лизис и β-элимирование.

Деполимеразы разделяют так же по типу гидролизуемого сахара, так выделяют галактозидазы, глюкозидазы, маннозидазы и другие.

Например, деполимераза профага *Klebsiella pneumoniae* расщепляет полисахарид *Klebsiella pneumoniae* K21 по связи β-Gal-(1→3)-α-GlcA, на

В качестве примера лиазной активности приведено расщепление КПС *Escherichia coli* K5 деполимеразой фага Ф5 (Рисунок 18) [85]. В данном случае деполимераза катализирует разрыв связи β -D-Man_{4,6}Pyr-(1→4)- β -D-GlcA, что приводит к образованию трисахарида с глюк-4-ен-уроной кислотой на невозстанавливаемом конце.



КПС K5

↓ деполимераза фага Ф5

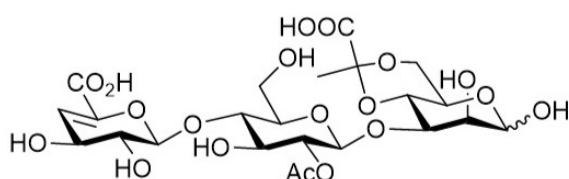


Рисунок 18. Расщепление КПС *Escherichia coli* K5 деполимеразой фага Ф5 [85].

Деполимеризация бактериальных КПС вирусными ферментами в качестве полезного побочного эффекта обеспечивает удобный метод получения олигосахаридов, соответствующих одному или более повторяющихся звеньев полисахарида, которые успешно могут использоваться для создания гликоконъюгатных вакцин.

2.2.2. Применение бактериофагов

Применение бактериофагов в животноводстве

Во многих частях мира противомикробные препараты используются в интенсивном сельском хозяйстве для стимуляции роста, профилактики или терапии заболеваний [86]. Известно, что в США в 2012 году более 70% от общего используемого объема важных с медицинской точки зрения антибиотиков (8.9 т), применялись в животноводстве [87]. Предполагается, что в Китае к 2030 году в животноводческой отрасли будет использоваться до 30% производимых в мире противомикробных препаратов [88]. Возникновение резистентности к

антибактериальным препаратам у различных возбудителей неизбежно приведет к еще большему их распространению, неэффективности лечения и сопутствующим производственным потерям [89].

Главными возбудителями инфекционных заболеваний скота на данный момент считаются *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp. и *Listeria* spp. [90-92]. В одном из последних отчетов Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов указывается, что эти патогены часто устойчивы одновременно к нескольким классам антибиотиков [93, 94]. Полученные в Европейском Союзе официальные данные свидетельствуют о высоком процентном соотношении (28.6% из более чем 8000) изолятов сальмонелл, устойчивых к трем или более антимикробным препаратам, среди зоонозных и индикаторных бактерий, выделенных от людей, животных и из продуктов питания. Кроме того, 34.9% изолятов *E. coli*, выделенных от свиней на откорме, обладали множественной лекарственной устойчивостью [94]. Учитывая тот факт, что разработка новых антибиотиков требует значительного количества времени [95], для противодействия распространению резистентности необходимы альтернативные подходы. Одним из таких вариантов является использование литических бактериофагов для борьбы с бактериальными возбудителями заболеваний скота [96]. В обзоре, спонсируемом Министерством здравоохранения Великобритании и благотворительным фондом «Welcome Trust», сообщается, что из 10 наиболее многообещающих альтернатив антибиотикам три основаны на использовании бактериофагов или их компонентов [96].

Дерель и его группа [97] впервые испытали фаготерапию на животных, успешно вылечив тиф у кур. В результате исследования была отмечена 95-100% выживаемость обработанных фагом птиц по сравнению с 0-25% у необработанных особей. Пиле и группа [98] сообщили об использовании фага для лечения цыплят с системной сальмонеллезной инфекцией, вызванной *Salmonella enterica* серотипа Pullorum. В данном случае, в то время как фаг продемонстрировал выраженный лизис бактерий *in vitro*, при использовании *in vivo* он не снижал смертность и не оказывал значительного терапевтического эффекта.

Бактериальными мишенями для использования фагов в животноводстве часто являются представители рода *Salmonella*, вызывающие заболевания у людей и у широкого круга теплокровных животных, что приводит к значительным потерям продуктивности в животноводстве. Некоторые серотипы *Salmonella*, например, *S. enterica* серотипа Typhі известны как «ограниченные хозяином», потому что они вызывают тяжелое системное заболевание - брюшной тиф у одного хозяина (или небольшого числа родственных хозяев). Тем не менее, фаготерапия в большинстве случаев была направлена на «не ограниченные хозяином» серотипы (Enteritidis и Typhimurium), которые обычно вызывают менее тяжелые формы желудочно-кишечных инфекций у широкого круга видов и ассоциированы с развитием значительного количества бактериальных инфекций пищевого происхождения в развитых странах [99]. Бактериофаги также применялись для контроля распространения сальмонелл у кур. Так, Скляр и группа использовали фаги в модели цыплят-бройлеров, чтобы продемонстрировать, что колонизация сальмонеллой слепой кишки может быть значительно снижена путем введения смеси из четырех литических фагов в корм [100]. Кроме того, обработка фагом заметно уменьшала признаки вторичной инфекции у птиц, так как только у трех из десяти животных в группе, получавшей фаг, наблюдалось легкое воспаление дыхательных путей, в то время как у восьми из десяти птиц в контрольной группе, не получавшей лечения, были признаки аэросаккулита.

Другое часто встречающееся у животных заболевание – клостридиоз. *Clostridium perfringens* является возбудителем некротического энтерита - болезни, поражающей кур, патогенез которой изучен не полностью. Считается, что вирулентность и способность колонизировать кишечник *C. perfringens* обусловлена секретлируемыми данной анаэробной бактерией токсинами и гидролазами [101]. Кроме того, известно, что паразиты видов *Eimeria*, колонизирующие тонкий кишечник, такие как *Eimeria maxima* и *Eimeria acervulina*, способствуют развитию некротического энтерита за счет просачивания плазмы в просвет кишечника, что обеспечивает необходимый субстрат для роста и обширной пролиферации *Clostridium perfringens* [102]. Лечение фагами показало некоторую эффективность

в снижении симптомов и прогрессирования заболевания у цыплят. В исследовании Миллера и его группы, которое проводилось с использованием в общей сложности 900 птиц, в различных экспериментах показано, что пероральное введение коктейля из пяти фагов через желудочный зонд или питьевую воду цыплятам-бройлерам (в возрасте от 0 до 42 дней), инфицированных *C. perfringens*, привело к снижению смертности на 92% по сравнению с необработанной контрольной группой [103]. Поскольку *C. perfringens* является грамположительной бактерией, самым внешним слоем ее клеточной стенки является толстый слой пептидогликана с тейхоевыми и липотейхоевыми кислотами. Поэтому для бактериального лизиса было достаточно использования кодируемых фагом пептидогликан-лизирующих ферментов –эндолизинов, гидролизующих специфические связи внутри пептидогликанового слоя [104]. Таким образом, применение очищенных эндолизинов, активных в отношении *C. perfringens* является многообещающей стратегией для уменьшения колонизации или лечения инфекций, вызванных этим патогеном.

Использование бактериофагов в агрономии

В природе растения всегда находятся под угрозой поражения вредителями и различными болезнями. Химические бактерициды и антибиотики ранее использовались в качестве основных агентов для борьбы с возбудителями бактериальных болезней растений в поле или в теплице. Однако появление резистентных к обычным антибиотикам и бактерицидам бактерий, а также их потенциальное негативное воздействие на окружающую среду и здоровье человека требует от бактериологов разработки альтернативных средств борьбы, которыми могут являться бактериофаги. Кроме того, специфичность фагов строго к определенным видам бактерий обуславливает их использование и для диагностики фитопатогенных бактерий. В 2012 году по результатам опроса бактериальных патологов, проведенного в журнале *Molecular Plant Pathology* был составлен список из 10 наиболее важных с научной и экономической точек зрения бактериальных патогенов растений, среди которых был *Pseudomonas syringae* pathovars,

вызывающий заболевания у однодольных, травянистых и древесных двудольных растений по всему миру [106]. В трех различных местах были проведены два параллельных полевых испытания с использованием смеси из шести бактериофагов как препарата для биоконтроля бактериального ожога лука-порея, вызванного *P. syringae* pathovars. Хотя, в целом, результаты экспериментов варьировались, в одном из этих испытаний было показано ослабление развития симптомов заболевания и был продемонстрирован терапевтический потенциал смеси бактериофагов для борьбы с возбудителями бактериальных ожогов [107].

В последние годы опубликованы результаты нескольких исследований, показывающих эффективность бактериофагов для борьбы с другими важными бактериальными возбудителями растений из сформированного списка основных патогенов. В исследованиях растения обрабатывали препаратами бактериофагов в тепличных и полевых условиях различными способами, такими как пропитка почвы, опрыскивание листьев, инфильтрация и погружение в случае обработки семян (Рисунок 19). Для борьбы с *Ralstonia solanacearum* — патогеном, передающимся растениям через почву, использовали прямое добавление фага в ризосферу путем пропитывания почвы, что способствовало значительному подавлению развития увядания у томатов [108]. Было продемонстрировано, что при опрыскивании листьев препаратом фага, отмечалось эффективное снижение заболеваемости, вызванной такими патогенами как *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [109], *Xanthomonas euvesicatoria* [110] и *C* subsp. *carotovorum* [111]. Также был выявлен потенциал нитчатых фагов в борьбе с болезнями растений. Так, заражение нитчатыми фагами типа ФRSM — ФRSM3 — усиливало экспрессию генов, связанных с патогенезом, в растениях томатов и приводило к потере вирулентности *R. solanacearum* [112]. Аналогичным образом, при инфекции нитчатым фагом XacF1 были отмечены негативные изменения в продукции внеклеточных полисахаридов, подвижности, скорости роста или вирулентности у *Xanthomonas axonopodis* pv. [113].

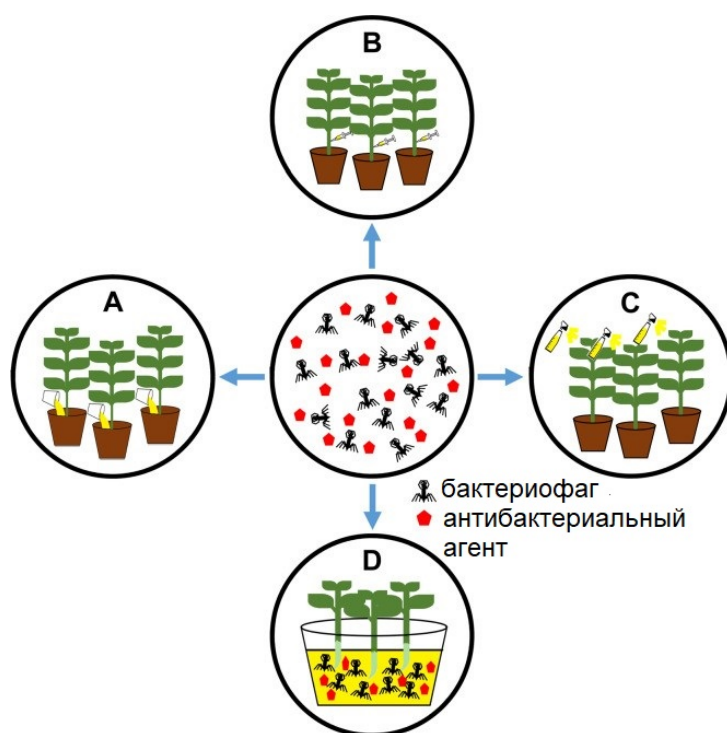


Рисунок 19. Методы лечения растений бактериофагами в теплице или поле. **A**- пропитка почвы (раствор фага добавляли непосредственно к основанию растения); **Б**- прямая инфильтрация в ткани растений; **С**- внекорневая подкормка опрыскиванием; **Д**- погружение (проростки или семена можно погрузить в раствор фага перед посадкой). Красные пятиугольники обозначают антибактериальные агенты, такие как антибиотики и индукторы системной приобретенной резистентности [113].

Хотя и существуют некоторые бактериофаги, которые могут взаимодействовать с множеством штаммов одного или нескольких видов и родов бактерий [114,115], большинство фагов могут инфицировать только некоторые штаммы внутри одного вида бактерий. В большинстве случаев это обусловлено высокоспецифичным взаимодействием рецептор-связывающих белков бактериофагов с рецепторами на поверхности клетки-хозяина [116]. Однако бактерии могут приобретать устойчивость к фаговой инфекции путем различных механизмов: от простой мутации в геноме до изменения поверхностных рецепторов, блокирующего адсорбцию фага [117-120], а также расщепления

генетического материала фага с помощью систем рестрикции-модификации или систем CRISPR-Cas [121,122].

Например, устойчивость к бактериофагам у *R. solanacearum* сформировалась примерно через 30 часов после добавления бактериофага к бактериальной культуре [123]. Точно так же через 16–17 часов после обработки бактериофагом Хоо-Sp2 в жидкой культуре было отмечено появление резистентных бактерий, концентрация которых сохранялась на низком уровне через 35 часов после заражения [124]. Использование смеси литических бактериофагов, известной как коктейль бактериофагов, является потенциальным подходом для решения вопросов, связанных с узкой специфичностью отдельных фагов и предотвращения развития устойчивых к бактериофагам бактерий [125,126]. Фаговые коктейли были использованы для борьбы с различными бактериальными патогенами растений, такими как *R. solanacearum* [127], *Xanthomonas* [128] и *P. carotovorum* sp. *carotovorum* [129]. Кроме того, ежедневное применение смеси фагов привело к эффективному контролю распространения возбудителей бактериального ожога на горшечной и рассадной герани в тепличных условиях. Аналогичная стратегия использовалась и для внекорневой подкормки фаговым коктейлем в качестве препарата для биологической борьбы с бактериальной пятнистостью, вызванной *X. campestris* pv. *vesicatoria* у томата [130]. Результаты исследований показали, что применение бактериофагов привело к последовательному снижению частоты возникновения и тяжести протекания бактериальной пятнистости. Кроме того, растения, обработанные бактериофагами, давали значительно более высокий урожай, чем необработанные растения или растения, обработанные бактерицидами [130].

Бактериофаги в пищевой промышленности

Хотя и косвенно, дезинфекция поверхностей в животноводческих помещениях и объектах пищевой промышленности может быть причиной возникновения устойчивости бактерий к противомикробным препаратам из-за существования перекрестной устойчивости между биоцидами и антибиотиками

[131]. В этом отношении фаги также могут стать привлекательной альтернативой традиционным дезинфицирующим средствам, и некоторые продукты уже одобрены для этой цели. Например, две американские компании выпускают на рынок продукты для дезинфекции поверхностей против сальмонеллы (VacWash™) и кишечной палочки O157:H7 (Finalyse™). Помимо обеззараживания поверхностей фаги также могут применяться в качестве пищевых биоконсервантов. Хотя процесс регулирования использования подобных препаратов кажется еще более сложным, несколько фаговых продуктов, предназначенных для использования в качестве пищевых добавок, в настоящее время продаются в США. Например, коммерчески доступны фаговые препараты против *Listeria monocytogenes* (Listshield™), *Salmonella enterica* (SalmoFresh™) и *Escherichia coli* (Ecoshield™).

Что касается технических ограничений, то некоторые из возникающих проблем, связанных с стабильностью фагов, развитием устойчивости у бактерий или переносом генов, потенциально могут быть решены относительно простым способом с помощью современных генно-инженерных методов, например, CRISPR-Cas-редактирования [132]. Тем не менее, по-прежнему необходима дальнейшая работа по адаптации лабораторных результатов к крупномасштабному производству и очистке препаратов бактериофагов компаниями в соответствии с надлежащей производственной практикой. Другим важным аспектом коммерциализации продуктов на основе фагов является необходимость создания смесей или коктейлей фагов, эффективных против максимально возможного числа штаммов конкретного вида микроорганизма. Кроме того, эти смеси часто приходится регулярно адаптировать, чтобы избежать появления фагорезистентных штаммов, что затрудняет процессы их регистрации и регулирования их использования.

В дополнение к вышеуказанным вопросам существуют и другие нерешенные проблемы, такие как оценка возможных последствий внесения фагов в высоких концентрациях в окружающую среду. В этом смысле научному сообществу, безусловно, стоит тщательно проанализировать предыдущие ошибки, допущенные с антибиотиками. Например, при разработке новых антимикробных

стратегий следует учитывать эволюцию и возможную модификацию бактериальных мишеней, влияние фагов на микробные сообщества в природе и возможность развития фагоустойчивости. Однако следует отметить, что частота возникновения фагорезистентных клонов в 10 и даже 100 раз ниже частоты развития устойчивости бактерий к антибиотикам [133,134]. Кроме того, внимания заслуживает тот факт, что процесс возникновения фагоустойчивости у бактерий существенно отличается от формирования устойчивости к антибиотикам [135]. Что наиболее важно, устойчивость к фагам часто связана с возникновением мутаций в генах, кодирующих компоненты фаговых рецепторов (или продукты, участвующие в их формировании), которые часто играют существенную роль для жизнедеятельности и выживания самой бактерии, тем самым приводя к потере приспособляемости и/или вирулентности. Наконец, в отличие от других противомикробных препаратов, бактериофаги могут сами эволюционировать, приспособляясь к появлению устойчивости бактерий.

Следует отметить, что фаги часто могут быть чувствительны к дезинфицирующим средствам, обычно используемым в промышленности, а также к некоторым факторам окружающей среды, таким как рН, температура и т.д. [136,137]. Тем не менее, инактивация фагов после их применения, например, при обработке сельскохозяйственных культур [138] или борьбе с инфекциями в аквакультуре [139], может оказаться сложной задачей. Однако следует отметить, что стабильность фагов в некоторых средах сильно ограничивается путем инактивации УФ-облучения, как в случае филлосферы [138] или в условиях аквакультуры [139]. Чтобы преодолеть это ограничение, некоторые авторы рекомендуют применять бактериофаги в конце дня или ночью [140]. В целом, по-прежнему требуются дополнительные исследования для изучения не только эффективности фагов как противомикробных препаратов, но и их стабильности в окружающей среде и возникновения фагоустойчивости бактерий в полевых испытаниях.

На сегодняшний день значительный объем работ посвящен изучению эндолизинов - ферментов, катализирующих гидролиз пептидогликана в клеточных

стенках грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эффективность действия нескольких таких эндолизинов против *S. aureus* в настоящее время анализируются в клинических испытаниях на людях. В недавнем исследовании была продемонстрирована эффективность применения эндолизинов для лечения стафилококкового мастита коров [141]. Аналогичным образом было доказано, что эндолизины активны против основных патогенов сельскохозяйственных животных, таких как *C. perfringens* [142], представителей рода *Salmonella* [143] и *Streptococcus suis* [144] и даже личинок возбудителя пчел *Paenibacillus* [145]. Фаговые литические белки также являются многообещающими адъювантами (вещества, используемые для усиления иммунного ответа при одновременном введении с антигеном) для классических дезинфицирующих средств для обеззараживания поверхностей [140].

Использование бактериофагов для лечения людей

Фаготерапия подразумевает использование только литических бактериофагов. Что связано с риском возможного переноса умеренными фагами кодирующих токсинов (потенциальных факторов вирулентности или детерминант антибиотикорезистентности) в процессе трансдукции генов [146]. Для лечения людей бактериофаги можно применять местно, перорально, внутривенно или через небулайзер. Как правило, существует две основные стратегии подбора фагов для создания фаговых препаратов. В первом случае выбор фагов, активных в отношении конкретных бактериальных штаммов, в том числе мультирезистентных, осуществляется из уже существующей хорошо охарактеризованной библиотеки/коллекции бактериофагов [147]. В другом случае, осуществляется непосредственный поиск активных в отношении конкретного бактериального штамма фагов в различных образцах (например, сточных вод) путем процедуры обогащения, то есть добавления в образец той бактерии, против которой необходимо выделить бактериофаг [148].

В последнее время в области фаготерапии получил развитие персонализированный подход, заключающийся в поиске и применении фагов против конкретной бактериальной культуры, выделенной от пациента [149, 150].

Например, при комплексном лечении фагами и антибиотиками бактериальных инфекций легких, вызванных мультирезистентными *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia dolosa*, у трех пациентов с трансплантацией легких, был достигнут хороший эффект с точки зрения клинического улучшения, уничтожения бактерий и уменьшения антибиотикорезистентности у сопутствующих бактерий [151].

Бактерии могут приобретать устойчивость к бактериофагам так же, как и к антибиотикам. Следствием устойчивости бактерий к фагам может быть снижение устойчивости и к антибиотикам, что является полезным побочным эффектом. Поскольку применение фаговых препаратов у больных с серьезными бактериальными инфекциями по очевидным этическим причинам чаще всего назначается вместе с антибиотиками, в ряде случаев можно надеяться на синергетический эффект. Синергетические эффекты, возникающие при совместном использовании фагов и антибиотиков могут заключаться в увеличении продукции фагов в присутствии некоторых антибиотиков [152]. Также их совместное применение способствует более эффективному разрушению бактериальных клеток в разных состояниях: свободно взвешенном, неподвижном или в биопленках, и снижает вероятность того, что на бактериальный патоген будет не оказано действие антибактериальных агентов.

Персонализированная фаготерапия является многообещающим подходом для лечения различных инфекций. Так, в одном из случаев было подтверждено уничтожение карбапенемазопродуцирующей *Klebsiella pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью при введении пациенту индивидуально разработанного литического препарата бактериофагов совместно с карбапенемами без побочных эффектов [153].

В другом случае было продемонстрировано успешное лечение рецидивирующей инфекции мочеполовых путей, вызванной *K. pneumoniae* с широкой лекарственной устойчивостью. Применение фагового коктейля, состоящего из шести литических фагов (Kp152, Kp154, Kp155, Kp164, Kp6377 и HD001), и антибиотика триметоприм/сульфаметоксазола продемонстрировало сильный синергетический эффект в отношении бактериального возбудителя. Эта

комбинация фаг-антибиотик также ингибировала появление фагорезистентности в бактериальных клетках [154].

Фаговый коктейль, состоящий из бактериофагов, инфицирующих *A. baumannii* со множественной лекарственной устойчивостью, в сочетании с антибиотиками способен разрушать бактериальную биопленку в человеческой моче. Было замечено, что некоторые из антибиотиков, обычно используемых для лечения инфекции мочевыводящих путей, действуют синергично с коктейлями фагов [155]. Активность фагов усиливается при субингибирующих концентрациях антибиотиков [156-160]. Кроме того, комбинированная терапия также может снизить скорость эволюции повышения лекарственной устойчивости. Группа Вана обнаружила снижение резистентности *A. baumannii* при приеме колистина в сочетании с фагом Phab24. Устойчивость к фагам может сопровождаться «компромиссными» механизмами, ведущими к снижению вирулентности и повышению восприимчивости к антибиотикам [161]. Описан клинический случай, когда у пациента отмечалась инфекция большеберцовой кости, вызванная *A. baumannii* и *K. pneumoniae* с широкой лекарственной устойчивостью, после травмы и заживления раневой ткани. После комбинированного лечения фагами и антибиотиками наблюдалось быстрое уничтожение возбудителей. В результате ногу с инфицированной костью удалось спасти, и пациент был выписан почти через 7 месяцев госпитализации [162]. В другом случае, у 52-летнего пациента наблюдался электролитный дисбаланс, пневмония, вызванная мультирезистентным *A. baumannii*, и остеомиелит правой стопы из-за язв при диабетической стопе. Пациента лечили с помощью небулайзера и внутривенного введения фагов *A. baumannii* и одновременного применения антибиотиков в течение 35 дней. По прошествию этого времени состояние пациента значительно улучшилось, и бактериальный возбудитель перестал выявляться в посевах мокроты [163].

Распространение устойчивых к антибиотикам бактерий является одной из причин заболеваемости и смертности во всем мире. К таким бактериям относятся возбудители группы ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*,

Klebsiella pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды *Enterobacter*) – условно-патогенные микроорганизмы, участвующие во внутрибольничных инфекциях. В случае заражения этими бактериями обычно наблюдается неэффективность применения антибиотиков [164].

По классификации ВОЗ антибиотико-резистентные бактерии были разделены на несколько категорий («критически приоритетные», «высокоприоритетные» и «среднеприоритетные») в зависимости от необходимости поиска и разработки новых активных в их отношении антибактериальных средств. На основании этой классификации в список критически приоритетных бактерий были включены карбапенем-резистентные штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, устойчивые к карбапенемам и к цефалоспорином третьего поколения – представители семейства *Enterobacteriaceae*. В список высокоприоритетных бактерий входят ванкомицин-резистентные штаммы *Enterococcus faecium*, метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus*, устойчивые к кларитромицину *Helicobacter pylori*, устойчивые к фторхинолонам виды *Campylobacter*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Salmonella typhi* [165]. Описаны различные механизмы возникновения устойчивости к антибиотикам у патогенных бактерий [166].

Бактериофаговая терапия, направленная на борьбу с инфекциями *A. baumannii*.

Распространение устойчивости к противомикробным препаратам среди бактериальных возбудителей привело к глобальному кризису и на сегодняшний день стало причиной около двух миллионов заболеваний и 23 000 смертей [167]. Ожидается, что к 2050 году не менее 10 миллионов человек пострадают вследствие развития инфекций, вызванных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью, если медицинские и научные сообщества не сделают существенных инвестиций в исследования, направленные на понимание механизмов устойчивости к антибиотикам и разработку новых или альтернативных методов лечения [168]. Проблема быстрого приобретения резистентности к различным классам антибиотиков особенно актуальна в случае *A. baumannii*, так

как центр по контролю заболеваний США недавно реклассифицировал *A. baumannii* с его прежнего “серьезного” уровня опасности на “срочный”, что означает, что подобный уровень устойчивости к антибиотикам представляет заметную угрозу для общественного здравоохранения и требует немедленных действий.

С момента появления возможности идентификации, все выделенные изоляты *A. baumannii* были охарактеризованы как члены семейства глобального клона 1 (ГК1) или глобального клона 2 (ГК2) [169–171]. Первоначально было известно, что эти клональные группы обладают только генами, кодирующими детерминанты устойчивости к тетрациклину, сульфонамидам и аминогликозидам, но в конечном итоге приобрели устойчивость к карбапенемам, фторхинолонам и некоторым цефалоспорином третьего поколения.

В основе формирования устойчивости штаммов *A. baumannii* к антибиотикам существует три основных механизма: способность к инактивации антимикробных ферментов; мутагенез, который способствует изменению антимикробных мишеней или функций в бактериальных клетках (эффлюксные насосы и экспрессия других белков), и защите бактериальных мишеней от антимикробных агентов [172]. В качестве примера первого механизма можно привести гены, кодирующие ферменты, называемые бета-лактамазами, которые гидролизуют бета-лактамы, включающие в себя карбапенемы, цефалоспорины и пенициллины [173]. Вторым механизмом связан с возникновением в бактериальной хромосоме мутаций, влияющих на функцию бактерий или на мишени бактериальных клеток для противомикробных препаратов. Спонтанный мутагенез может привести к более высокой экспрессии белков, образующих эффлюксные насосы, а также к снижению сродства к антимикробным агентам [174]. Описанные выше механизмы также обуславливали формирование резистентности *A. baumannii* к хинолону [175] и колистину [176]. Третий механизм заключается в модификации белков наружной мембраны (например, белков пориновых каналов), необходимых для транспорта противомикробных препаратов в бактериальные клетки [177,178]. В результате чрезмерного использования антибиотиков бактерии приобретают новые и более

сложные механизмы устойчивости, что делает их почти неуязвимыми для уничтожения с помощью большинства доступных антибиотиков. Такая ситуация вызывает особую тревогу, поскольку скорость появления новых антибиотиков на рынке резко снизилась за последние несколько десятилетий. Это в значительной степени связано с увеличением затрат, необходимых для прохождения процессов регистрации. Относительно короткая продолжительность эффективности действия антибиотика из-за быстрого развития антибиотикорезистентности и высокая прибыль, связанная с тем, что фармацевтические компании переключаются на разработку и производство лекарств, используемых для лечения хронических состояний, включая рак, болезни сердца и стойкие вирусные инфекции, такие как ВИЧ и гепатит [179]. Хотя в настоящий момент некоторые антибиотики, включая цефалоспорин, цефидерокол и более новые тетрациклины, такие как эравациклин и TP-6076, сохраняют эффективность против *A. baumannii*, существует реальная угроза того, что развитие резистентности к противомикробным препаратам в конечном итоге сделает эти новые антибиотики бесполезными [179]. Это еще раз подчеркивает важность смены подходов для борьбы с инфекциями, вызванными *A. baumannii*.

Существует несколько отдельно описанных случаев применения бактериофагов для контроля инфекций, вызванных *A. baumannii*. В 2017 году фаговый коктейль вводили 68-летнему пациенту с *A. baumannii*-инфекцией. Помимо инфекционного осложнения он также болел некротизирующим панкреатитом и сахарным диабетом. Пациент был выписан через 245 дней госпитализации, и это был первый случай внутривенного применения фагоинъекции для лечения системной *A. baumannii*-инфекции [180]. Также описан случай внутривенного введения препарата фага каждые 2 часа 77-летнему пациенту, перенесшему краниоэктомию из-за церебрита, вызванного *A. baumannii*. Хотя исследование не было завершено из-за прекращения медицинской помощи, после введения фага наличия признаков бактериальной инфекции в зоне операции выявлено не было, что указывает на возможность проникновения фага через гематоэнцефалический барьер [181]. Четыре пациента, госпитализированные с

критической инфекцией COVID-19 и легочной карбапенем-резистентной *A. baumannii*-инфекцией, для которых лечение антибиотиками оказалось неэффективным, прошли лечение с использованием препарата, состоящего из двух фагов: FAb121 и FAb124. Двое из четырех пациентов были выписаны [182].

Согласно литературным данным [183], лучшими источниками для выделения *A. baumannii*-фагов являются образцы, полученные из больничных сточных вод. В ряде исследований, было показано, что для выделения бактериофагов можно использовать природные водоемы, в частности, из вод реки Ганга были выделены фаги против антибиотикорезистентных возбудителей группы ESKAPE [184]. Однако, в любом случае, выделение и наработка фагов может быть связана с рядом трудностей. Поэтому крайне важно разработать и оптимизировать эти методы для каждого конкретного бактериофага [185,186].

Бактериофаги не оказывают вредного воздействия на микробиом человека и характеризуются специфичностью в отношении бактериальных мишеней. В связи с этим, фаготерапия обладает высоким потенциалом для эффективного и безопасного лечения пациентов с тяжелыми хроническими инфекциями, вызванными *A. baumannii* [187].

Гаджавенд и его группа исследовали бактериофаги против *A. baumannii*, выделенные из отделений интенсивной терапии больницы Иранского медицинского университета [188]. В данном исследовании было собрано 350 клинических образцов, включая образцы мочи, катетеры, образцы раневого отделяемого тканей, мокроты и спинномозговой жидкости, крови, мазки для выделения изолятов *A. baumannii*. При изучении множественной лекарственной устойчивости для 43 изолятов было показано, что 100% были устойчивы к ципрофлоксацину, 93% были устойчивы к меропенему, имипенему, ампициллин/сульбактаму и цефепиму, 91% – к триметоприм-сульфаметоксазолу, 86% – к цефтазидиму, 84% были устойчивы к тетрациклину и 54% – к амикацину. Бактериофаги в данном исследовании были выделены из проб воды (пробы, полученные из окружающей среды и больничных отходов).

В работе Эрнандес-Моралес и соавторов был охарактеризован фаг Петти, выделенный из сточных вод [189]. Латентный период для этого фага составил 25 минут, а выход фагового потомства – 240 фаговых частиц на одну инфицированную клетку. Среди 40 протестированных штаммов – представителей рода *Acinetobacter*, 4 обладали множественной лекарственной устойчивостью (резистентность к цефазолину, цефотаксиму, хлорамфениколу и тетрациклину), и при этом были чувствительны к фагу. Мерабишвили с коллегами описали два фага (Acibel004 и Acibel007), также выделенные из проб сточных вод [190].

У бактерий существует ряд механизмов формирования устойчивости к фагам, которые связаны с образованием везикул внешней мембраны (ВВМ), ингибированием адсорбции фага и блокированием инъекции фаговой ДНК [191]. ВВМ – липидные везикулы, которые отпочковываются от внешней (наружной) мембраны грамотрицательных бактерий и действуют как первая линия защиты от взаимодействия с фагом. Бактерии используют ВВМ как аналог рецепторов, с которыми связываются фаги, что приводит к впрыскиванию генетического материала фага в эти везикулы и предотвращает дальнейшую репликацию фаговой ДНК в цитоплазме бактериальных клеток с использованием механизмов клеточных хозяев [192].

Еще одним широко используемым защитным механизмом бактериальной клетки является расщепление инъецированного фагового генетического материала. Бактерии также могут модифицировать поверхностные рецепторы, с которыми связывается фаг, за счет изменения их структуры или гиперпродукции экзополисахаридов. Кроме того, бактерии могут блокировать проникновение ДНК фага путем гиперпродукции определенных белков. Еще одной системой, обеспечивающей защиту бактериальных клеток от чужеродного генетического материала, является система CRISPR/Cas. Данная система представлена CRISPR-локусом и генами *cas* (анг. CRISPR-associated), кодирующими Cas-нуклеазы. Все эти механизмы подробно описаны в литературе [193].

Наряду с формированием устойчивости к антибиотикам, у бактерий существует возможность развития устойчивости к фагам, что может существенно

снизить эффективность использования фагов. Причиной появления фагорезистентности у бактерий могут быть некоторые мутации, которые запускают изменение рецепторов на поверхности клетки. Однако подобные модификации, индуцированные фагами, приводят к снижению вирулентности и способности к образованию биопленок, а в ряде случаев и к повторной чувствительности к антибиотикам [194].

В недавнем исследовании было показано, что возникновение устойчивости к фагам у *Enterococcus faecium* обусловлено мутациями в генах, кодирующих секретируемый антиген А и энтерококковый полисахаридный антиген, и может повысить чувствительность бактерий к некоторым антибиотикам. Было замечено, что применение фагов совместно с антибиотиками, действующими на клеточную стенку (цефтриаксон и ампициллин) и антибиотиками мембранного действия (даптомицин), приводит к уменьшению или ингибированию роста *E. faecium* [195]. Формирование устойчивости к фагам у бактериальных штаммов наблюдалась как в ходе клинических испытаний на животных, так и в случае лечения людей. Однако бактериальные мутации, благодаря возникновению которых формируется устойчивость к фагам, могут привести к снижению патогенности бактериальных штаммов или способствовать возобновлению чувствительности к антибиотикам [196]. В нескольких исследованиях было показано, что системы CRISPR-Cas, переносимые фагами, способны элиминировать патогены и повышать их чувствительность к антибиотикам [197]. Фаговая инфекция может также вызвать продукцию сигнальных молекул для общения между клетками бактериальной популяции, что может запустить различные механизмы возникновения повторной чувствительности бактериальной клетки к антибиотикам [198,199].

Таким образом, по результатам растущего количества исследовательских работ становится очевидным, что защитные механизмы бактерий хорошо развиты, и фаговая инфекция может дополнительно индуцировать эти механизмы. Мутации и модификации бактериальных клеток часто могут приводить к снижению их вирулентности. Бактериофаги обнаруживаются в желудке, ротовой и носовой полости, половых путях и глазах человека. Большинство бактериофагов, которые

естественным образом присутствуют в организме человека, являются умеренными фагами, существующими в форме профагов. В различных условиях индукция этих профагов может привести к нарушению равновесия баланса микробиома и дисбиозу (дисбалансу между видами, присутствующими в нашей естественной микрофлоре). Недавно была предложена стратегия, заключающаяся в использовании рекомбинантных поливалентных фагов, активных в отношении широкого круга хозяев, включая генетически различные виды бактерий. Однако их влияние на микрофлору кишечника человека еще предстоит изучить [200].

2.3. Заключение по литературному обзору

Acinetobacter baumannii – вид грамотрицательной бактерии, широко распространённый в природе и внутрибольничной среде. Данный микроорганизм входит в группу патогенов ESCAPE, для которых характерны широкий спектр природной и приобретенной антибиотикорезистентности, что осложняет лечение инфицированных ими пациентов. В связи с чем вопрос поиска новых методов борьбы с инфекциями, вызванными данным патогеном, стоит особенно остро.

Одним из основных факторов вирулентности *A. baumannii* является его КПС, который принимает участие в формировании капсулы бактерии, предохраняющей бактериальную клетку от действия антибиотиков, биоцидов и факторов окружающей среды. Вследствие широкого полиморфизма капсульного локуса биосинтеза КПС отличаются большим структурным разнообразием - к 2024-ему году выявлено более 240 KL-типов и их число постоянно увеличивается, однако химическая структура до данного исследования была определена всего для 41 КПС.

КПС является первичной мишенью действия рецепторных белков специфических бактериофагов; при расщеплении КПС возможна транспортировка бактериофагового генетического материала внутрь бактериальной клетки, которая далее сопровождается репликацией и приводит к лизису бактериальной клетки. Поэтому перспективным направлением является подбор фаговых деполимераз на основе строения КПС бактериальных штаммов.

Использование бактериофагов в терапии сложных инфекций, вызванных широко устойчивыми к действию антибиотиков бактериальными штаммами,

является перспективным направлением. Фаготерапия успела себя достаточно широко зарекомендовать по отношению к другим бактериальным организмам в разных сферах: агрономии (*Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* и другие), животноводстве (*Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. и другие), пищевой промышленности (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* и *Escherichia coli*) и лечении людей (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia dolorosa* и *Acinetobacter baumannii*). Таким образом, на основании данного литературного обзора можно сделать вывод о том, что бактериофаговая терапия действительно может являться основным альтернативным методом лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами *Acinetobacter baumannii*, а детальное понимание структуры его КПС и механизма взаимодействия с полисахарид-деградирующими ферментами бактериофагов может внести существенный вклад в развитие данного метода.

3. Результаты и их обсуждение

3.1 Структурный анализ капсульных полисахаридов

В настоящей работе было изучено строение 25 ранее неизвестных структур КПС *A. baumannii*, включая КПС типов К3, К8, К13, К20, К21, К24, К26, К46, К54, К57, К70, К73, К82, К90, К93, К98, К106, К112, К116, К127, К128, К135, К139, К144, К218 и охарактеризованы соответствующие каждому КПС генные кластеры биосинтеза капсулы (KL). Выращивание бактерий проводилось молекулярными биологами и микробиологами Поповой А.В. и Шнейдером М.М. из ФБУН ГНЦ ПМБ и ИБХ РАН, а также австралийскими коллегами из Центра иммунологии и инфекционного контроля Австралия, Брисбен.

Выделение капсульных полисахаридов

КПС выделяли из сухих бактериальных клеток *A. baumannii* водно-фенольной экстракцией по методу Вестфаля (1952 год), который широко используется для выделения образцов КПС и ЛПС [201]. Известно, что фенол является превосходным растворителем для многих белков. Коэффициент распределения двухфазной смеси фенол-вода часто допускает почти полную экстракцию белков из водных растворов. И наоборот, КПС, ЛПС и нуклеиновые кислоты обычно растворимы в воде и нерастворимы в феноле. После экстракции раствор содержал ряд примесей, таких как белки и нуклеиновые кислоты. Для удаления этих примесей из раствора КПС применялось осаждение 50%-ным раствором трихлоруксусной кислоты до pH 2-2.5 и последующая гель-хроматография на геле Sephadex G-50.

При подготовке образца КПС для структурного анализа применялось удаление липидных компонентов мягким кислотным гидролизом 2% уксусной кислотой. Об окончании реакции судили по исчезновению опалесценции или выпадению осадка, который отделяли центрифугированием. Выходы и время гидролиза приведены ниже в таблице 3.

Таблица 3. Выходы КПС от массы сухих бактериальных клеток.

Штамм	Время деградации, ч	Выход КПС, %
LUH5553	1	4.9
BAL097	1	2.5
UMB001	1	3.8
A388	2	8.2
G21	2	4.3
RCH51	2	3.3
KZ1098	2	5.4
NIPH329	1	4.3
RCH52	1	4.6
BAL212	2	2.4
SGH0703	1	3.7
LUH5534	2.5	2.1
B11911	1	7.3
REV1184	2	2.5
48-1789	2	3.2
MAR24	2	4.0
MAR303	2	2.6
52-249	1	3.2
Ab-36-1454	2	3.0
KZ1093	2	6.2
MAR17-1041	2	4.5
46-1632	2	3.8
AB5001	2.5	3.5
SGH0783	2	4.1
RES546	5	3.5

Полученный водный супернатант содержал не только различные по молекулярному весу полисахариды, но и низкомолекулярные продукты

деградации. Для их разделения использовали гель-хроматографию на полимерном носителе Fraktogel TSK-40, который действует подобно молекулярному сити. Фракционирование позволило выделить отдельные фракции высокомолекулярного КПС и олигосахаридных продуктов деградации КПС.

Химические методы анализа

Для получения полисахаридов, более удобных для ЯМР-спектроскопического анализа и локализации неуглеводных заместителей (нестехиометрических О-ацетильных групп или остаточного количества ацеталя пировиноградной кислоты после кислотной деградации КПС) КПС с замаскированной регулярностью подвергали химическим модификациям, которые приводили к удалению нестехиометрических заместителей и образованию регулярных полимеров.

Анализ моносахаридного состава

Начальный этап химического анализа КПС заключался в установлении моносахаридного состава. Наиболее распространенный метод заключается в анализе продуктов полного кислотного гидролиза КПС. Поскольку гликозидные связи неодинаковы по своей лабильности, тип кислоты и условия реакции могут варьироваться, но чаще всего используются водные растворы трифторуксусной кислоты различной концентрации. Идентификацию моносахаридов в виде ацетатов полиолов проводили с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ). ГЖХ-анализ позволяет установить относительное содержание моносахаридов в КПС, а при использовании внутреннего стандарта также абсолютные содержания каждого остатка в КПС.

Для определения абсолютных конфигураций моносахаридов анализировали с помощью ГЖХ ацетилированные октилгликозиды, которые получали с помощью оптически активного спирта (2-S-октанола), в сравнении со стандартами, приготовленными из свободных моносахаридов [202].

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 методом гель-хроматографий на геле Fractogel TSK-HW 40S (Рисунок 21).

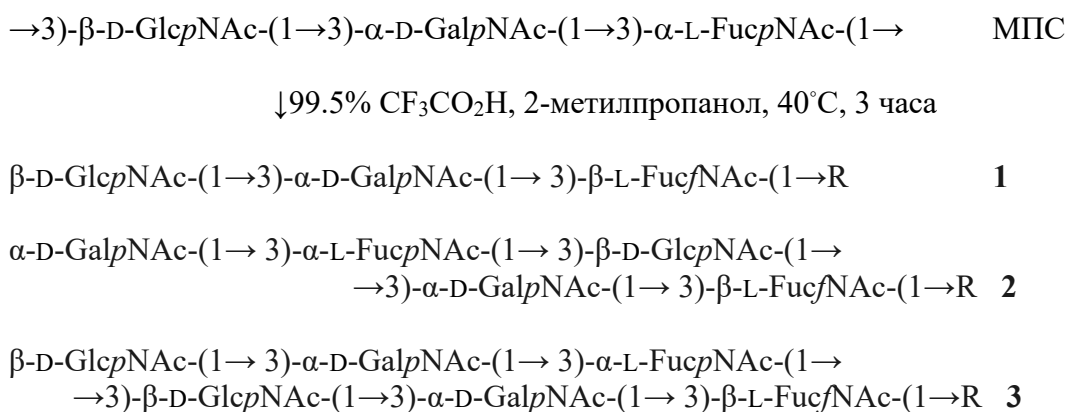


Рисунок 21. Сольволиз модифицированного КПС *A. baumannii* К8. R- изобутил. **О-деацетилирование**

О-ацетильные группы в нестехиометрическом количестве присутствуют в трех исследованных КПС *A. baumannii* типов К3, К26 и К46. Их наличие затрудняло интерпретацию спектров ^1H и ^{13}C ЯМР из-за расщепления сигналов моносахаридов на несколько серий с различной интенсивностью. О-ацетильные группы удаляли из КПС в мягких щелочных условиях действием 12% раствора гидроксида аммония (37 °C, 16 часов). Деацетилированный полисахарид выделяли с помощью гель-проникающая хроматографии.

После отнесения сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР О-деацетилированного полисахарида локализацию О-ацетильных групп в исходном КПС проводили путем сравнения спектров ЯМР О-деацетилированного и исходного полисахаридов. На Рисунке 22 приведены ЯМР спектры $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC для исходного полисахарида *A. baumannii* К3 (А) и деацетированного КПС (В). В данной структуре КПС присутствует 50% О-ацетилирование остатка GlcNAc3NAcA в 4 положении, что приводит к смещению химического сигнала Н4 данного ацетилированного остатка в ЯМР спектрах в аномерную область при $\delta_{\text{H}} 4.95$ (**D'4**), после деацетилирования химический сигнал Н4 смещался до $\delta_{\text{H}} 3.67$. В связи с 50%

степенью О-ацетилирования остатка **D**, в ЯМР спектрах исходного КПС было обнаружено две серии сигналов для остатка **D** (с ОАс) и **D'** (без ОАс), деацетилирование в данном случае было применено так же для удаление этой гетерогенности.

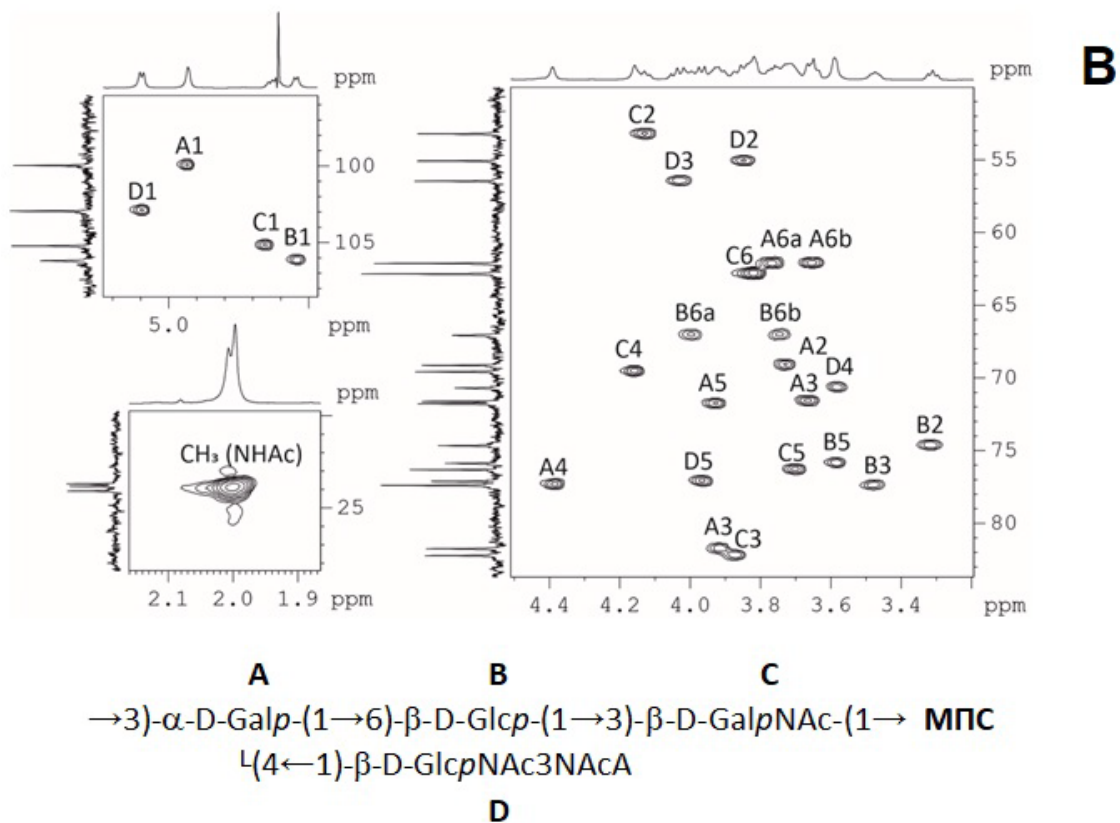
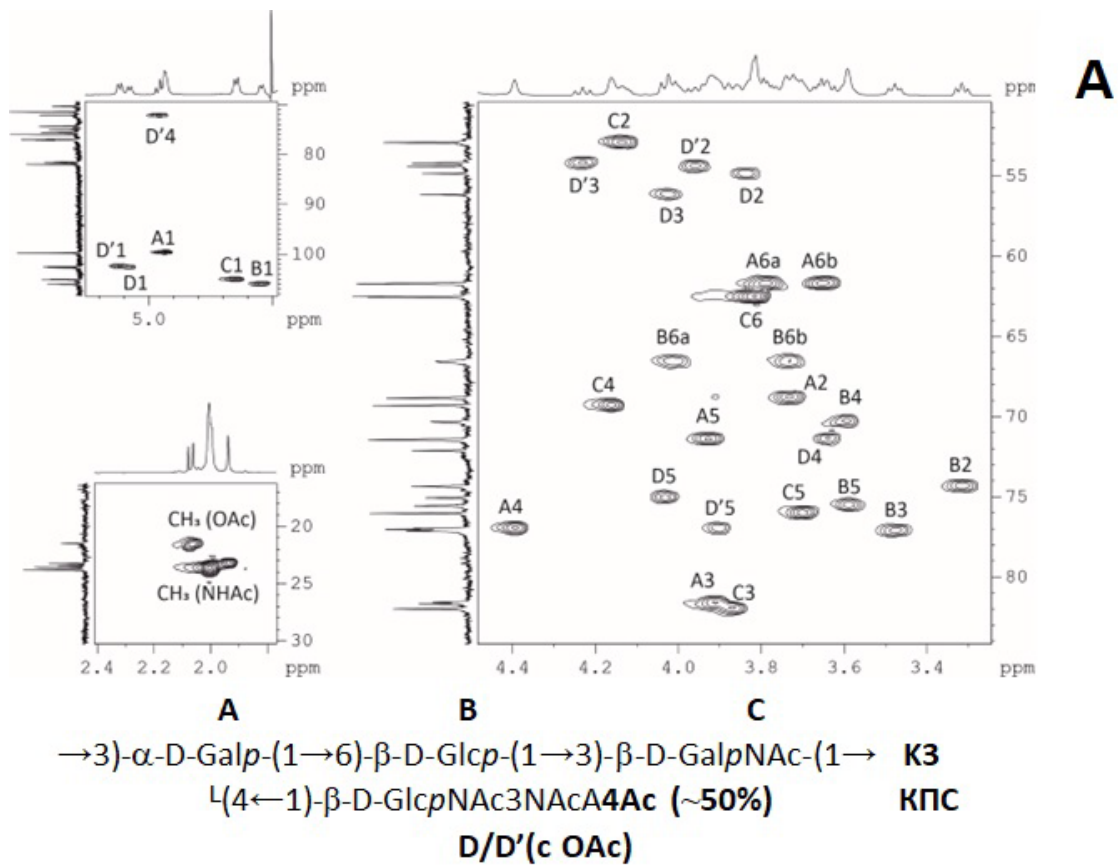


Рисунок 22. А. Структура КПС *A. baumannii* К3 и ¹H,¹³C HSQC спектр КПС К3. **В.** Структура МПС и его ¹H,¹³C HSQC спектр.

Мягкий кислотный гидролиз

В КПС *A. baumannii* типов K20, K21 и K98 остаток пировиноградной кислоты присоединяется к остатку Gal (КПС K20 и K21) (Рисунок 23 а) и GalNAc (КПС K98) (Рисунок 23 б) в положения 4 и 6, образуя 1,3-диоксаноновый цикл (циклический ацеталь).

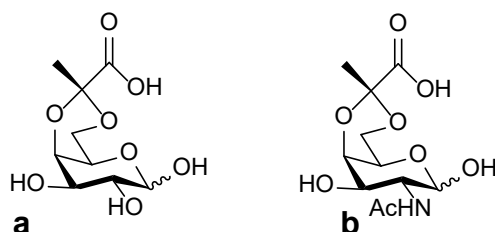


Рисунок 23. Структуры GalRPyr (а) и GalNAcRPyr (б).

Как уже отмечалось, при мягкой кислотной деградации КПС ацеталь частично расщепляется, и в результате КПС теряет свою регулярность. Для установления таких структур полученный нерегулярный полисахарид полностью дезацеталировали путем гидролиза 2% уксусной кислотой в более жестких условиях (100 °С, 6 часов). Положение ацетала пировиноградной кислоты (пирувата) в исходном КПС определяли путем сравнения его спектров ¹H и ¹³C ЯМР со спектрами модифицированного полисахарида, в которых наблюдалось смещение сигналов, ранее связанных с пируватом, в область негликозилованных атомов.

Метод мягкого кислотного гидролиза так же успешно был использован для установления структур КПС, содержащих кислотолабильные моносахаридные остатки, такие как, например, производные 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот, что позволило упростить структуры некоторых полисахаридов в данной работе. 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 псевдааминовой кислоты (Рисунок 24).

ЯМР спектроскопия

Спектроскопия 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, как следствие, на величину химических сдвигов.

В структурном анализе углеводов обычно используют одномерные и двумерные ЯМР эксперименты на ядрах ^1H , ^{13}C и, при наличии фосфатсодержащих заместителей, на ядрах ^{31}P . В составе КПС *A. baumannii* фосфатсодержащих заместителей обнаружено не было.

Одномерная спектроскопия ^1H и ^{13}C ЯМР. Первым этапом спектрального анализа КПС является установление степени его регулярности. В ^1H спектрах ЯМР интегральная интенсивность сигнала соответствует содержанию данного протона в исследуемом соединении. Нерегулярность образца КПС обычно связана с наличием в нестехиометрическом соотношении О-ацетильных или О-ацетальных заместителей или боковых моносахаридных остатков. При установлении такой нерегулярности старались модифицировать КПС химическими методами, удаляя соответствующие заместители. Природу, количество и место присоединения заместителя к молекуле КПС определяли путем сравнения спектров ЯМР регулярного МПС с КПС.

С помощью анализа ^1H спектров ЯМР для КПС можно получить первичную информацию о количестве моносахаридных остатков, присутствие необычных моносахаридов, например производных нонулозоновых кислот, а также наличие неуглеводных заместителей. По числу сигналов аномерных протонов может быть определено количество моносахаридных остатков в повторяющемся звене, поскольку аномерные протоны дезэкранированы двумя атомами кислорода при аномерном атоме углерода и их сигналы смещены в более слабое поле при δ_{H} 4.4–5.5 м.д. по сравнению с химическими сдвигами других протонов в моносахаридных остатках. Также в аномерной области спектра могут локализоваться химические сигналы некоторых неаномерных атомов, например, О-ацетилированных (Рисунок

22А), поэтому окончательный вывод о размере повторяющегося звена можно сделать только после рассмотрения всех ^1H и ^{13}C ЯМР экспериментов. Протоны, присоединенные к атомам углерода, несущие гидроксильный или амидные группы обычно находятся при $\delta_{\text{H}} \sim 3.2\text{--}4.2$ м.д., тогда как метиленовые фрагменты можно наблюдать при $\delta_{\text{H}} \sim 1.6\text{--}2.8$ м.д., метильные протоны N- или O-ацетильных групп появляются в виде синглетов при $\delta_{\text{H}} \sim 2.0\text{--}2.2$ м.д., а метильные протоны б-дезоксигексоз как дублеты при $\delta_{\text{H}} \sim 1.2$ м.д.. Протоны, расположенные в O-ацилированных позициях смещены в положение $\sim 0.5\text{--}1.7$ м.д.

В растворах смеси $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O}$ (9: 1) протоны аминных и амидных групп наблюдаются при $\delta_{\text{H}} \sim 8.0$ м.д., гидроксильных групп при $\delta_{\text{H}} \sim 6.0\text{--}7.0$ м.д. и аномерных OH при $\delta_{\text{H}} \sim 7.0\text{--}8.0$ м.д..

Величины констант спин-спинового взаимодействия (КССВ), которые являются функцией двухгранного угла протонов в H-C-C-H, используются для идентификации моносахаридов, поскольку каждый моносахарид отличается уникальным взаиморасположением гидроксильных групп (аксиальным или экваториальным). Так, например, у α -глюкопиранозида все гидроксильные группы находятся в экваториальном положении, для него все КССВ составляют 9–10 Гц, в то время как α -маннопиранозид, у которого второй заместитель аксиальный, отличается небольшой величиной $J_{2,3} \sim 3$ Гц.

Преимуществом спектроскопии ^{13}C ЯМР является более широкая область резонанса сигналов по сравнению с ^1H ЯМР (менее 10 м.д. для ^1H и более 100 м.д. для ^{13}C) и меньшая зависимость величин химических сдвигов от температуры и pH. Спектры ^{13}C ЯМР (Рисунок 25) также содержат информацию о количестве моносахаридов, их природе и содержании неуглеводных заместителей, однако вместе с тем в них присутствует информация о размере моносахаридных циклов (пиранозных или фуранозных).

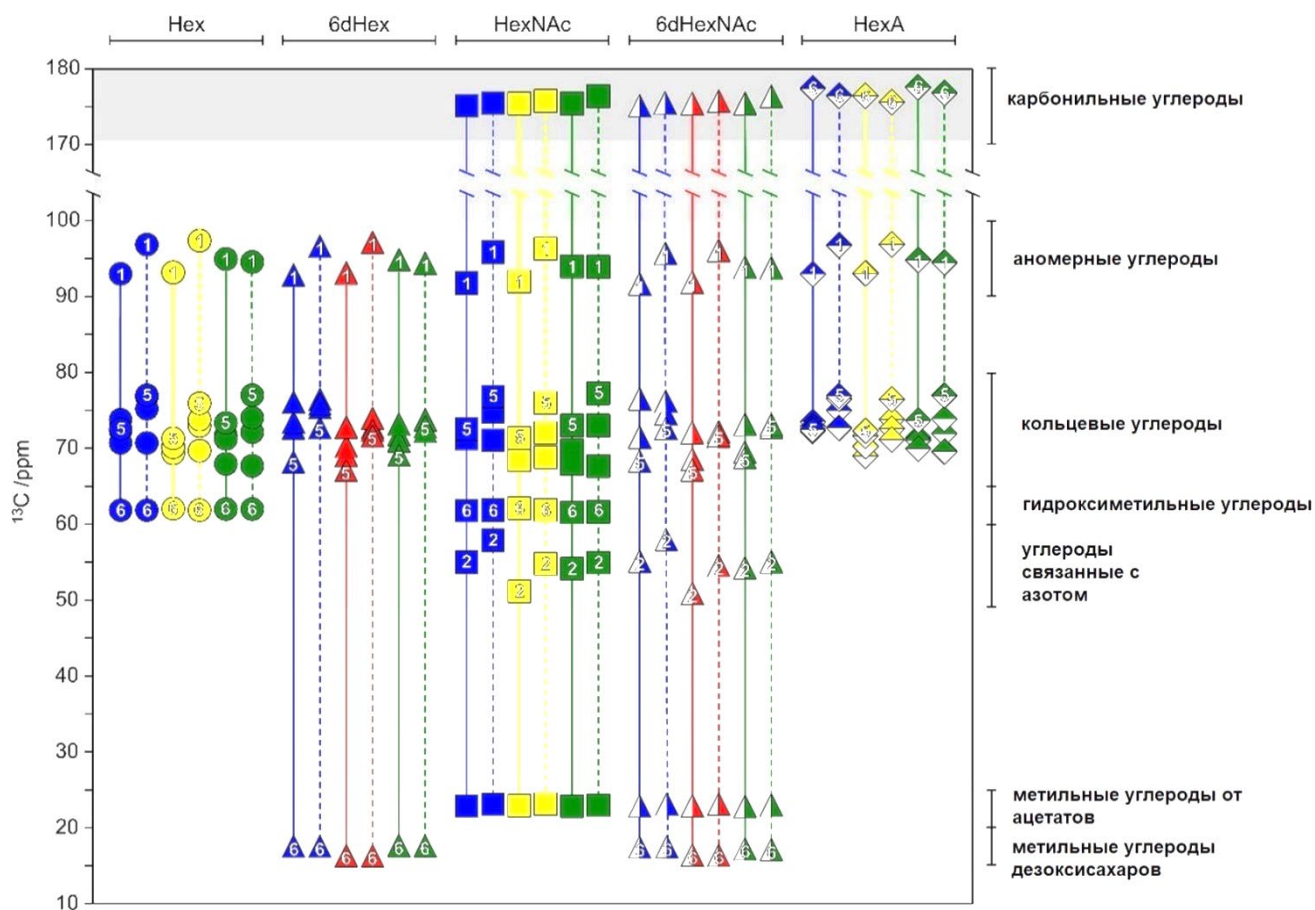


Рисунок 25. Химические сдвиги ^{13}C ЯМР распространенных альдогексапиранозидов [204].

В случае, если в структуре присутствует моносахарид в фуранозной форме, в спектре обнаруживаются сигналы в области 82–89 м.д. [205]. В сложных углеводах часто встречаются аminosахара, которые легко определить по химическому сдвигу углерода при аминогруппе в области 45–58 м.д.. Для определения конфигурации гликозидной связи важен химический сдвиг пятого атома углерода, так как его различие у α - и β -аномеров велико. Спектры ^{13}C ЯМР использовали для определения характера замещения моносахаридов в повторяющемся звене за счет α - и β -эффектов гликозилирования, которые заключаются в смещении химических сдвигов замещенных атомов углерода по сравнению с теми же сигналами в свободных моносахаридах [205,206].

Двумерная спектроскопия ^1H и ^{13}C ЯМР. В спектроскопии сложных углеводов отнесение химических сдвигов в спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР осуществляется с помощью двумерной ЯМР спектроскопии, с помощью которой становится

возможным определением полной структуры КПС. Существуют гомогенные ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY, NOESY) и гетерогенные ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC, HMBC) эксперименты, а также в случае фосфорилированных образцов применяются гетерогенные эксперименты $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ HMQC и $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ HMQC-TOCSY.

Спиновые системы каждого моносахарида в повторяющемся звене выявляют с помощью эксперимента COSY (Correlation spectroscopy), который коррелирует соседние протоны внутри каждого моносахаридного или неуглеводного остатка, в результате чего на спектре возникает кросс-пик (корреляция) (Рисунок 26). Кросс-пик возникает в результате феномена, который называется «перенос намагниченности», присутствие кросс-пика (корреляции) обозначает, что два атомных ядра связаны и имеют два разных значения химического сдвига, которые и дают координаты кросс-пика. Каждое связывание дает два симметричных кросс-пика над и под главной диагональю спектра (Рисунок 26).

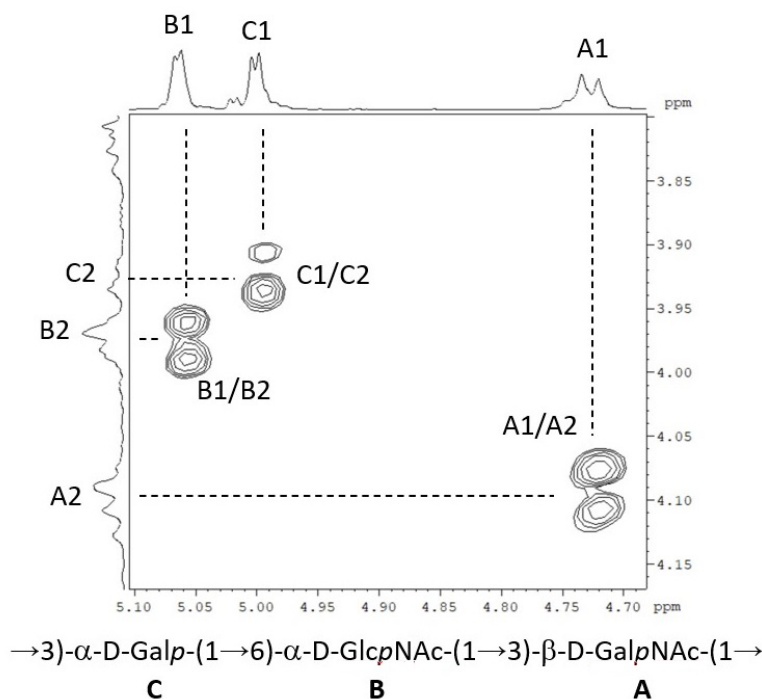


Рисунок 26. Фрагмент двумерного спектра COSY модифицированного полисахарида *A. baumannii* 52-249. Кросс-пики обозначают корреляции аномерных протонов H1 с соседними протонами H2 внутри каждой спиновой системы моносахаридных остатков.

Эксперимент TOCSY (Total Correlation SpectroscopY) коррелирует атомы протонов в замкнутой спиновой системе каждого моносахарида в повторяющемся звене. Эксперименты COSY и TOCSY основаны на принципе препятствия переноса магнетизации, которая является наибольшей между каждой парой аксиальных протонов, поэтому наиболее четкие сигналы выявляются у моносахаридов 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.

Последовательность моносахаридных остатков в повторяющемся звене устанавливается с использованием ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в спектрах NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) и ROESY (Rotation-frame Overhauser Effect Spectroscopy). Эксперименты коррелируют пространственно сближенные друг с другом протоны. Помимо типа замещения моносахаридных остатков в полисахариде с помощью этих экспериментов можно определить конфигурацию аномерного атома в каждом моносахаридном остатке, так в сахарах с β -конфигурацией аномерного атома, аномерный протон H1 пространственно сближен с H3 и H5, в связи с чем на спектрах появляются кросс-пики H1/H3 и H1/H5, а в α -связанных моносахаридах присутствует корреляция H1 с H2, кросс-пики H1 с H3 и H5 отсутствуют.

Эксперименты ЯЭО так же могут использоваться для определения присоединения N-заместителей аминсахаров на основании пространственных корреляций их протонов с соответствующими NH-протонами. Так, например, для определения положения N-ацильных заместителей спектр $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY КПС В11911 со структурой, показанной на Рисунке 27, снимали в смеси $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O}$ (9:1), что позволило детектировать сигналы протонов, связанные 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 $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY: NH5/H-3акс,3эkv,4,5 и NH7/H-6,7,8,9. В спектр $^1\text{H}, ^1\text{H}$

ROESY наблюдались корреляции NH2 GalN и NH5 Pse с группами NAc при δ 7.93/2.03 и 7.82/2.02 м.д. , соответственно, и NH7 Pse с H2 группы NHb (Hb – 3-гидроксибутаноил) при δ 7.70/2.35 м.д..

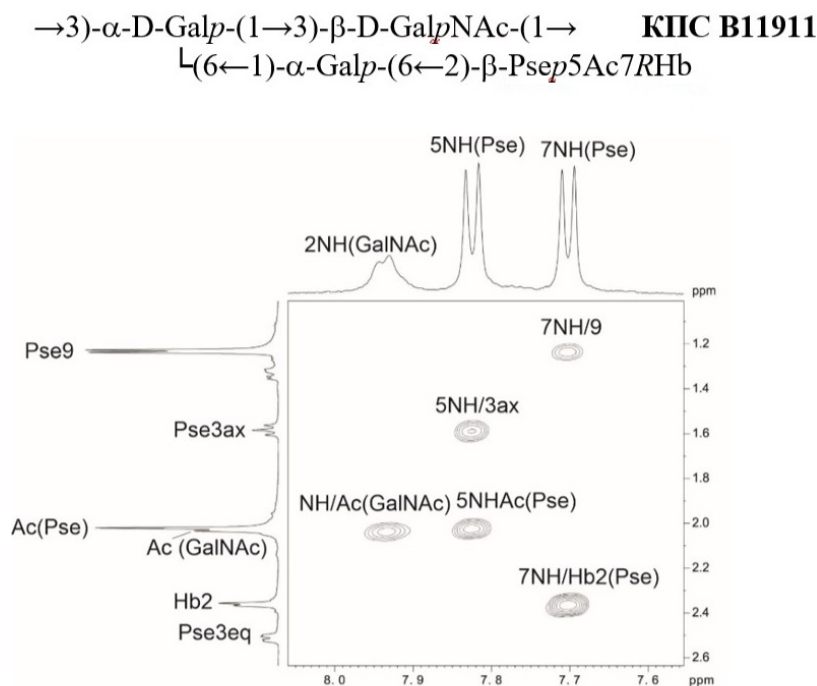


Рисунок 27. Структура КПС *A. baumannii* B11911 (K93) и фрагмент спектра ^1H , ^1H ROESY КПС *A. baumannii* B11911 (K93), проведенный в смеси $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1). Hb-(*R*)3-гидроксибутаноил.

При помощи гетероядерного эксперимента ^1H , ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Coherence) устанавливали отнесение химических сдвигов в ^1H и ^{13}C ЯМР спектрах, по корреляциям химических сдвигов углеродов и связанных с ними протонов. В гетероядерном эксперименте ^1H , ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Heteronuclear) присутствовали корреляции атомов углерода и протонов, разделенные двумя или тремя связями, который также, как и ЯЭО, позволяют определить последовательность замещения моносахаридов в повторяющемся звене и могут использоваться для локализации N-ацильных и амидных заместителей.

Масс-спектрометрия высокого разрешения

Для подтверждения строения олигосахаридов, полученных избирательным расщеплением КПС, проводили определение их молекулярной массы методом ИЭРМС высокого разрешения. Для олигосахаридов, содержащих кислотные компоненты (гексуроновые и нонулозоновые кислоты), регистрировали отрицательные ионы, для нейтральных олигосахаридов – положительные ионы.

Генетика биосинтеза капсульного полисахарида

Анализ секвенированных генных кластеров К-типов выполнялся в сотрудничестве с австралийскими партнерами (Центр иммунологии и инфекционного контроля Австралия, Брисбен) путем сравнения секвенированных генных кластеров с нуклеотидными последовательностями, представленными в доступной онлайн базе данных GenBank с использованием онлайн программы BLAST и с учетом полученных данных о строении КПС.

Биосинтез КПС (Рисунок 28) начинается на цитоплазматической стороне внутренней мембраны с образования UndPP-связанного моносахарида (стадия инициирования) (Рисунок 29) [207].

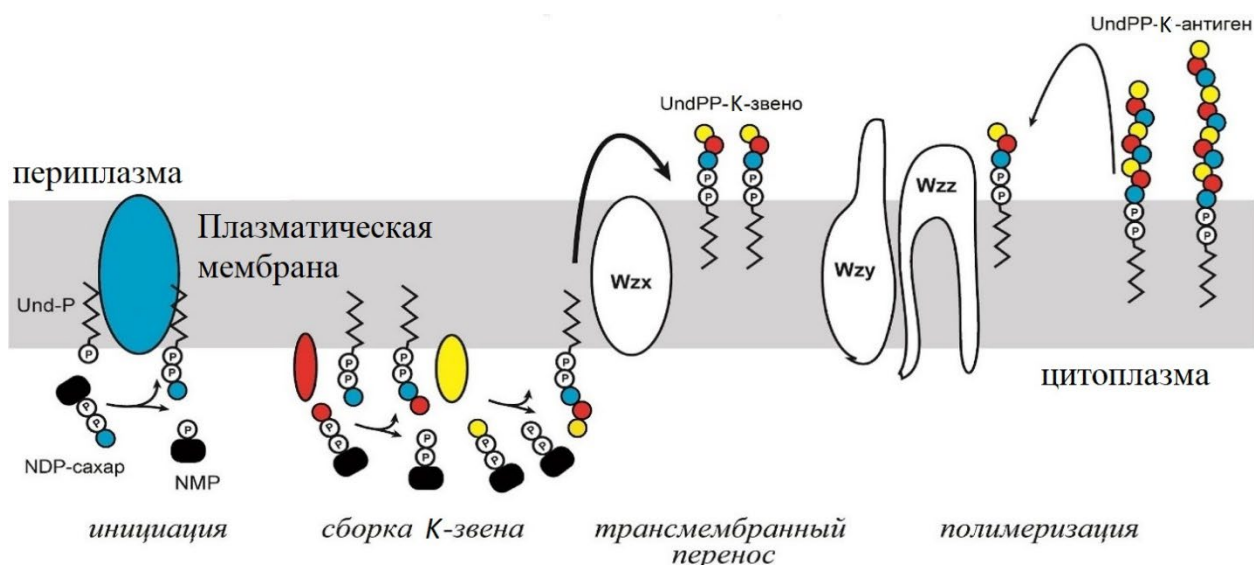


Рисунок 28. Схематичное представление Wzy-зависимого пути биосинтеза КПС [207].

Ундекапренилфосфат служит субстратом-акцептором для иницирующей гликозилфосфаттрансферазы – интегрального мембранного белка, который катализируют перенос 1-фосфата моносахарида из нуклеотидного

предшественника на UndP с образованием UndPP-связанного моносахарида (Рисунок 29). К-звено собирается на первом моносахариде, связанном с ундекапренилфосфатом, последовательным переносом остальных моносахаридных остатков к растущей цепи с помощью гликозилтрансфераз.

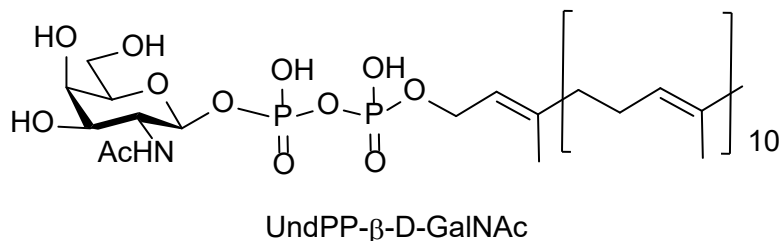


Рисунок 29. Ундекапренилдифосфат-связанный GalNAc.

Далее К-звено на липидном носителе -ундекапренилдифосфате переносится на переплазматическую сторону внутренней мембраны с помощью флиппазы Wzx, где происходит его согласованная полимеризация с помощью полимеразы Wzy и регулятора длины цепи Wzz. Полимераза Wzy катализирует сборку КПС путем переноса восстанавливающего конца растущего полисахарида с липидного носителя UndPP на невосстанавливающий конец UndPP-связанного К-звена с образованием новой гликозидной связи [207]. Большинство генов, вовлеченных в синтез КПС, сгруппированы в кластер, который располагается на определенном участке кольцевой хромосомы бактерии. Генный кластер кодирует ферменты для синтеза нуклеотидных предшественников компонентов данного полисахарида, гликозилтрансферазы для последовательного присоединения моносахаридов и белки процессинга, необходимые для переноса собранного К-звена через внутреннюю мембрану и его последующей полимеризации.

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 (Рисунок 30).

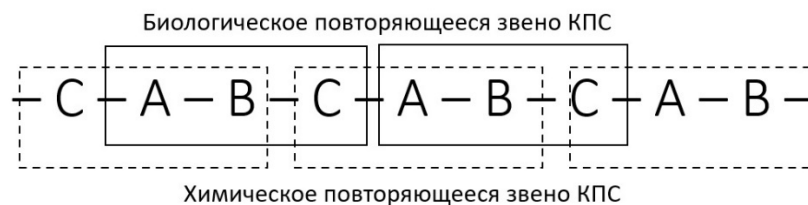


Рисунок 30. Различие между химическим и биологическим звеном КПС.

В качестве первого сахара в случае КПС *A. baumannii* чаще всего выступал моносахаридный остаток GalNAc (Рисунок 29), 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.

3.2. Состав и строение капсульных полисахаридов *Acinetobacter baumannii*

КПС *A. baumannii* типов 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 повторяющихся углеводных звеньев. Повторяющееся звено КПС *A. baumannii* типов, изученных в данной работе, включает от 4 до 6 моносахаридных остатков и имеет как линейную, так и разветвленную структуру с боковой цепью. В боковой цепи присутствует от 1 до 2 моносахаридных остатков (Таблица 4).

Таблица 4. Структуры КПС *Acinetobacter baumannii*, установленные в настоящей работе.

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

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 \downarrow (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 \downarrow (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 \downarrow (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 \downarrow (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 \downarrow (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 \downarrow (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 \downarrow (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 \downarrow (6 \leftarrow 1)- β -GalpNAc-(6 \leftarrow 1)- β -Glc _p
K139	MAR17- 1041	$\rightarrow 4$)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glc _p -(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (6 \leftarrow 1)- β -D-Glc _p
K144	46-1632	$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc _p A-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc _p NAc-(1 \rightarrow
K135	RES546	$\rightarrow 3$)- α -D-Glc _p NAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc _p NAc-(1 \rightarrow \downarrow (6 \leftarrow 1)- α -D-Galp-(6 \leftarrow 2)- β -8ePsep5Ac7Ac
K218	52-249	$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc _p NAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow \downarrow (6 \leftarrow 2)- α -Psep5Ac7Ac

Как видно из Таблицы 5 наиболее часто в структурах КПС *Acinetobacter baumannii* встречаются остатки D-Glc (**a**) (в 9 из 25 структур КПС), D-Gal (**b**) (13), D-GlcNAc (**t**) (16) и D-GalNAc (**u**) (13) (Рисунок 30). Из гексасахаридов и гексааминосахаридов самыми редкими представителями являются D-Man (**c**), D-QuiNAc (**g**) и его производные (D-Qui4NAc (**i**), D-QuiNAc4NAc (**j**), D-QuiNAc4Hb (**k**)), L-6dTal (**f**), L-6dTal4Ac (Рисунок 30). Довольно редко присутствуют уроновые кислоты D-GalNAcA (**s**), D-ManNAcA (**o**), D-GlcA (**m**), D-GalA (**n**) и D-GlcNAc3NAc4OAcA (**q**). Моносахариды в полисахаридах *A. baumannii* присутствуют исключительно в пиранозной форме.

Таблица 5. Компонентный состав КПС *A. baumannii*.

Компоненты	Сокращение	Частота встречаемости
Моносахаридный остаток		
D-глюкоза	D-Glc	9
D-галактоза	D-Gal	13
D-галактоза-4,6-пируват	D-Gal4,6RPyт	3
D-манноза	D-Man	1
6-дезоксид-L-манноза	L-Rha	3
6-дезоксид-L-талоза	L-6dTal	2
4-ацил-6-дезоксид-L-талоза	L-6dTal4Ac	1
2-ацетамидо-2-дезоксид-D-глюкоза	D-GlcNAc	16
2-ацетамидо-2-дезоксид-D-галактоза	D-GalNAc	13
2-ацетамидо-2,6-дезоксид-L-галактоза	L-FucNAc	5
2-ацетамидо-2,6-дезоксид-D-галактоза	D-FucNAc	5
3-ацетамидо-3,6-дезоксид-D-галактоза	D-Fuc3NAc	1
2-ациламино-2,6-дезоксид-D-глюкоза	D-QuiNAc	1
4-ациламино-4,6-дезоксид-D-глюкоза	D-Qui4NAc	1
2,4-ациламино-2,4,6-дезоксид-D-глюкоза	D-QuiNAc4NAc	1

2-ациламино-4-(3-гидроксибутаноил)- 2,6-дезоксид-D-глюкоза	D-QuiNAc4Hb	2
D-глюкуроновая кислота	D-GlcA	3
2,3-ацетамидо-4-ацил-2,3-дезоксид-D- глюкуроновая кислота	D-GlcNAc3NAc4AcA	1
2-ацетамидо-2-дезоксид-D- галактуриновая кислота	D-GalNAcA	1
5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид- D-глицеро-L-альтро-нон-2-улозоновая кислота	8eAci5Ac7Ac	1
5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид- L-глицеро-L-альтро-нон-2-улозоновая кислота	Aci5Ac7Ac	1
5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид- D-глицеро-D-галакто-нон-2- улозоновая кислота	Leg5Ac7Ac	2
5,7-диацетамидо-4-(3-S- гидроксибутаноил)-3,5,7,9- тетрадезоксид-D-глицеро-D-галакто-	Leg5Ac7SHb	1
5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид- L-глицеро-L-манно-нон-2-улозоновая	Pse5Ac7Ac	2
5-ацетамидо-7-(3-R- гидроксибутаноил)-3,5,7,9- тетрадезоксид-L-глицеро-L-манно-нон-	Pse5Ac7RHb	1
5,7-диацетамидо-4-ацил-3,5,7,9- тетрадезоксид-L-глицеро-L-манно-нон-	Pse5Ac7Ac4Ac	1
5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид- D-глицеро-L-манно-нон-2-улозоновая	8ePse5Ac7Ac	1
Неуглеводные заместители		
O-ацетил	OAc	4

(R)-ацеталь пировиноградной кислоты	<i>R</i> -Pyr	4
3-(S/R)-гидроксибутаноил	Hb	4

Некоторые полисахариды включают в себя также неуглеводные заместители, такие как О-ацетат (КПС KZ1098, NIPH329 и AB5001), 3-гидроксибутаноил (КПС BAL097, A388, G21 и B11911) и 4,6-ацеталь пировиноградной кислоты (КПС LUN5534, REV1184, G21 и A388). (*R*)-ацеталь пировиноградной кислоты является типичным компонентом КПС. Наиболее часто этот заместитель находится в положении O4 и O6 остатков D-Glc (**a**), D-Gal (**b**) или D-Man (**c**), которые могут быть как терминальными, так и входить в состав основной цепи КПС. В данной работе пируват был обнаружен только в *R*-конфигурации и исключительно в 4,6 положении моносахаридов, имеющих β -галакто конфигурацию (в одном КПС в остатке β -GalNAc (**t**) и в трех КПС в β -Gal (**b**)). 3-гидроксибутаноил в двух случаях (КПС A388 и G21) присутствует в *S*-конфигурации при N4 положении QuiNAc4NAc (**j**) и в *R*-конфигурации в двух случаях при N7 Leg5Ac7Ac и Pse5Ac7Ac (КПС BAL097 и B11911, соответственно). О-ацетатная группа присутствует в четырех КПС в остатках Leg5Ac7Ac, Pse5Ac7Ac, GlcNAc4NAcA (**q**) и 6dTal (**f**). Во всех случаях заместитель присутствует в положении C4.

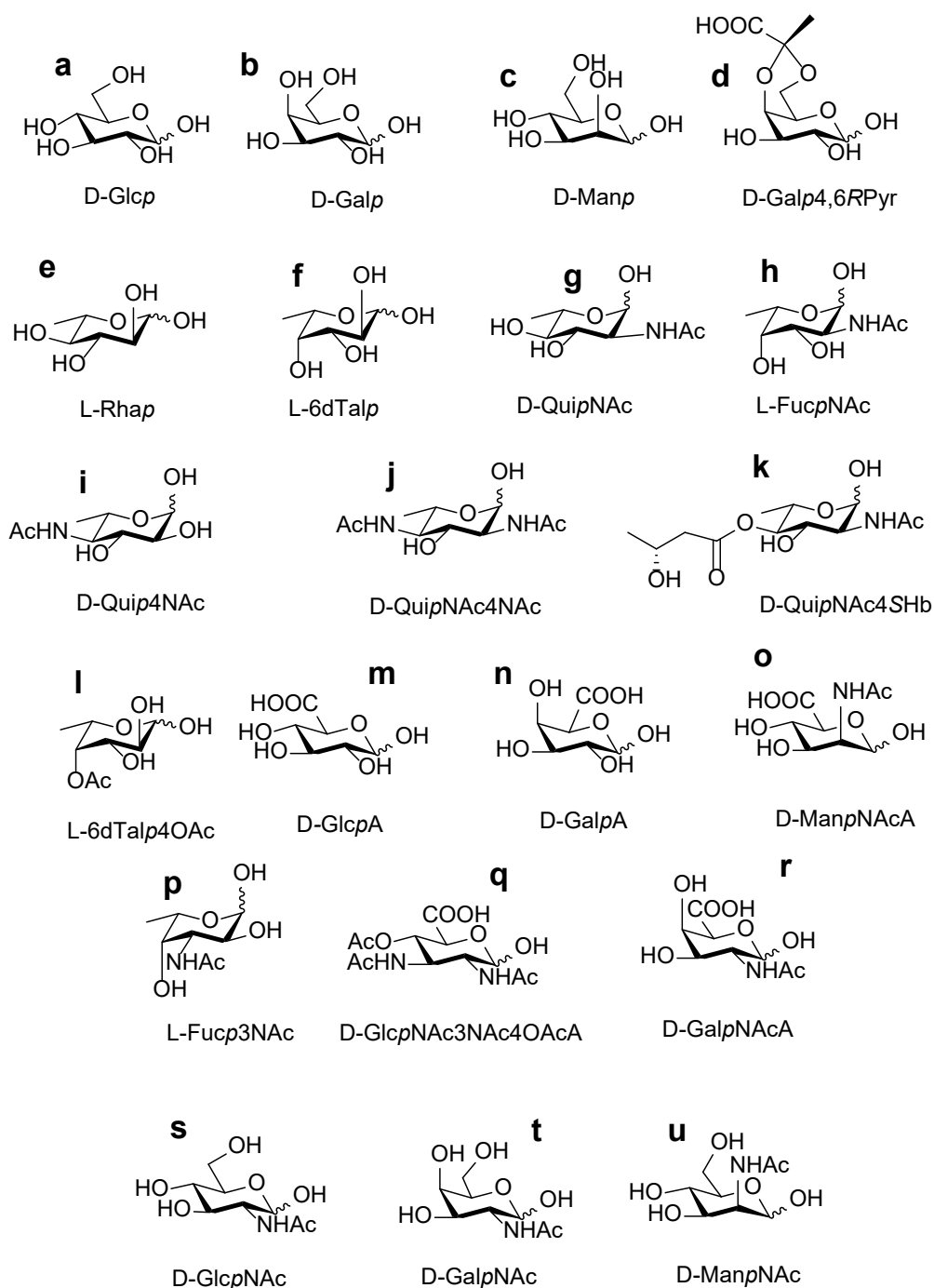


Рисунок 30. Моносахариды, обнаруженные в КПС *A. baumannii* в данной работе.

В структурах девяти КПС (K5, K13, K46, K54, K58, K73, K93, K121 и K135), изученных в данной работе, встречаются представители высших сахаров – 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксигонно-2-улозоновые кислоты. Нонулозоновые кислоты представляют собой семейство кислых кетозов, содержащих девять атомов углерода и включающих различные родственные структуры. В основном они изучаются на предмет их значимости для клеток животных и патогенных бактерий.

N-ацетилнейраминовая кислота является наиболее распространенным представителем нонулозоновых кислот в биологических образцах. Она играет важную роль в процессах распознавания и стабилизации биомолекул [208]. У животных N-ацетилнейраминовая кислота отвечает за очень важные физиологические процессы, такие как клеточное распознавание и передачу сигналов между нейронами, а также отвечает за распространение метастазов раковых клеток по кровеносным сосудам [209]. У патогенных бактерий нонулозоновые кислоты способствуют задержке иммунного ответа хозяина за счет имитации участка гликозилирования хозяина [210].

Примечательно, что остаток нонулозоновой кислоты в КПС *A. baumannii*, описанных в данной работе, находится исключительно в боковой цепи полисахарида и замещается в С6 положение α -Gal (в семи КПС) или α -GalNAc (в КПС RCH52 и BAL097). В настоящей работе встречаются следующие производные нонулозовых кислот: псевдаминавая (Pse5Ac7Ac), легионаминавая (Leg5Ac7Ac), ацинетаминавая (Aci5Ac7Ac), 8-эпиацинетаминавая (8eAci5Ac7Ac), а также 8-эпипсевдаминавая кислота (8ePse5Ac7Ac) (Рисунок 31).

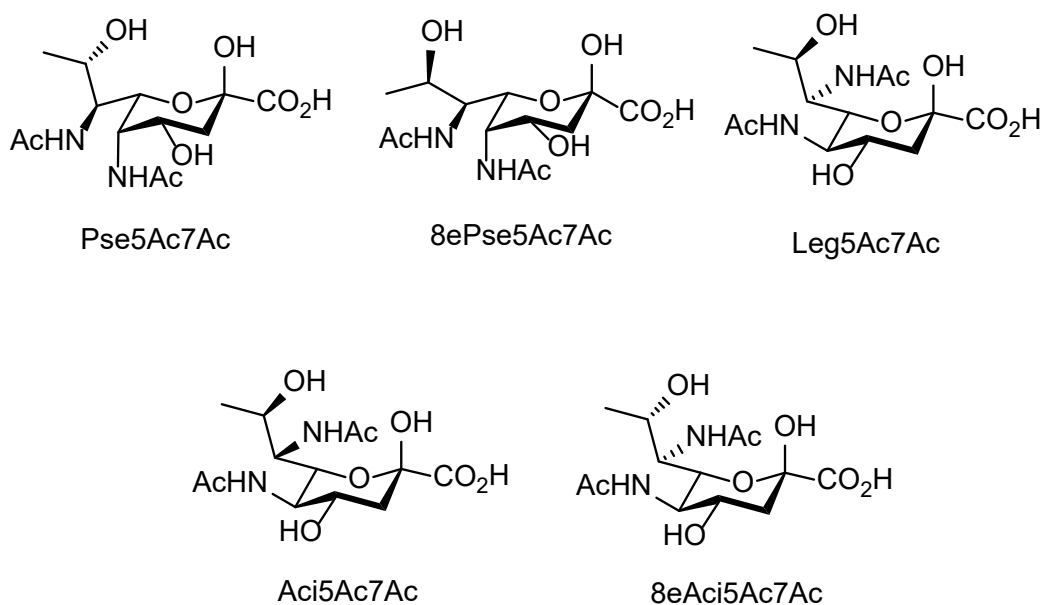


Рисунок 31. Производные нонулозоновых кислот, обнаруженные в составе КПС *A. baumannii*.

Ацинетаминовая кислота была впервые обнаружена в 2015 году в составе КПС штамма D36 *A. baumannii* [211]. В то время как C8-эпимер ацинетаминовой кислоты ($\delta\epsilon\text{AcI}$) впервые обнаружен в составе КПС SGH0703 в 2017 году в данной работе, ранее в природе этот остаток не встречался. 8-Эпипсевдаминовая кислота впервые обнаружена в КПС *A. baumannii* RES546 также в настоящей работе [212].

3.3. Структуры капсульных полисахаридов *A. baumannii*

Структуры КПС, как было написано выше в главе 3.2., состоят их широко распространенных для бактериальных полисахаридов остатков гексоз, гексозаминов, дезоксисахаров и уроновых кислот в пиранозной форме. В данной работе моносахариды в фуранозной форме не встречаются. Наиболее интересно обнаружение в КПС *A. baumannii* редких нон-2-улозоновых кислот, некоторые из них были обнаружены в *A. baumannii* впервые в данной работе, поэтому именно их изучению в работе уделено особое внимание.

3.3.1 Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*, содержащие нон-2-улозоновые кислоты

Отличительной особенностью КПС некоторых типов *A. baumannii* является присутствие в их составе изомеров 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот. В этих бактериях обнаружено большинство найденных до сих пор в природе изомеров (кроме 4-эпилегионаминовой кислоты). Наиболее распространенными являются псевдаминовая (L-глицеро-L-манно-изомер, Pse) и легионаминовая (D-глицеро-D-галакто-изомер, Leg) кислоты. Кроме того, присутствуют ацинетаминовая кислота (L-глицеро-L-альтро-изомер, AcI), получившая тривиальное название по родовому названию бактерий, и эпимеры по C8 псевдаминовой и ацинетаминовой кислот (D-глицеро-L-манно- и D-глицеро-L-альтро-изомеры, $\delta\epsilon\text{Pse}$ и $\delta\epsilon\text{AcI}$, соответственно). К-типы КПС *A. baumannii*, содержащие 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновые кислоты, приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Присутствие 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот в КПС различных типов *Acinetobacter baumannii*.

Конфигурация	Аббревиатура	Тривиальное название	К-тип
L-глицеро-L-манно	Pse	Псевдаминовая кислота	К46, К90, К93, К218
D-глицеро-L-манно	8ePse	8-эпипсевдаминовая кислота	К135
D-глицеро-D-галакто	Leg	Легионаминовая кислота	К8, К54,
L-глицеро-L-альтро	Aci	Ацинетаминовая кислота	К13
D-глицеро-L-альтро	8eAci	8-эпиацинетаминовая кислота	К73

На протяжении нескольких лет в лаборатории химии углеводов №21 была разработана общая схема установления строения КПС *A. baumannii* (Рисунок 32), которая включает выделение КПС *A. baumannii* из сухих бактериальных клеток с помощью водно-фенольной экстракции по методу Вестфала [201] с последующим удалением белков и нуклеиновых кислот обработкой 50% раствором трихлоруксусной кислоты. Для уменьшения вязкости раствора КПС для дальнейших исследований с помощью ЯМР спектроскопии образцы КПС подвергали кислотному гидролизу 2% уксусной кислотой и последующей гель-жидкостной хроматографии. Работали далее с высокомолекулярной фракцией КПС.

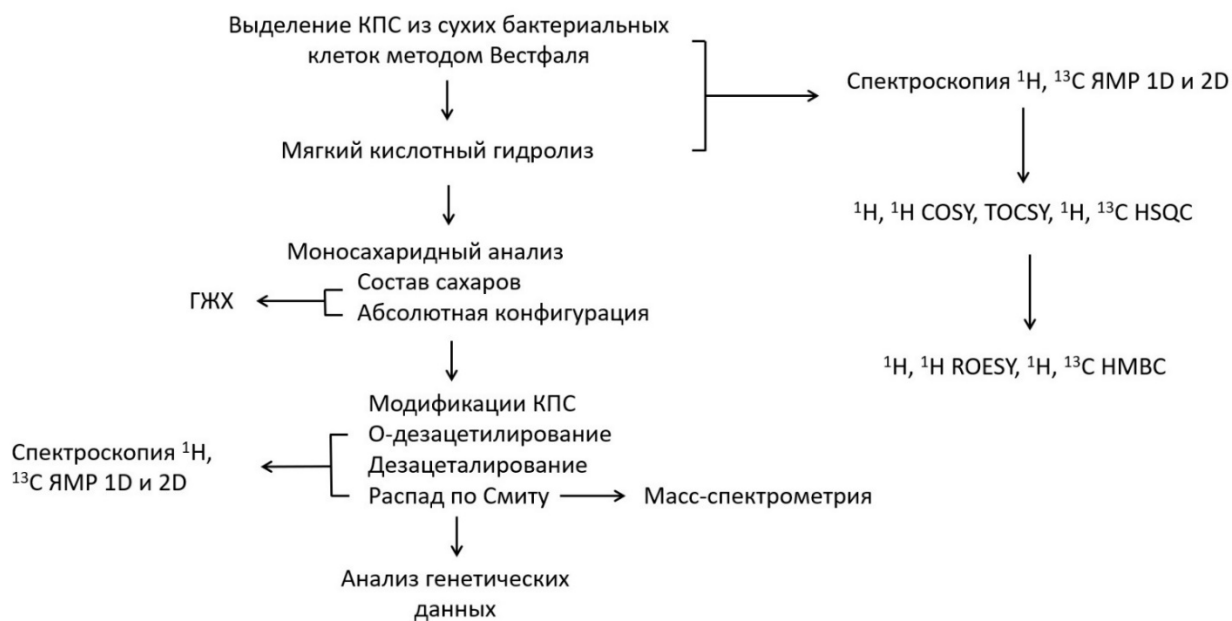


Рисунок 32. Общая схема изучения структур КПС *A. baumannii* в данной работе.

Далее следовало установление моносахаридного состава КПС после его полного гидролиза с помощью ГЖХ в виде ацетатов полиолов. Абсолютную конфигурацию моносахаридных остатков, входящих в состав КПС, определяли с помощью ГЖХ после превращения их в ацетаты (*S*)-октилгликозидов.

Из анализа аномерной и сильнополюсной области ^1H и ^{13}C ЯМР спектров можно было сделать заключение о наличии в КПС необычных моносахаридных остатков и неуглеводных заместителей и, таким образом, определить предположительное количество и природу компонентов повторяющегося звена КПС. Данные об абсолютной конфигурации и локализации часто встречающихся в КПС *A. baumannii* остатков нонулозоновых кислот были получены в результате сравнительного анализа ^1H и ^{13}C ЯМР спектров исходного КПС и его модифицированного производного (МПС), образующегося с помощью мягкого кислотного гидролиза, который приводил к частичному или полному расщеплению кислотоллабильных связей остатков нонулозоновых кислот.

Характер замещения и взаимное расположение моносахаридных остатков в полисахаридной цепи определяли с помощью методов одномерной и двумерной ЯМР спектроскопии. При необходимости дополнительно проводили избирательное расщепление КПС для получения олигосахаридных фрагментов,

строение которых подтверждало установленную структуру. Строение получившихся олигосахаридных фрагментов устанавливали с помощью ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

КПС *A. baumannii* 52-249 (K218) [213]

КПС был выделен методом Вестфаля, как было описано выше. Для определения моносакхаридного состава КПС *A. baumannii* 52-249 проводили его полный кислотный гидролиз, боргидридное восстановление и ацетилирование. В результате анализа полученной смеси ацетатов полиолов с помощью метода ГЖХ были идентифицированы Gal, GlcN и GalN в соотношении ~1.6:1.2:1.0 (Рисунок 33).

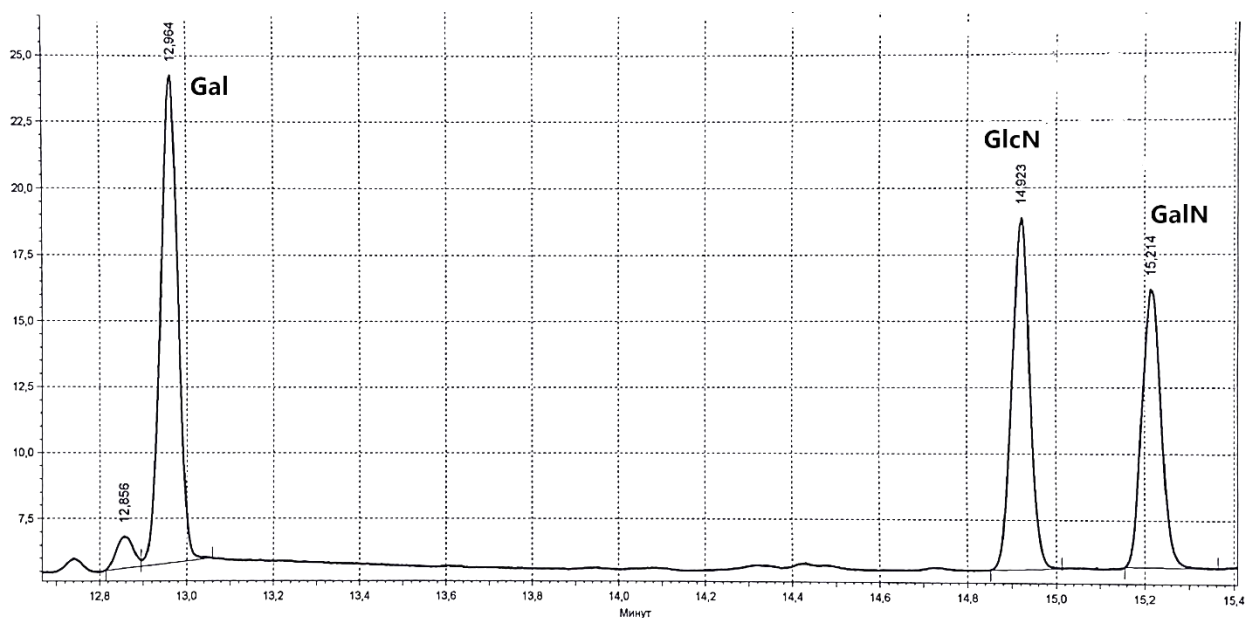


Рисунок 33. ГЖХ хроматограмма смеси ацетилированных полиолов, полученных из КПС *A. baumannii* 52-249.

Определение абсолютных конфигураций моносакхаридов проводили методом ГЖХ. Анализировали ацетилированные октилгликозиды, полученные в результате полного кислотного гидролиза КПС и последующего октанолиза с (*S*)-2-октанолом в присутствии безводной трифторукусной кислоты в каталитических количествах с последующим ацетилированием [202]. В качестве соединений сравнения использовали диастереомеры ацетилированных гликозидов соответствующих моносакхаридов с (*S*)- и (*R*)-октанолом.

Первичная информация о КПС и его модификация

КПС был проанализирован с помощью ЯМР спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C . Сигналы были уширены, что затрудняло их отнесение. Уширение сигналов было вероятно связано с высокой вязкостью раствора, поэтому образец полисахарида выдерживали в 2% уксусной кислоте 1 час при нагревании и затем очищали с помощью гель-проникающей хроматографии на геле Sephadex G-50 Superfine.

Для высокомолекулярной фракции, полученной после гель-жидкостной хроматографии КПС была проведена серия одномерных и двумерных экспериментов на ядрах ^1H , ^{13}C (Рисунок 34), включая двумерные эксперименты ^1H , ^1H COSY, ^1H , ^1H ROESY, ^1H , ^{13}C HMBC, ^1H , ^{13}C HSQC (Рисунок 35)). Спектр ^{13}C ЯМР (Рисунок 34) не содержал сигналов при ~ 21 м. д., что свидетельствовало об отсутствии в КПС О-ацетильных групп, таким образом, структурная гетерогенность, повлиявшая на уширение сигналов ЯМР полисахарида, не была связана с нестехиометрическим О-ацетилированием. Однако спектр содержал сигнал в области 35-40 м.д., в которой резонируют 3-дезоксигруппы (CH_2) нонулозоновых кислот с кислотолабильными гликозидными связями, которые могли частично расщепиться при мягком кислотном гидролизе КПС.

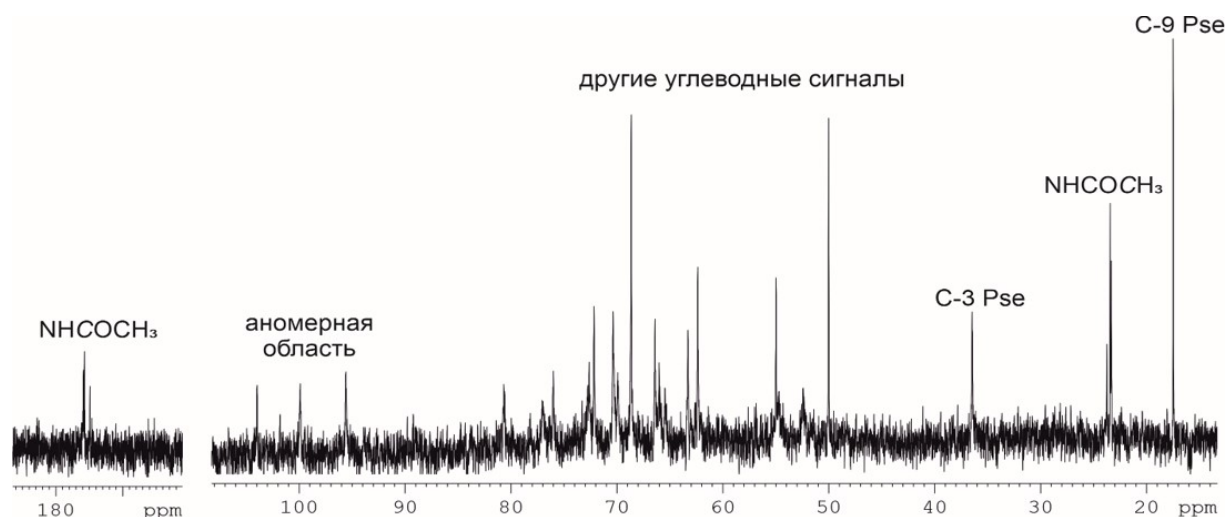


Рисунок 34. Спектр ^{13}C ЯМР КПС *A. baumannii* 52-249.

Поскольку нестехиометрическое присутствие сигналов нонулозоновой кислоты в ЯМР спектрах затрудняло установление полной структуры, КПС был подвергнут дополнительному гидролизу 2% раствором уксусной кислоты в

течение 5 часов, после охлаждения реакционная смесь была подвержена центрифугированию и очищена с помощью метода гель-жидкостной хроматографии на колонке с гелем TSK-40.

Гликозидная связь нонулозоновой кислоты характеризуется типичной для 2-кето-3-дезоксальдоновых кислот высокой кислотоллабильностью, что позволяет использовать для структурного анализа соответствующих КПС селективное расщепление этой связи мягким кислотным гидролизом. При этом, если в КПС остаток нонулозоновой кислоты содержится в основной цепи КПС, то в результате гидролиза образуются олигосахариды, а в случае его расположения в боковой цепи – модифицированные полисахариды, свободные от нонулозоновой кислоты. Сравнение спектров ЯМР исходных КПС и продуктов их селективного кислотного гидролиза позволяет установить место присоединения нонулозоновой кислоты в полисахариде.

Изучение структуры модифицированного полисахарида (МПС)

Структуру получившегося модифицированного полисахарида (МПС) определяли методом одномерной и двумерной ЯМР спектроскопии. Спектр ^1H выявил наличие трех аномерных сигналов при δ 4.74 – 5.07 м.д.. Спектр ^{13}C ЯМР МПС содержал сигналы трех аномерных атомов углерода при δ 95.5 – 103.9, трех C-CH₂O групп при δ 62.3, 66.1, 62.3 (C6 Gal, GlcN и GalN, соответственно), двух CH-NH групп при δ 54.5 и 52.3 (C2 GlcN и GalN, соответственно), двух CO групп при δ 175.7 и 175.9 (2 NAc), двух CH₃ при δ 23.2 и 23.6 (2 NAc) и сигналы других атомов углерода моносахаридов при δ 68.7 – 80.6 (Приложение, Таблица П1).

С помощью спектров ^1H , ^1H COSY и ^1H , ^1H TOCSY были выявлены три спиновые системы каждого моносахарида в повторяющемся звене МПС, которые были обозначены как остатки **A**, **B** и **C**, находящиеся в пиранозной форме. Таким образом, можно было сделать вывод о том, что повторяющееся звено МПС 52-249 состоит из трех моносахаридных остатков. Спектр ^1H , ^1H TOCSY (Рисунок 35) продемонстрировал следующие корреляции: H1/H2-H3 для остатка **C**, H1/H2-H4 для остатка **A** и H1/H2-H6 для остатка **B**. Остатки, у которых наблюдались корреляции H1 с H2 – H4 или H2 – H3, были отнесены к *галакто*-конфигурации,

так как КССВ $J_{3,4} < 2$ Гц в данном случае, что свидетельствует об экваториальной ориентации Н4, а остаток, содержащий корреляции Н1/Н2–Н6, к глюко-конфигурации.

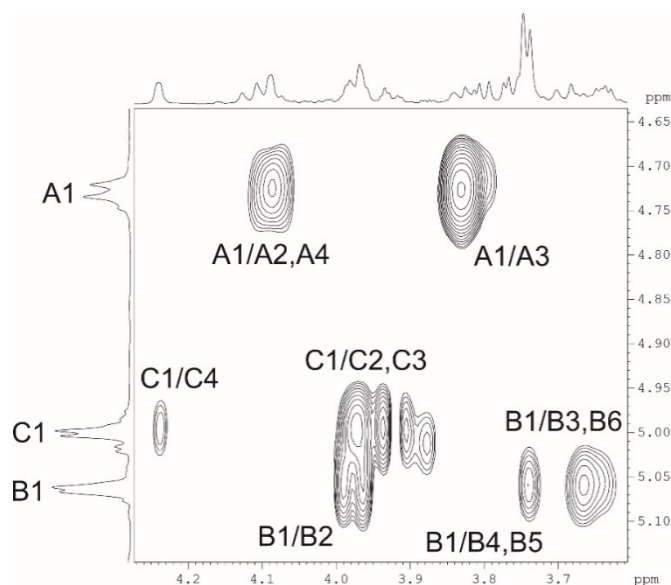


Рисунок 35. Фрагмент спектра ^1H , ^1H TOCSY МПС *A. baumannii* 52-249 без псевдаминовой кислоты.

Относительно большие константы $J_{1,2} \sim 7-8$ Гц свидетельствовали о том, что остаток **С** имеет β -конфигурацию, меньшее значение $J_{1,2}$ (< 4 Гц) указывало на α -конфигурацию остатков **А** и **В**. С помощью гетероядерного эксперимента ^1H , ^{13}C HSQC (Рисунок 36) были соотнесены между собой химические сдвиги протонов и углеродов, связанных друг с другом непосредственно связью С-Н. Сигналы С2 аминокетоз резонировали в типичной для них области при 55-57 м. д.. Таким образом, на данном этапе можно было сделать вывод, что остаток **А** является α -Gal, **В** – α -GlcNAc и **С** – β -GalNAc.

Положение в слабом поле сигналов С3 остатков **А** и **С** и С6 остатка **В** при δ 80.6, 76.9 и 66.1, соответственно, по сравнению с химическими сдвигами этих сигналов незамещенных моносахаридов, показало, что остатки **А** и **С** являются С3-замещенными, а остаток **В** – С6-замещенным [205].

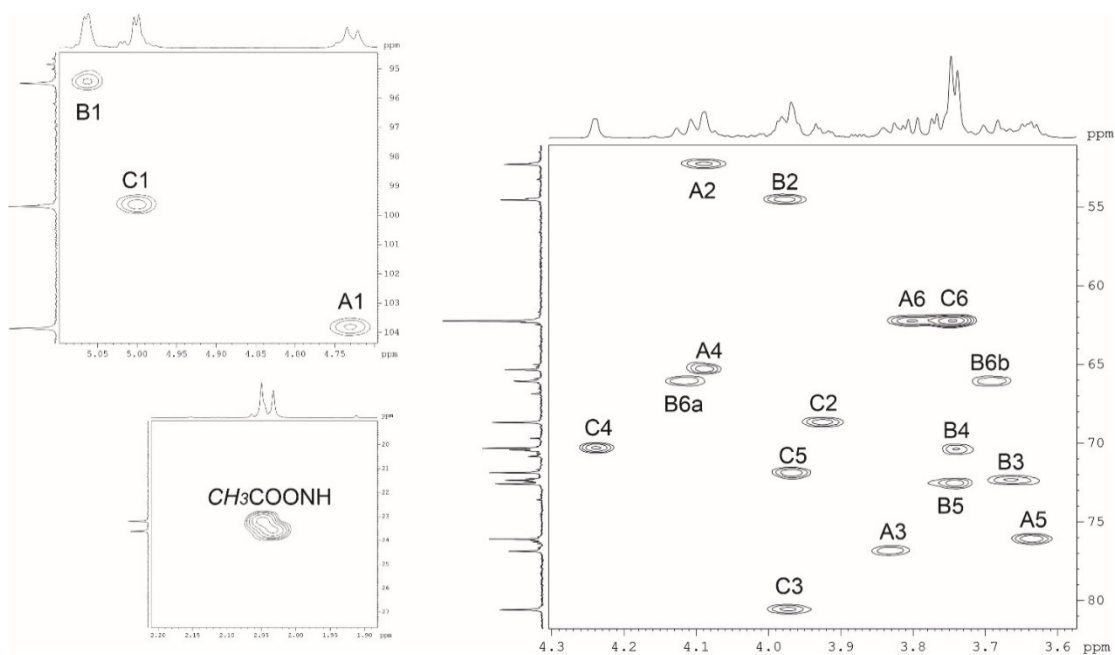


Рисунок 36. Фрагменты спектра ^1H , ^{13}C HSQC МПС *A. baumannii* 52-249.

В спектре ^1H , ^{13}C НМВС (Рисунок 37) были обнаружены следующие корреляции, с помощью которых было установлено повторяющееся звено МПС: C1 (A)/H6 (B), C1 (B)/H3 (C) и C1 (C)/H3 (A) при δ 99.7/3.75, 95.5/3.84 и 103.9/3.98, соответственно.

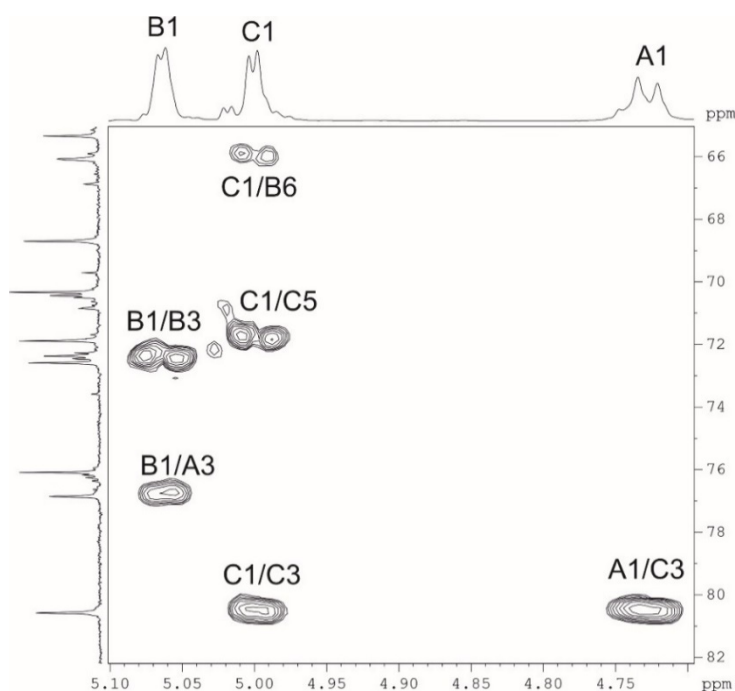


Рисунок 37. Фрагмент спектра ^1H , ^{13}C НМВС МПС *A. baumannii* 52-249.

Таким образом, было установлено строение повторяющегося звена основной цепи МПС, полученного после гидролиза КПС *A. baumannii* 52-249 (Рисунок 38):



Рисунок 38. Структура МПС, полученного в результате кислотного гидролиза КПС *A. baumannii* 52-249.

Структура исходного КПС

Исходный КПС отличается от МПС наличием бокового остатка нонулозоновой кислоты, который обозначен как остаток **D**. Он был отнесен к псевдаминовой кислоте по характерным химическим сдвигам C3 и C9 при δ 36.5 и 17.9 м.д., которые заметно отличаются от таковых у других изомеров нонулозоновых кислот [214]. Абсолютную конфигурацию нонулозоновой кислоты *L-глицеро-L-манно* устанавливали бездеструктивным путем на основании известных закономерностей, описывающих влияние соседних моносахаридов с известной конфигурацией на химические сдвиги ^{13}C ЯМР [205,206]. В ^1H ЯМР спектре исходного КПС присутствовали следующие характерные сигналы для псевдаминовой кислоты: H3акс и H3экв при δ 2.08 и 1.58, H9 при δ 1.14. В спектре ^{13}C (Рисунок 39) присутствовали сигналы при δ 75.8 (C1), 101.9 (C2), 36.5 (C3), 55.1, 50.0 (CH-NH (C7, C5)) и 17.5 (C9).

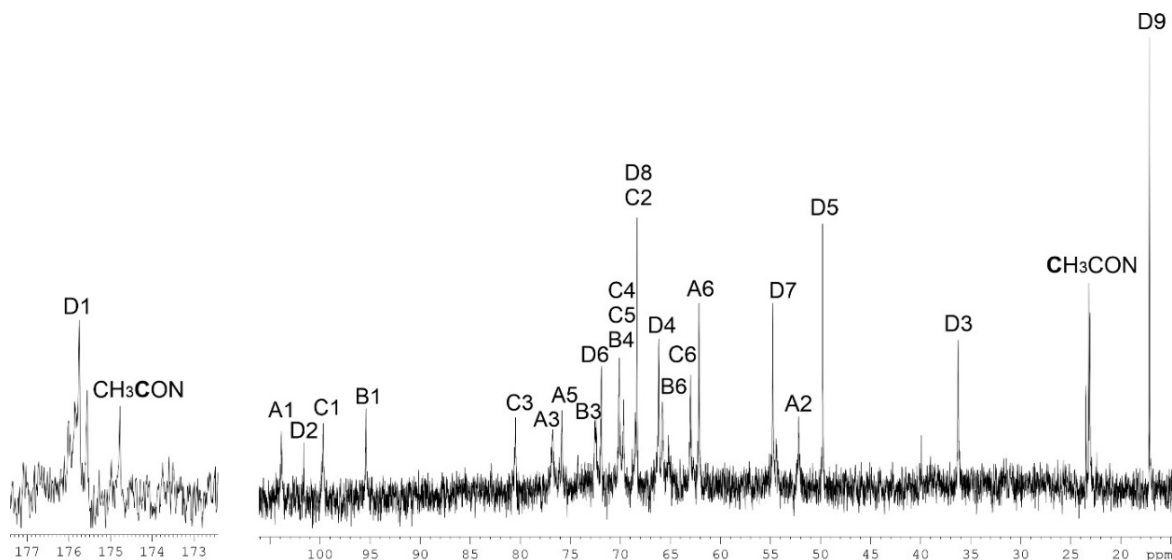


Рисунок 39. Спектр ^{13}C КПС *A. baumannii* 52-249

α -Конфигурация псевдаминовой кислоты (экваториальная ориентация карбоксильной группы) следовала из относительно маленького различия между

химическими сдвигами H3акс и H3экв (0.5 м.д.) в ^1H , ^{13}C HSQC спектре (Рисунок 40) [214]. Для синтетически выделенной α -Pse это значение составляет 0.21 м.д., а для β -Pse 0.86 м.д. [214]. Что было подтверждено химическим сдвигом C6 (72.2 м.д.) [для синтетической α -Pse сигнал C6 находится при 71.4 м.д., а для β -Pse 74.3] [214].

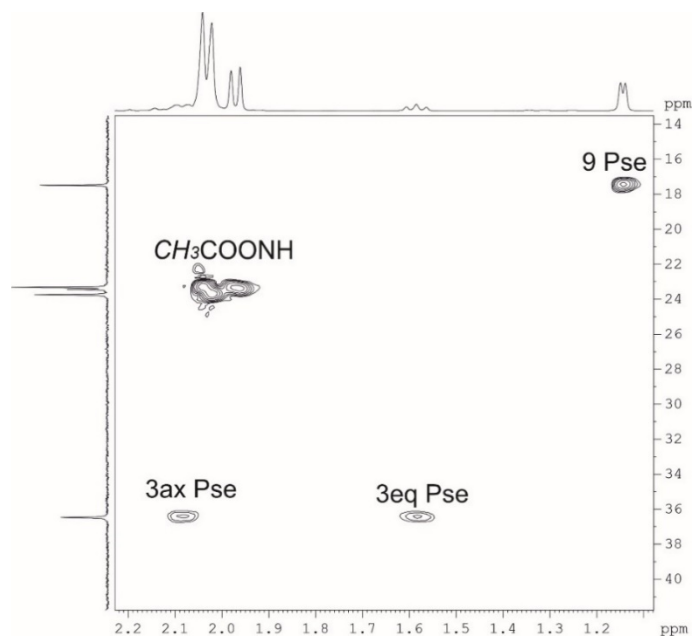


Рисунок 40. Фрагмент спектра ^1H , ^{13}C HSQC КПС *A. baumannii* 52-249.

Место локализации остатка α -Pse5Ac7Ac было установлено с помощью гетероядерного эксперимента ^1H , ^{13}C HMBC (Рисунок 41), где была обнаружена корреляция C2 (D)/ H6 (A) при δ 101.9/ 3.49, что соответствует связи α -Pse5Ac7Ac-(2 \rightarrow 6)- α -Gal.

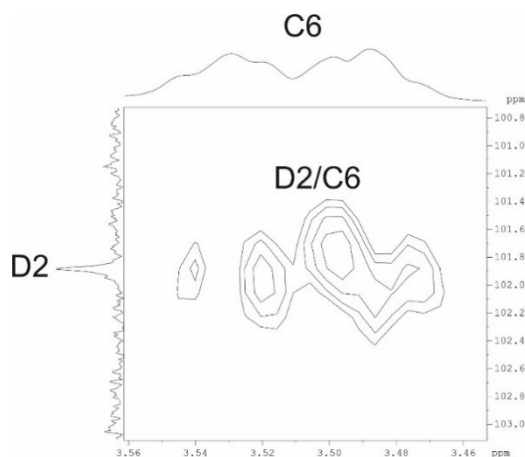


Рисунок 41. Фрагмент спектра ^1H , ^{13}C HMBC КПС *A. baumannii* 52-249.

Структура КПС *A. baumannii* 52-249, таким образом, состоит из основной цепи, состоящей из трисахаридного повторяющегося звена, и боковой цепи псевдаминовой кислоты (Рисунок 42).

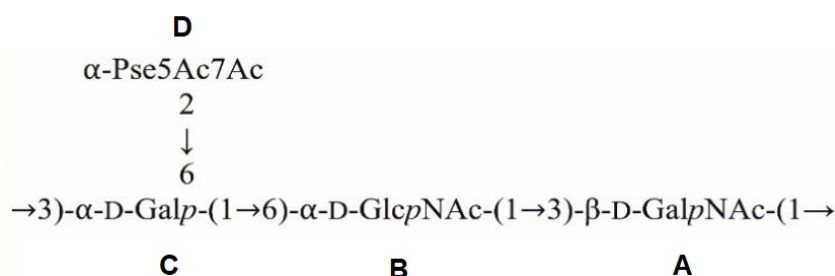


Рисунок 42. Структура КПС *A. baumannii* 52-249.

В результате гидролиза из КПС был удален лабильный остаток псевдаминовой кислоты, в результате реакции был получен линейный МПС, что так же подтверждает структуру (Рисунок 43).

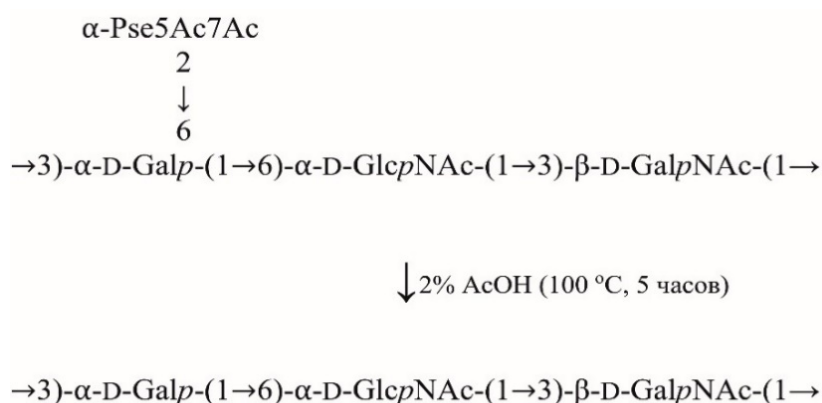


Рисунок 43. Модификация КПС *A. baumannii* 52-249.

Распад по Смитсу КПС

Структуру повторяющегося звена КПС подтверждали методом периодатного окисления по Смитсу. Ожидалось, что распад по Смитсу приведет к окислению остатка GlcNAc (**В**) и получению олигосахарида, показанного на Рисунке 44.

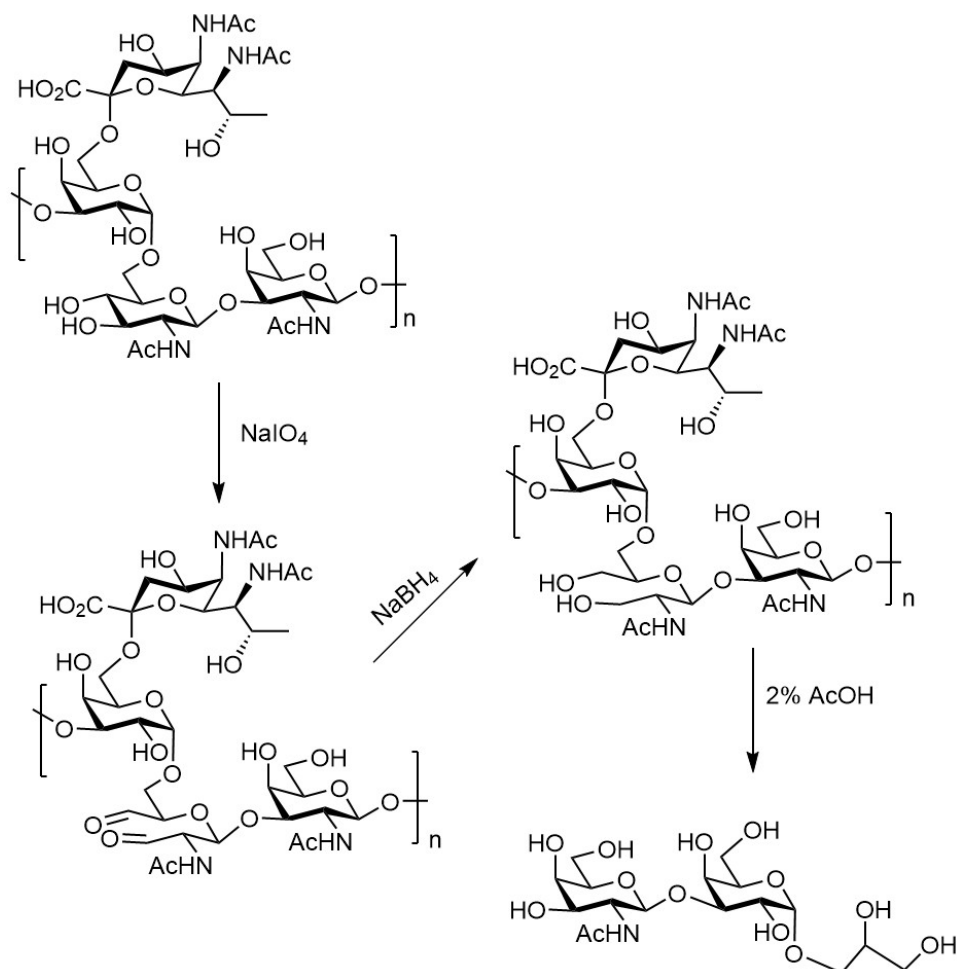


Рисунок 44. Распад по Смитсу КПС *A. baumannii* 52-249.

После проведения периодатного окисления, боргидридного восстановления, обессоливания с помощью гель-жидкостной хроматографии на геле TSK-40 и гидролиза, продукты реакции были разделены с помощью гель-жидкостной хроматографии. На хроматограмме отсутствовал пик полисахарида и присутствовал пик, характерный для олигосахарида небольшой массы.

Двумерные ЯМР спектры олигосахарида (^1H , ^1H TOCSY, ^1H , ^1H ROESY и ^1H , ^1H COSY) показали наличие двух спиновых систем для остатков **A** и **C**, аналогичных тем, что были представлены в КПС. Спектр ^1H , ^{13}C HSQC содержал группу сигналов при $\delta_{\text{C/H}}$ 62.3 / 3.77 (C3/H3), 63.8 / 3.69, 3.64 (C2/H2) и 69.8 / 3.77, 3.60 (C1/H1), которые относились к остатку глицерина (**B'**) в олигосахариде. Типы замещения были выявлены с помощью гетероядерного эксперимента ^1H , ^{13}C HMBC, в котором были обнаружены сигналы H1 (C)/C3 (A) и H1 (A)/ C1(B'). Таким

образом, был получен ожидаемый олигосахарид. Структуру олигосахарида подтверждали масс-спектрометрией высокого разрешения. В HR ESI масс-спектре (Рисунок 45) присутствовал пик иона $[M-H]^-$ при m/z 456,1718 (рассчитанный для $C_{17}H_{31}NO_{13}$, m/z 456,1723), что подтверждает структуру олигосахарида (Рисунок 43).

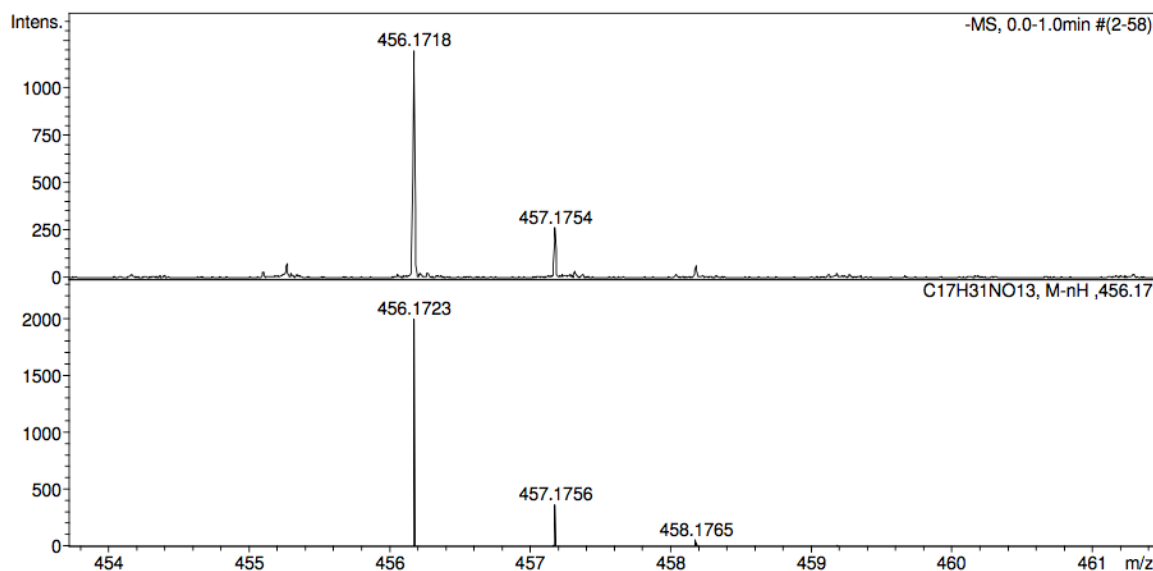


Рисунок 45. Масс-спектр высокого разрешения с ионизацией

электрораспылением и регистрацией аниона олигосахарида *A. baumannii* 52-249.

Генетика биосинтеза КПС K218

Анализ секвенированных генных кластеров различных К-типов выполнялся в сотрудничестве с австралийскими партнерами (Центр иммунологии и инфекционного контроля, Австралия, Брисбен). 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.

Как было показано выше, КПС K218 включает трисахаридную основную цепь $\rightarrow 3)-\alpha-D-Galp-(1\rightarrow 6)-\alpha-D-GlcpNAc-(1\rightarrow 3)-\beta-D-GalpNAc-(1\rightarrow$, которая оказалась идентичной структуре КПС *A. baumannii* K46 [215]. Этот общий сегмент был обусловлен присутствием одинаковых генов *wzy*, *gtr14*, *gtr15* и *itrA2* в соответствующих генных кластерах KL46 и KL218 (Рисунок 46). Поскольку *ItrA2* является известной D-GalpNAc-1P иницилирующей трансферазой и в основной цепи

полисахарида присутствует только один остаток D-GalpNAc, этот остаток является первым сахаром в биологическом звене КПС K218. Белки Wzy из KL46 и KL218 были идентичны друг другу на 93% поэтому, как и в случае KL46, Wzy отвечал за образование связи β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp между К-звеньями.

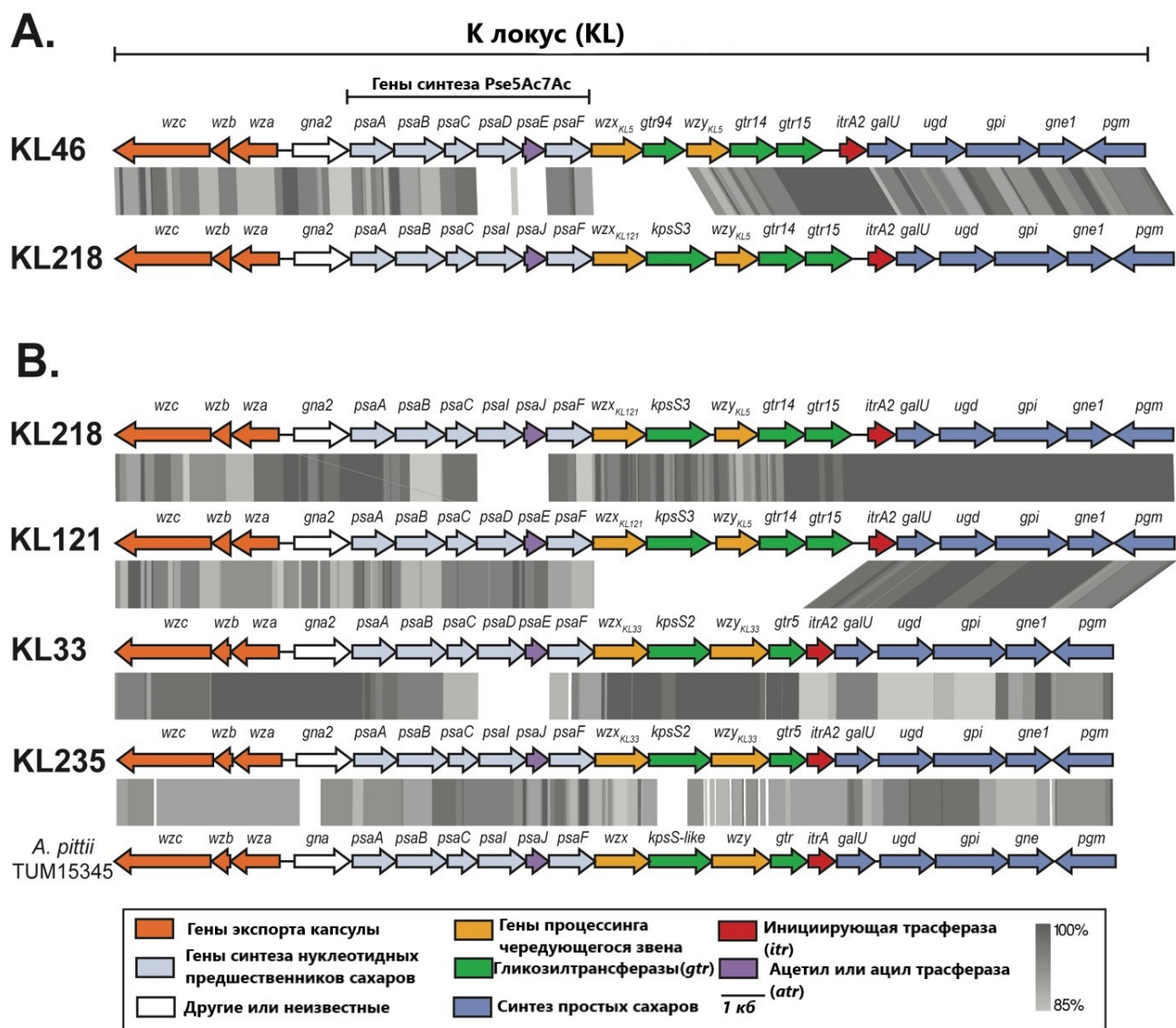


Рисунок 46. (A) Сравнение KL218 с близкородственным кластером генов биосинтеза КПС KL46 из *A. baumannii* NIPH 329 [215]. (B) KL218 и KL235 с *psaIJ* по сравнению с родственными кластерами генов KL121 и KL33. Цвета генов указывают на предсказанные функциональные категории генных продуктов. Серая заливка обозначает идентичность последовательности продукта гена (85-100%), определенную tblastx с использованием Easyfig [216].

Две другие гликозидные связи в основной цепи были образованы гликозилтрансферазами Gtr14 и Gtr15. Ранее было предсказано, что Gtr14 и Gtr15 образуют связи α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-GlcpNAc и α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)-D-GalpNAc, соответственно, в структуре K46 [215]. Поскольку повторяющееся звено КПС K218 включает тот же трисахаридный фрагмент α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-GalpNAc, Gtr14 и Gtr15 были отнесены к соответствующим связям.

Третий ген гликозилтрансферазы, расположенный между *wzx* и *wzy*, был обозначен как *kpsS3*. KpsS3 имел 50% идентичность аминокислотной последовательности с KpsS1 из KL2, в котором он отвечал за образование связи α -Pse5Ac7Ac-(2 \rightarrow 6)-D-Glcp в КПС K2 [20]. KpsS3 был также на 46.6% идентичен последовательности с KpsS2 из KL33, который образует связь α -Pse5Ac7Ac-(2 \rightarrow 6)-D-Galp в КПС K33, а также на 46.82% идентичен последовательности KpsS2 из KL42, который образует α -Pse5Ac7Ac-(2 \rightarrow 4)-D-Ribp в КПС K42 [40]. Хотя два известных белка KpsS2 образуют разные связи, последовательности из KL33 и KL42 были идентичны на 94.54%. Поскольку остаток α -Pse также присутствует в КПС K218, предполагалось, что KpsS3 будет новым KpsS-типом, ответственным за образование связи α -Pse5Ac7Ac-(2 \rightarrow 6)-D-Galp в КПС K218. Таким образом с помощью анализа генного кластера была подтверждена структура КПС *A. baumannii* K218 (Рисунок 43).

КПС *A. baumannii* B11911 (K93) [217]

КПС B11911 был выделен стандартным способом. Сравнение спектров ^1H и ^{13}C ЯМР для КПС до и после мягкого кислотного гидролиза показало, что кислотная обработка не привела к структурным изменениям КПС. Моносахаридный анализ КПС методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов выявил присутствие Gal и GalN в соотношении 1: 0.5. ГЖХ-анализ ацетилированных (*S*)-2-октилгликозидов показал, что Gal и GalN имеют D-конфигурацию.

В ^1H ЯМР спектре КПС присутствовали сигналы трех аномерных протонов при δ 4.48-4.97, двух C-CH₂-C групп при δ 1.57, 2.50 (H3акс, H3экв Pse) и 2.35 (2 H, H2 NHb), двух CH₃-C групп при δ 1.22 (H9 Pse и H4 NHb) и двух NAc групп при δ 2.02

и 2.03. Спектр ^{13}C ЯМР КПС (Рисунок 47) содержал сигналы четырех аномерных атомов углерода при δ 100.1-106.0, двух C-CH₂-C групп при δ 37.1 (C3 Pse) и δ 46.4 (C2 NHb), четырех CH₃-C групп при δ 19.2, 23.6 (2 C) и 23.8 (C9 Pse, C4 NHb и C2 2 NAc), трех C-CH₂O групп при δ 62.5, 65.1 и 67.9 (C6 GalN и двух остатков Gal, соответственно), одной CНОН-C группы при δ 66.3 (C3 NHb), трех СН-NH групп при δ 49.9, 54.9 и 53.0 (C5 и C7 Pse, C2 GalN), четырех СО групп при δ 174.1-176.2 (C1 Pse, NHb и 2 NAc) и сигналы других атомов углерода моносахаридов при δ 68.1-82.7 (Приложение. Таблица П2).

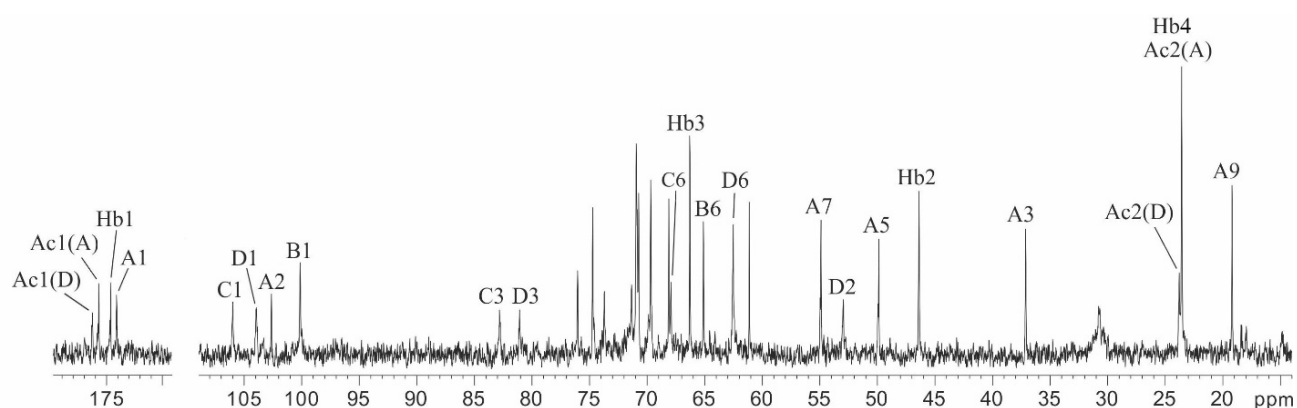


Рисунок 47. Спектр ^{13}C ЯМР КПС *A. baumannii* В11911 после кислотного гидролиза.

Эти данные свидетельствуют о том, что КПС состоит из тетрасахаридных К-звеньев, содержащих два остатка D-Gal и по одному остатку D-GalN и Pse. Две аминогруппы аминасахаров N-ацетилированы и одна аминогруппа N-ацилирована (*R*)-3-гидроксибутаноильной группой.

^1H ЯМР спектр КПС был расшифрован с помощью двумерных экспериментов $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY и $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY. Были выявлены четыре спиновые системы моносахаридных остатков: **A** (β -Psep), **B** (α -Galp), **C** (β -Galp) и **D** (β -GalpN), находящиеся в пиранозной форме. В частности, моносахариды были идентифицированы на основании кросс-пиков в спектре TOCSY: H3акс/H-4,5, H3экв/H-4,5 и H9/H-8,7,6 для остатка **A**, H1/H-2,3,4 для остатков **B**, **C** и **D**, в сочетании с корреляциями между соседними протонами моносахаридных остатков, выявленными в эксперименте COSY. Корреляции H1/H5 для остатков **C** и **D** в

спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY позволили отнести сигналы H5 и определить β -конфигурацию этих звеньев. α -Конфигурация остатка **B** следовала из относительно небольшой КССВ $^3J_{1,2}$ (<3 Гц). Конфигурации моносахаридов были также подтверждены химическими сдвигами C5 [205].

На основании отнесенного ^1H ЯМР спектра ^{13}C ЯМР спектр КПС был расшифрован с помощью двумерных экспериментов $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC. Отнесение остатка **A** к 3-дезоксигоннон-2-улозоновой кислоте подтверждалось корреляциями в эксперименте $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC: H3акс/C1, H3акс/C2 и H3экв/C2 при δ 1.57/174.1, 1.57/102.6 и 2.50/102.6, соответственно (Рисунок 48). Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР для остатка **A** и КССВ $^3J_{\text{H,H}}$, определенные по данным двумерных спектров ЯМР, соответствовали незамещенной 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксиглицеро- β -L-маннонон-2-улопиранозоновой (псевдаминовой) кислоте и отличались от значений спектральных параметров других известных стереоизомеров [214]. Относительно большая КССВ $J_{\text{закс}, 4}$ (~ 12.5 Гц) и маленькие КССВ $J_{4,5}$ и $J_{5,6}$ (<5 Гц) свидетельствовали об аксиальной ориентации H4 и экваториальной ориентации H5. В сочетании с КССВ $J_{6,7} \sim 10$ Гц эти величины подтверждали L-глицеро-L-манно-конфигурацию остатка **A**, который, таким образом, является псевдаминовой кислотой. Относительно большая разница между химическими сдвигами H3акс и H3экв (0.93 м.д.) указывала на аксиальную ориентацию карбоксильной группы и, следовательно, на β -конфигурацию остатка Pse [214].

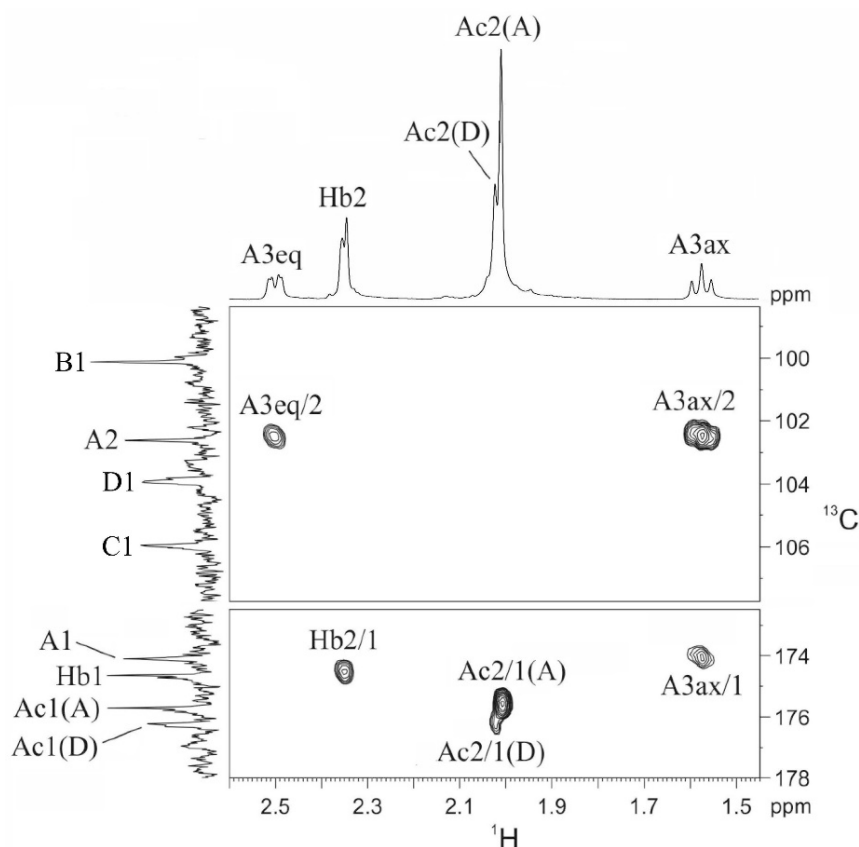


Рисунок 48. Фрагменты спектра ^1H , ^{13}C НМВС КПС *A. baumannii* B11911.

Для определения положения N-ацильных заместителей съемку спектра ^1H , ^1H ROESY проводили в смеси H_2O : D_2O (9:1 по объему) (Рисунок 49), что позволило детектировать сигналы протонов, связанные с атомами азота. Сигналы трех протонов NH были обнаружены при δ 7.70, 7.82 и 7.93 и отнесены к NH7 и NH5 Pse и NH2 GalN, соответственно, на основании корреляций с протонами C-N псевдаминовой кислоты в спектре ^1H , ^1H TOCSY: NH5/H-3акс,3экс,4,5 и NH-7/H-6,7,8,9. В спектре ^1H , ^1H ROESY были обнаружены 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 H-2 группы NHb 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 , ^{13}C НМВС. Эти данные позволили сделать вывод о том, что в структуре КПС присутствует GalNAc и Pse5Ac7Hb. 3-Гидроксибутановая кислота была высвобождена кислотным гидролизом КПС и идентифицирована как (*R*)-изомер методом ГЖХ трифторацетилированного (*S*)-2-октилового эфира.

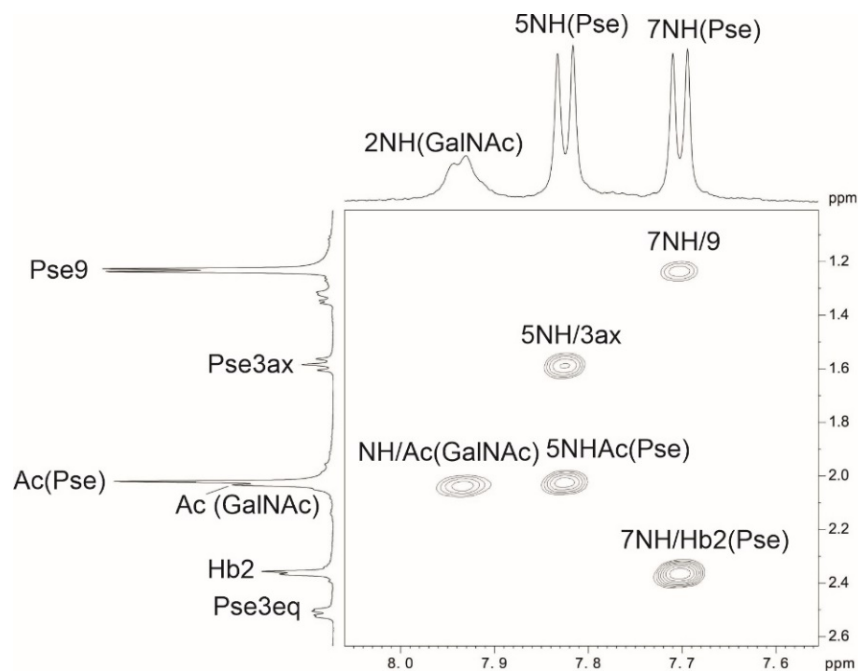


Рисунок 49. Фрагмент спектра $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY КПС *A. baumannii* B11911, эксперимент проведен в смеси $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O}$ (9:1). Нб обозначает 3-гидроксипутаноил.

В эксперименте $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY были обнаружены следующие межзвеньевые корреляции: Н1 С/Н3 **D**, Н1 **D**/Н-2,3,4 **C** и Н1 **B**/Н6 **C**. В спектре $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ НМВС была обнаружена дополнительная корреляция для связывания остатка псевдаминной кислоты с основной цепью С2 **A** (Pse)/ Н6b **B** при δ 102.6/3.95. Что вместе со слабопольным положением сигналов С3 остатка **D**, С3 и С6 остатка **C** и С6 остатка **B** при δ 81.1, 82.7, 67.9 и 65.1, соответственно, по сравнению с их положением в соответствующих незамещенных моносахаридах при δ 72.4, 74.1 (оба С3), 62.4 и 62.2 (оба С6) [205] показало, что КПС является разветвленным и выявило картину гликозилирования в К-звене.

На основании полученных данных был сделан вывод о том, что КПС К93 *A. baumannii* B11911 имеет структуру, показанную на Рисунке 50. КПС содержит β -Pse5Ac7RHб, принадлежащую к классу кислых высших моносахаридов, которые редко встречаются в бактериальных полисахаридах.

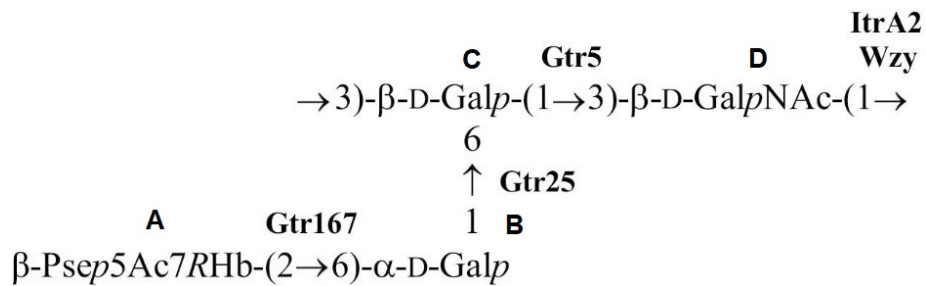


Рисунок 50. Структура КПС *A. baumannii* B11911, включая отнесение гликозилтрансфераз, ответственных за образование связей в К-звене КПС.

Характеристика генного кластера биосинтеза КПС *A. baumannii* B11911

Генный локус KL93, ответственный за синтез и экспорт КПС K93, имел характерную для *A. baumannii* генетическую организацию с центральной областью, содержащей гены для синтеза специфического моносахаридного компонента (Pse5Ac7RHb), гены гликозилтрансфераз для сборки К-звена, транслоказу Wzx и полимеразу Wzy (Рисунок 51). Эта часть локуса, специфичная для КПС, была фланкирована блоком *wz*-генов для экспорта капсулы с одной стороны и блоком генов для синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов с другой стороны.



Рисунок 51. Генный кластер KL93, ответственный за синтез КПС *A. baumannii* B11911.

В локусе KL93 присутствовала группа из шести *psa*-генов, которые являются близкими гомологами генов в локусе *A. baumannii* KL42, участвующих в синтезе Pse5Ac7RHb [40]. Такое же производное псевдааминовой кислоты присутствует в КПС K93, следовательно, *psa*-гены отвечают за его синтез. KL93 кодировал иницирующую гликозилфосфаттрансферазу (Itr), имеющую идентичную на 99% и 97% последовательность с ItrA2 локусов *A. baumannii* KL2 [20] и *A. baumannii* KL14 [27], соответственно. Таким образом, этот фермент инициировал синтез К-звена путем переноса D-GalpNAc-1-P из UDP-D-GalpNAc на ундекапиренилфосфатный носитель в *A. baumannii* KL3 [218], что согласовалось с присутствием GalNAc в

КПС К93 и показывало, что этот моносахарид является первым в К-звене. В таком случае полимеразы Wzy катализировала образование связи β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)-D-Galp между К-звеньями.

В соответствии с присутствием в КПС К93 трех гликозидных связей, KL93 включал три гена гликозилтрансфераз. Две из них были идентичны на 98% и 90% предсказанным гликозилтрансферазам Gtr5 и Gtr25, отвечающим за образование связей β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-GalpNAc и α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Galp, соответственно, в КПС *A. baumannii* K14 [27]. Обе связи были представлены в КПС К93, и эти два белка Gtr получили такие же названия в KL93. Оставшийся ген гликозилтрансферазы был ответственен за образование связи β -Psep5Ac7Rhb-(2 \rightarrow 6)-D-Galp. Предсказанный белок Gtr167 был идентичен на 42% и сходен на 62% с инвертирующей гликозилтрансферазой Gtr16 КПС *A. baumannii* RBH4 (KL6), которая была отнесена к связи β -Psep5Ac7Ac-(2 \rightarrow 4)-D-Galp [23]. Таким образом, гены в локусе биосинтеза капсулы KL93 соответствовали установленной структуре КПС К93 *A. baumannii* B11911.

КПС *A. baumannii* SGH0703 (K73) и UMB001 (K13) [219]

КПС К73 и К13 были выделены из сухих бактериальных клеток стандартным способом. Методом ГЖХ были идентифицированы Gal и FucNAc в соотношении 1:2. Структуры КПС К73 и К13 были установлены с помощью двумерных и одномерных ^1H и ^{13}C ЯМР экспериментов.

Спектры ^{13}C ЯМР очищенных КПС К13 (Рисунок 52-А) и К73 содержали сигналы четырех моносахаридных остатков в повторяющемся звене. Однако из-за высокой вязкости растворов разрешение ^1H ЯМР было низким, а серии двумерных ^1H и ^{13}C ЯМР экспериментов и вовсе не удалось провести для данных образцов. Чтобы уменьшить вязкость, КПС нагревали в мягких кислых условиях. Вязкость КПС снизилась, но в структурах получившихся КПС были обнаружены некоторые изменения. В результате кислотной обработки КПС К13 был получен ПС1. Его спектр ^{13}C ЯМР (Рисунок 52-В) показал две серии сигналов, минорная серия оказалась идентична спектру исходного КПС. Повторная кислотная обработка (4%

AcOH, 100 ° C, 6 ч) привела к получению регулярного полисахарида ПС2. Его спектр ^{13}C ЯМР показан на Рисунке 52-С.

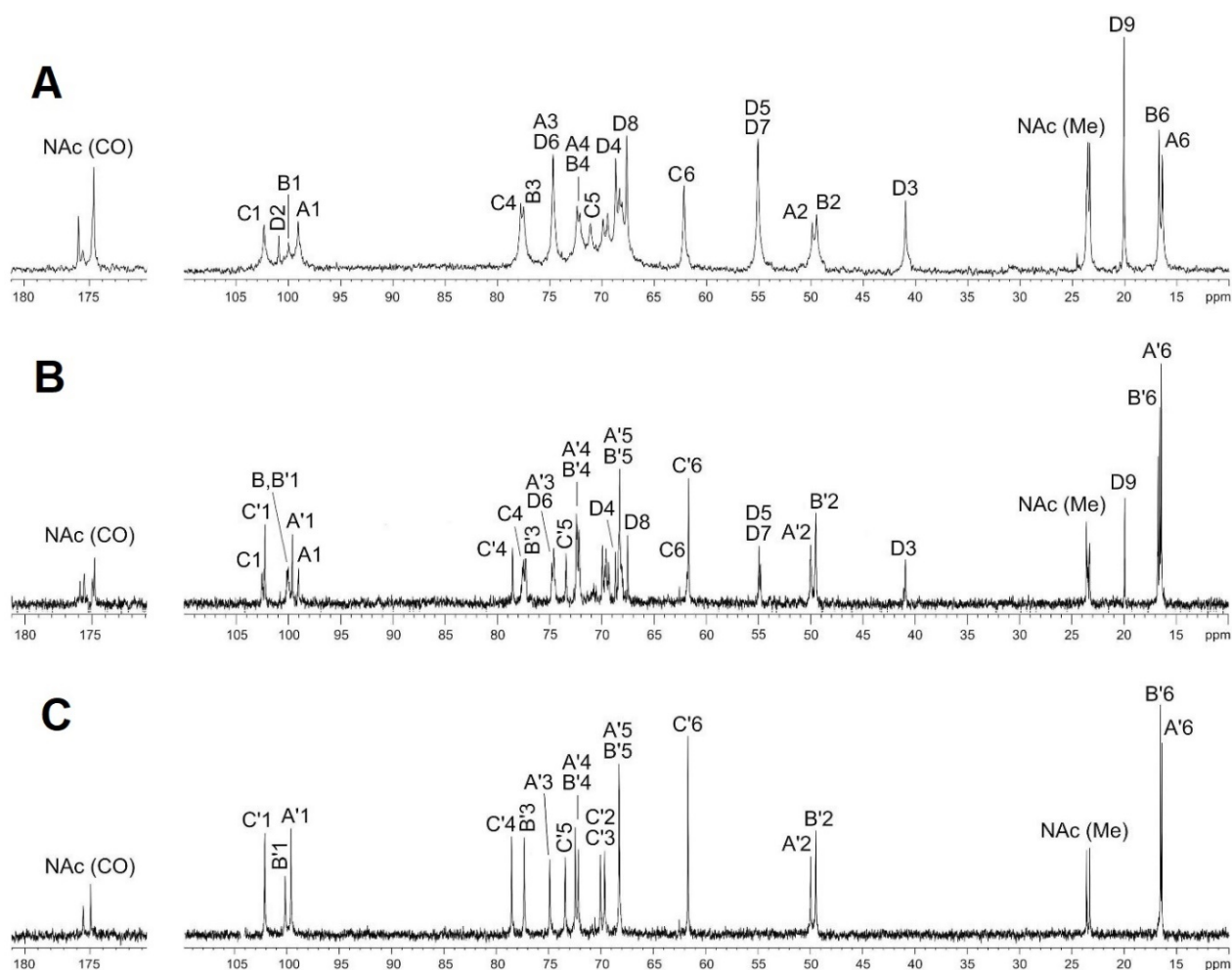


Рисунок 52. Спектры ^{13}C ЯМР КПС *A. baumannii* K13 (А), ПС1 (В) и ПС2 (С).

Структура ПС2 была установлена с использованием двумерной ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, включая эксперименты ^1H , ^1H COSY, ^1H , ^1H TOCSY и ^1H , ^{13}C HSQC, которые позволили выявить сигналы трех спиновых систем: двух остатков α -FucpNAc (А' и В') и одного остатка α -Galp (С').

В эксперименте ^1H , ^1H ROESY были обнаружены следующие корреляции между аномерными протонами и протонами при связанных углеродах в соседних остатках: А' Н1 / С' Н4, С' Н1 / В' Н3 и В' Н1 / А' Н3 при δ 4.78 / 4.01, 5.15 / 4.06 и 5.03 / 3.98, соответственно. В спектре ^{13}C ЯМР химические сдвиги атомов С3 для А' и В' и С4 для С' были смещены в более слабopольные области, что подтверждает линейную структуру ПС2 и типы замещения остатков в повторяющемся звене.

Абсолютные конфигурации моносахаридов были установлены анализом ГЖХ ацелированных (*S*)-2-октил гликозидов: D-конфигурация остатков **A'** и **C'** и L-конфигурация остатка **B'**. Структура ПС2 показана на Рисунке 53.

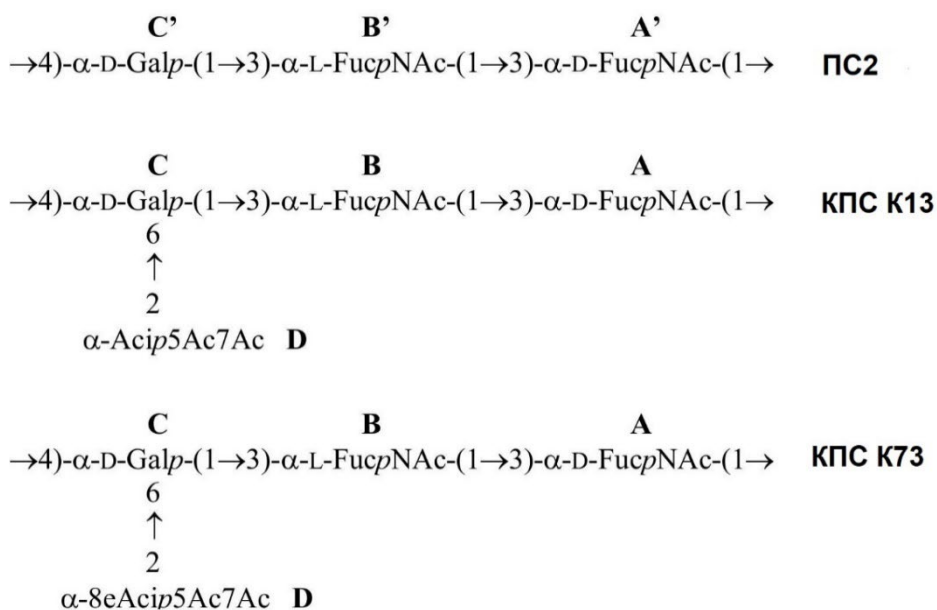


Рисунок 53. Структуры КПС *A. baumannii* К73, К13 и ПС2.

Минорная серия сигналов в спектрах ПС1, соответствующая исходному КПС К13, показала присутствие дополнительного остатка **D**, который при сравнении с опубликованными данными по КПС *A. baumannii* D36 был идентифицирован как α-связанный остаток Асi5Ac7Ac [27].

Положение сигнала С6 для Galp (**C**) в минорной серии ПС1 по сравнению с тем же сигналом в мажорной серии сместилось с δ 73.4 до 70.9 м.д.. Сигналы для Н6а, 6б остатка **C** в спектре ¹Н ЯМР сместились с δ 3.67 и 3.70 до 3.37 и 3.60. Сдвиг сигналов Н6 и С6 в слабое поле характерен для С6-гликозилирования гексозы 3-дезоксигулоновой кислотой (например, сдвиг от 3.78 до 3.42, 3.53 для Н6а, 6б α-GalpNAc был обнаружен при 6-замещении его α-Acip5Ac7Ac в КПС *A. baumannii* D36) [27]. В связи с чем можно было сделать вывод о связи **D**-(2→6)-**C** в повторяющемся звене (Рисунок 53).

Мягкая кислотная деградация КПС К73 привела к образованию ПС3, отличающегося от исходного КПС низким содержанием 8eAcip5Ac7Ac. Структурная неоднородность ПС3 отражалась в нестехиометрическом

соотношении сигналов аномерных протонов в спектре ^1H ЯМР (Рисунок 54). Спектр ^{13}C ЯМР ПС3 так же, как и ПС2, содержал минорную серию с четвертым остатком **D** и мажорную с тремя моносахаридными остатками в повторяющемся звене.

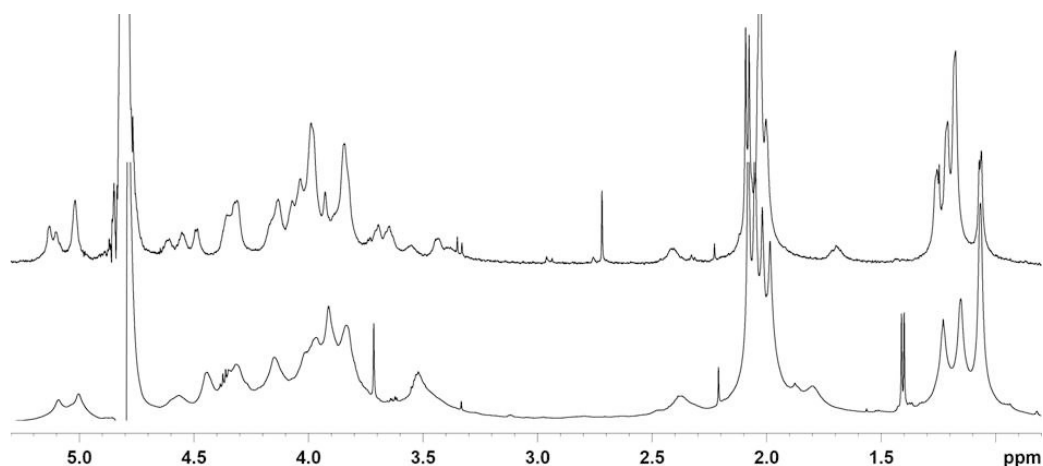


Рисунок 54. ^1H ЯМР спектр для ПС3 (верхний спектр) и КПС *A. baumannii* SGH0703 (нижний спектр).

При изучении одномерных и двумерных спектров ЯМР мажорной серии сигналов ПС3 было установлено, что трисахаридное повторяющееся звено ПС3 имело ту же структуру, что и звено ПС2 (Приложение. Таблица П3). Минорная серия сигналов содержала сигналы для четырех остатков (**A-D**). Химические сдвиги ^{13}C ЯМР остатков **A-C** были по существу идентичными ПС2, тогда как для нон-2-улозоновой кислоты различия были в конфигурации при C8: $\text{Ac}i5\text{Ac}7\text{Ac}$ в K13 и $8e\text{Ac}i5\text{Ac}7\text{Ac}$ в K73 (данные для свободных $\text{Ac}i5\text{Ac}7\text{Ac}$ и $8e\text{Ac}i5\text{Ac}7\text{Ac}$ [214]).

Структуры КПС K73 и K13 отличались боковой цепью повторяющегося звена, которая представляет собой 5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-*L*-глицеро-*L*-альтро-нон-2-улозоновую кислоту ($\text{Ac}i5\text{Ac}7\text{Ac}$) в КПС K73 и 5,7-диацетамидо-3,5,7,9-тетрадезоксид-*D*-глицеро-*L*-альтро-нон-2-улозоновую кислоту

спектров COSY и TOCSY и измерением констант спин-спинового взаимодействия, которые показаны в Таблице 7.

Таблица 7. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР моносахарида 8-эпиацинетаминовой кислоты, выделенного из КПС *A. baumannii* K73. Значения C1 и C2 для α - и β -аномеров были обнаружены в спектре HMBC и составили: 177.4 и 97.4 м.д., 176.1 и 98.8 м.д., соответственно.

	H3экв, H3акс	H4	H5	H6	H7	H8	H9	
	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	
α -8eAci	2.24,1.86	3.95	3.84	3.84	3.90	4.45	1.05	
	40.5	68.3	55.0	76.1	53.5	66.5	20.3	
	$^2J_{3\text{экв},3\text{акс}} = 13.2$		$^3J_{6,7} \approx 0$ $^3J_{7,8} \approx 0$ $^3J_{8,9} = 6.5$					
	$^3J_{3\text{экв},4} = 4.9$							
β -8eAci	2.70,1.64	3.7	3.78	3.40	3.93	4.42	1.04	
	41.9	69.7	55.5	76.1	54.9	66.8	20.3	
	$^2J_{3\text{экв},3\text{акс}} = 12.2$		$^3J_{4,5} = 9.5$	$^3J_{5,6} = 9.5$	$^3J_{6,7} = 5.3$	$^3J_{7,8} \approx 0$	$^3J_{8,9} = 6.0$	
	$^3J_{3\text{экв},4} = 4.7$							
	$^3J_{3\text{акс},4} = 11.5$							
	$^3J_{3\text{акс},4} = 12.2$							

Моносахарид является C8 эписимером недавно открытой ацинетаминовой кислоты, для данного остатка было предложено название 8-эпиацинетаминовая кислота (8eAci). Анализ спектров ^1H и ^{13}C ЯМР теми же методами выявил наличие минорного β -аномера 8-эпиацинетаминовой кислоты. Следует отметить, что в этом случае H7 имел измеримое значение константы взаимодействия с H6 ($^3J_{6,7} = 5.3$ Гц), вероятно, из-за β -конфигурации аномерного атома углерода. [214].

Характеристика генных кластеров биосинтеза *A. baumannii* KL73 и KL13.

Генные кластеры биосинтеза KL73 и KL13 были идентичны друг другу на 95.2%, включая гены для синтеза нуклеотидных предшественников D-Galp, D-

FucpNAc и L-FucpNAc. Схожая последовательность генов была обнаружена также в структуре генного кластера *A. baumannii* KL12 (Рисунок 56).

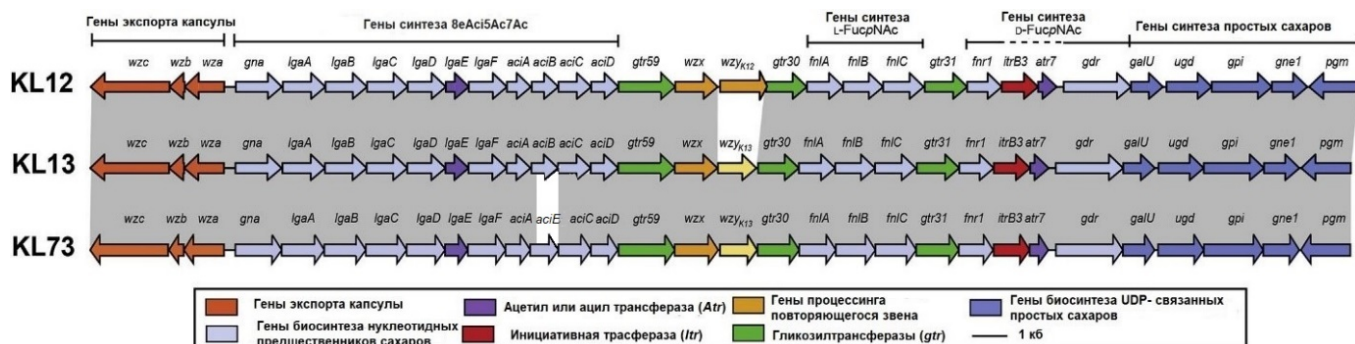


Рисунок 56. Генные кластеры биосинтеза капсул *A. baumannii* KL12, KL13 и KL73.

KL13 и KL73 отличались заменой гена *aciB* в KL13 на *aciE* в KL73, что приводило к синтезу Ac5Ac7Ac и 8eAc5Ac7Ac, соответственно. Кластеры KL73 и KL13 включали три гена гликозилтрансфераз (*gtr59*, *gtr30*, *gtr31*) (Рисунок 57) и ген иницирующей трансферазы *itrB3*. Эти гены ранее были обнаружены в кластере *A. baumannii* KL12, в котором было предсказано, что *ItrB3* инициировала синтез первого звена КПС K12 с переноса D-FucpNAc на ундекапренилфосфатный носитель [26]. Ожидалось, что КПС K12 будет иметь тот же моносахаридный состав и последовательность моносахаридов, что и КПС K13 и K73. Оказалось, что полимеразы Wzy_{K12} отличалась от $Wzy_{K13/K73}$, которая образовывала связь α -D-FucpNAc-(1→4)- β -D-Galp между K-звеньями. Полимераза Wzy_{K12} в кластере K12 образовывала связь α -D-FucpNAc-(1→3)- β -D-Galp при полимеризации K-звеньев [26]. Таким образом, инициация синтеза всех трех КПС и сборка первого повторяющегося звена контролировалась одними и теми же генами (*ItrB3*, *gtr31*, *gtr30*, *gtr59*), но ген полимеразы у *A. baumannii* K12 (Wzy_{K12}) отличался от такового у *A. baumannii* K13 и K73 ($Wzy_{K13/K73}$). Таким образом, данные анализа генных кластеров КПС K13 и K73 соответствовали структурам, установленным с помощью химических и физико-химических методов (Рисунок 57).

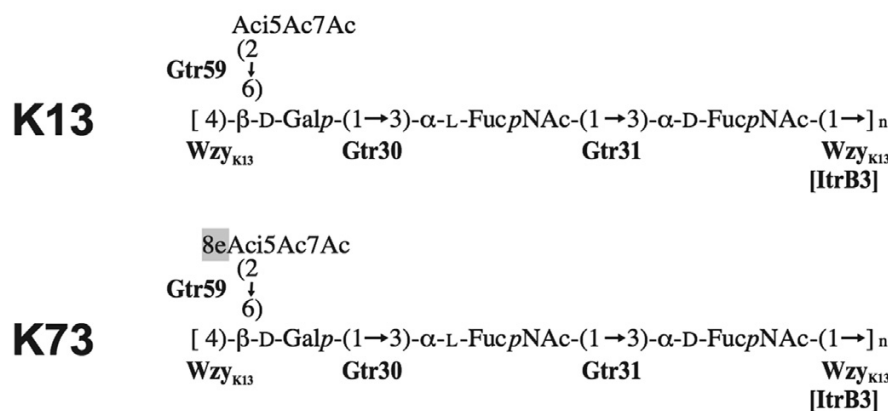


Рисунок 57. Структуры КПС *A. baumannii* K13 и K73, включая отнесение гликозилтрансфераз, ответственных за образование связей в К-звеньях.

КПС *A. baumannii* BAL097 (K8) и RCH52 (K54) [220]

КПС K8 и K54 были выделены из сухих бактериальных клеток методом Вестфаля. КПС обладали высокой вязкостью растворов, в следствии чего спектры ^1H и ^{13}C ЯМР были плохо разрешимы и была выявлена структурная неоднородность. После кислотного гидролиза 2% AcOH, КПС выделяли гель-жидкостной хроматографией на Fractogel TSK40. Сравнение спектров ^1H и ^{13}C ЯМР до и после очистки показало, что обработка внесла некоторые изменения в структуры КПС, а именно частичное отщепление бокового остатка нонулозоновой кислоты.

Изучение ацетатов полиолов, полученных из КПС BAL097 (K8) и RCH52 (K54), методом ГЖХ показало, что оба КПС содержат FucNAc, GlcNAc и GalNAc в равных соотношениях. ГЖХ-анализ ацетилированных (S)-2-октилгликозидов показал, что FucNAc имеет L-конфигурацию, остальные сахара D-конфигурацию.

КПС *A. baumannii* BAL097

После мягкого гидролиза КПС *A. baumannii* BAL097 был получен линейный модифицированный полисахарид (МПС) и смесь производных легионаминовой кислоты с разными заместителями в 7N положении. Последние были идентифицированы как 5-N-ацетил-7-N-[(S)-3-гидроксибутаноил] легионаминовая кислота (Leg5Ac7Hb) и 5,7-ди-N-ацетиллегионаминовая кислота (Leg5Ac7Ac) в соотношении $\sim 2.5: 1$. Соотношение было установлено путем сравнения данных ^1H и ^{13}C ЯМР с данными для Leg5Ac7R, выделенной ранее из

КПС *A. baumannii* 1432 K27 [34]. Распределение N-ацильных заместителей в Leg5Ac7Nb было подтверждено двумерным спектром $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY, снятым в смеси $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O}$ (9:1), который показал корреляцию NH5 в Leg с N-ацетильной группой и NH7 с 3-гидроксипропанойльной группой и N-ацетильной группой. Абсолютная конфигурация 3-гидроксипропанойльной группы была определена методом ГЖХ в виде трифторацетилированного (S)-2-октилового эфира.

Спектр ^1H ЯМР МПС содержал сигналы трёх аномерных протонов при δ 4.52, 4.97 и 5.00, одной группы $\text{CH}_3\text{-C}$ при δ 1.17 (H6 FucNAc) и трёх групп NAc при 1.91-2.03. ^{13}C ЯМР спектр содержал сигналы трёх аномерных атомов углерода при δ 98.6, 99.6 и 103.4, одной группы $\text{CH}_3\text{-C}$ при δ 16.7 (C6 из FucNAc), трёх групп NAc при 23.4-23.8 (CH_3) и 174.5-174.8 (CO), трёх групп CH-NH при 49.5, 49.8 и 56.8 (C2 аминокислот), двух групп CH_2OH (C6 GlcNAc и GalNAc) при 61.8 и 62.8, и наряду с сигналами кольцевых протонов при δ 68.0-79.0 (Приложение. Таблица П4).

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР для КПС и МПС были интерпретированы с использованием корреляционных двумерных экспериментов $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC. Были идентифицированы спиновые системы для трех моносахаридных остатков, которые были обозначены в соответствии с их последовательностью в К-звене как остатки **A** (GlcNAc), **B** (FucNAc) и **C** (GalNAc). β -конфигурация GlcpNAc была определена на основании корреляции H1/ H5 для остатка **A** в спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY, тогда как α -конфигурация остатков **B** и **C** следовала из относительно низких связевых констант $^3J_{1,2}$ (<3 Гц).

Сдвиг в слабое поле сигналов C3 остатков **A**, **B** и **C** (δ 79.0, 77.2 и 73.8) по сравнению с их положениями в соответствующих незамещенных моносахаридах при δ 75.1, 68.7 и 68.7 указывал на типы замещения в повторяющемся звене линейного МПС. В эксперименте $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY были обнаружены следующие межзвеньевые корреляции: **C** H1 / **B** H3, **B** H1 / **A** H3 и **A** H1 / **C** H3 при δ 5.00 / 4.00, 4.97 / 3.68 и 4.52 / 4.00, соответственно, что указывало на последовательность $\rightarrow\text{C}\rightarrow\text{B}\rightarrow\text{A}\rightarrow$ в МПС.

Сравнение спектров ^{13}C ЯМР МПС и исходного КПС выявило смещение сигнала С6 остатка **C** от δ 62.8 в МПС до δ 65.6 в КПС, что указывает на то, что остаток Leg5Ac7R (**D**) присоединен к GalpNAc (**C**) в положении 6 (небольшой α -эффект связанного атома углерода 1.7 м.д. характерен для гликозилирования кетозой). Относительно большая разница между химическими сдвигами H3акс и H3экв (1.3 м.д.) указывала на аксиальную ориентацию карбоксильной группы, то есть α -конфигурацию Leg5Ac7R.

КПС *A. baumannii* RCH52

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР КПС RCH52 были схожими со спектрами КПС K8, но содержали сигналы для одной дополнительной N-ацетильной группы вместо сигналов для 3-гидроксипутаноильной группы. Поэтому был сделан вывод, что КПС K54 включает в себя Leg5Ac7Ac, а не Leg5Ac7R. Были идентифицированы три спиновые системы моносахаридных остатков: **A** (β -Glc_pNAc), **B** (α -Fuc_pNAc) и **C** (α -Gal_pNAc). Слабопольное положение сигналов для C3 остатков **A** и **B**, C4 и C6 остатка **C** при δ 78.9, 77.0, 77.0 и 66.7, соответственно, указывало на типы замещения в повторяющемся звене и, в том числе, на положение остатка **C** в месте разветвления с боковой цепью Leg5Ac7Ac (**D**). Последовательность моносахаридных остатков ($\rightarrow\text{C}\rightarrow\text{B}\rightarrow\text{A}\rightarrow$) в основной цепи КПС была установлена по корреляциям в спектре ^1H , ^1H ROESY (Рисунок 58): **C** H1 / **B** H3, **B** H1 / **A** H3 и **A** H1 / **C** H4 при δ 5.00 / 3.90, 5.00 / 3.69 и 4.56 / 4.05, соответственно.

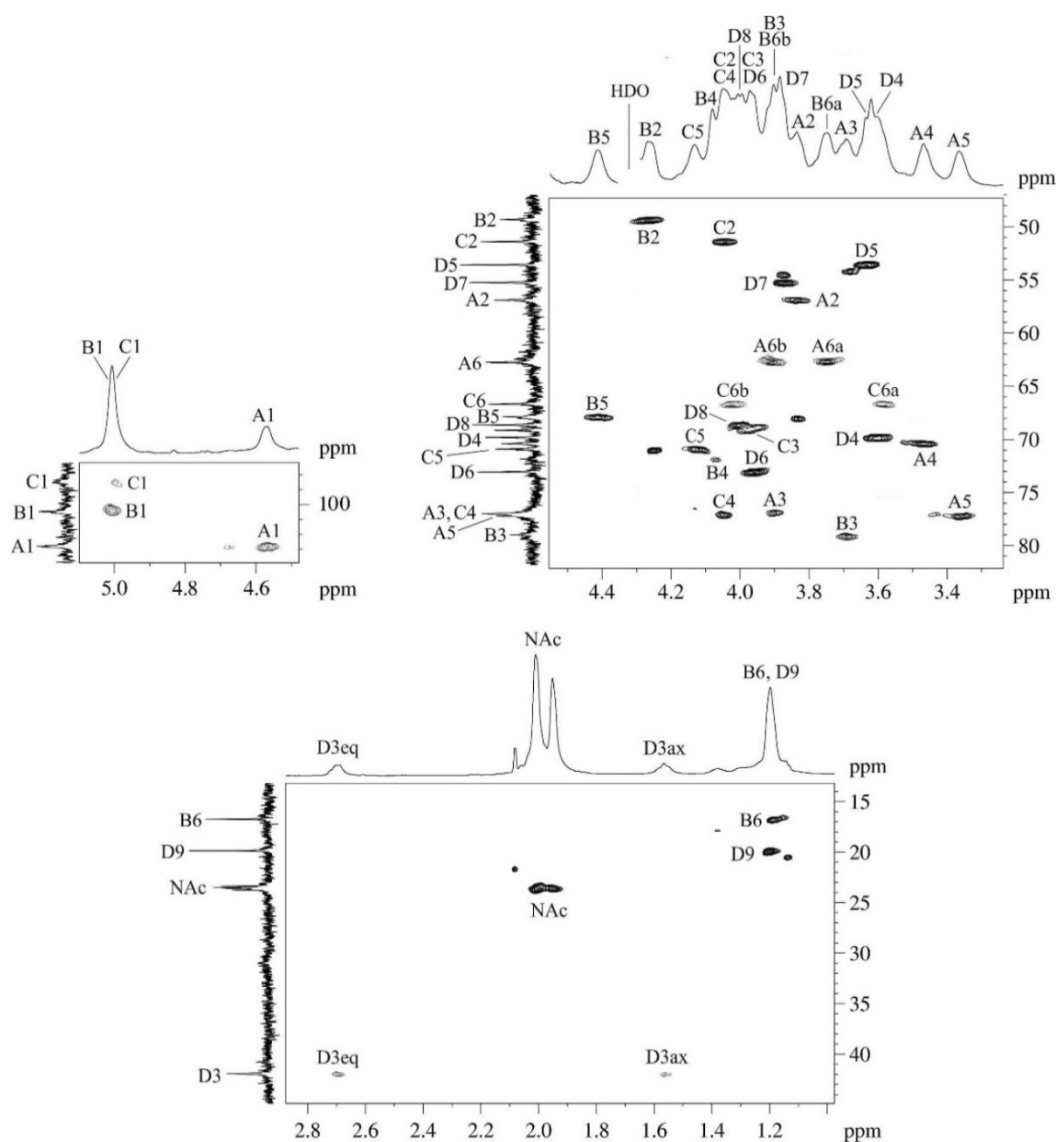


Рисунок 58. Фрагменты двумерного спектра $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC КПС *A. baumannii* RCH52 (K54).

Локализация остатка Leg5Ac7Ac в положение C6 остатка GalpNAc была установлена по характерному химическому сдвигу C6 остатка C при δ 66.7. Разница в 1.12 м.д. между химическими сдвигами H3акс и H3экс указывала на α -конфигурацию Leg5Ac7Ac.

Структура КПС К8 была подтверждена с помощью сольволиза трифторуксусной кислотой модифицированного полисахарида (МПС), образовавшегося в результате удаления из КПС бокового остатка легионаминовой кислоты. За 3 часа при 40°C из МПС образовались олигосахариды, а в присутствии 2-метилпропанола – более удобные для выделения и идентификации

кластерах присутствовали гены экспорта капсулы (*wzc*, *wzb*, *wza*), три гена гликозилтрансфераз (*gtr19*, *gtr20*, *gtr18* в KL8, *gtr109* в KL54), два гена иницирующей гликозилтрансферазы и по пять генов синтеза нуклеотидных предшественников простых моносахаридов.

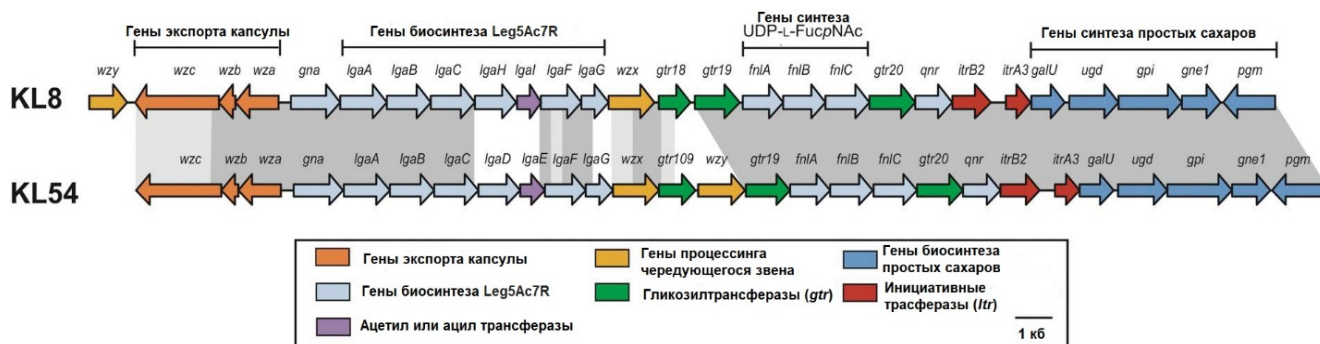


Рисунок 61. Генные кластеры биосинтеза *A. baumannii* KL8 и KL54.

Отличия генных кластеров заключались в том, что в кластере KL54 присутствовали гены *lgaD/E*, которые были заменены на *lgaH/I* в KL8. Это различие приводило к различию боковых остатков КПС: Leg5Ac7Ac в структуре КПС K54 и Leg5Ac7Hb в КПС K8. Второе отличие заключалось в том, что генный кластер KL8 включал ген *gtr18*, тогда как KL54 включал гены *gtr109* и *wzy*. Однако $Gtr18_{K8}$ и $Gtr109_{K54}$ на 75% были идентичны друг другу и поэтому могли образовывать похожую связь. Последнее отличие заключалось в центральном расположении *wzy* в KL54, что типично для большинства кластеров КПС *A. baumannii*, тогда как в KL8 ген *wzy* необычно был расположен после гена *wzc* на внешнем конце K-локуса. Белки Wzy_{K8} и Wzy_{K54} были неидентичны и, как следствие, образовывали различные связи между близко родственными K-звеньями КПС. Однако Wzy_{K8} был на 40% идентичен Wzy_{K9} , который, как было предсказано, образует связь β -D-GlcpNAc-(1→3)-D-GalpNAcA в КПС K9 *A. baumannii* штамма LUN3484 [221], в связи с чем был сделан вывод, что Wzy_{K8} могла катализировать подобную связь. Таким образом, анализ генных кластеров биосинтеза KL8 и KL54 подтверждал структуры, приведенный на Рисунке 60.

КПС *A. baumannii* NIPH329 (K46) [215]

КПС К46 был выделен стандартным способом, с помощью метода моносахаридного анализа было обнаружено присутствие GalNAc, GlcNAc и Gal в КПС, далее КПС был подвергнут воздействию мягкого кислотного гидролиза, который привел к получению свободного от Pse5Ac7Ac модифицированного полисахарида и свободного моносахарида Pse5Ac7Ac, которые были разделены с помощью метода гель-жидкостной хроматографии на геле Fractogel TSK HW-40. Pse5Ac7Ac была идентифицирована с использованием ЯМР спектроскопии сравнением химических сдвигов ^1H и ^{13}C ЯМР и связевых констант $3J_{\text{H,H}}$ с опубликованными данными [205].

В связи с получением в результате гидролиза КПС, было доказано боковое положение псевдаминовой кислоты, в противном случае продуктом реакции являлся бы олигосахарид с псевдаминовой кислотой на невосстанавливаемом конце. Структурное изучение КПС было проведено с использованием двумерной и одномерной ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, которая выявила три спиновые системы: β -GalNAc (**A**), α -GlcNAc (**B**) и α -Gal (**C**), каждый моносахарид находился в пиранозной форме (Приложение. Таблица П5).

Сигналы протонного спектра были отнесены с использованием экспериментов $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY и $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY. В спектре TOCSY для сахаров с *галакто*-конфигурацией были обнаружены корреляции H1/H-2,3,4, а для сахаров с *глюко*-конфигурацией H1/H-2,3,4,5. В спектре $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC КПС сигналы C3 остатков **A** и **C** и C6 остатка **B** были значительно смещены в область слабого поля при δ 76.9, 80.6 и 66.2 в сравнении с незамещенными моносахаридами при δ 72.4, 70.4 и 61.9, соответственно [205]. Следовательно, эти атомы углерода являются гликозилированными. Моносахаридная последовательность в повторяющемся звене была определена с помощью эксперимента $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY, который выявил следующие корреляции α -Gal H1/ α -GlcNAc H6a,6b, α -GlcNAc H1/ β -GalNAc H3 и β -GalNAc H1/ α -Gal H3 при δ 4.98/3.68, 5.05/3.81 и 4.71/3.95, соответственно.

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР (Рисунок 62) КПС К46 содержали сигналы тех же моносахаридов, что были обнаружены в МПС (остатки **A-C**) за исключением дополнительного моносахаридного остатка β -Pse5Ac7Ac (**D**).

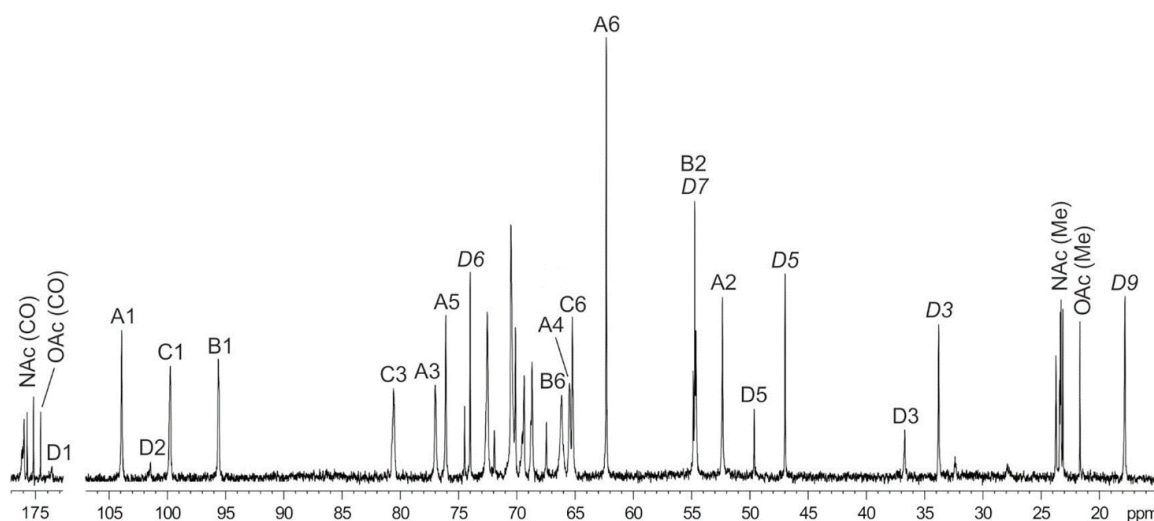


Рисунок 62. Спектр ^{13}C ЯМР КПС К46.

Аксиальная ориентация карбоксильной группы (β -конфигурация) псевдаминовой кислоты была определена по химическому сдвигу сигнала C_6 при δ 74.6 (в сравнении с опубликованными данными [214] δ 71.4 и 74.3 для α - и β -Pse5Ac7Ac, соответственно). В спектре ^{13}C ЯМР КПС присутствовал смещенный в область слабого поля сигнал C_6 α -Galp при δ 65.2, в сравнении с сигналом в незамещенном моносахариде при δ 62.3 в спектре МПС, следовательно, β -Pse5Ac7Ac замещена в 6 положение остатка α -Galp. Терминальная позиция псевдаминовой кислоты в боковой цепи полисахарида была подтверждена кислотным гидролизом КПС, который привел к образованию МПС, и схожестью химических сдвигов ^{13}C ЯМР остатка **D** с опубликованными данными для свободного сахара β -Pse5Ac7Ac [214]. В ЯМР спектрах КПС присутствовал сигнал О-ацетатной группы при δ_{H} 2.00, δ_{C} 21.7 и 174.1, который относился к остатку псевдаминовой кислоты, что было подтверждено по смещению сигнала C_4 остатка псевдаминовой кислоты в область слабого поля при δ 70.1, а сигналов сигналов C_3 и C_5 в сильное поле δ 33.8 и 47.0 в сравнении с химическими сдвигами незамещенной Pse5Ac7Ac при δ 67.5, 36.8 и 49.7, соответственно. Следовательно,

гликозилтрансфераз (*gtr94*, *gtr14* и *gtr15*) и иницирующую трансферазу *ItrA2* (*itrA2*), которая отвечала за перенос D-GalpNAc-1-P с UDP-D-GalpNAc на липидный носитель UndP. Комбинация генов *gtr14*, *gtr15* и *itrA2* была обнаружена ранее в генном кластере KL5, а белки *ItrA2*, *Gtr14* и *Gtr15* из KL46 были на 96–99% идентичны белкам, кодируемым кластером KL5 [22]. КПС K5 включал D-GalpNAc в качестве первого сахара K-звена. *Gtr15* связывал D-GlcpNAc через α -(1→3) связь с D-GalpNAc, а *Gtr14* связывал остаток D-Galp через α -(1→6) связь с D-GlcpNAc. КПС K46 также включал такой же сегмент α -D-Galp-(1→6)- α -D-GlcpNAc-(1→3)-D-GalpNAc. *Gtr94*_{K46} был на 75% идентичен *Gtr13*_{K5}, который связывал остаток Leg5Ac7Ac с D-Galp через α -(2→6) связь в биосинтезе КПС K5. Таким образом, *Gtr94*_{K46} образовывал связь α -Pse5Ac7Ac-(2→6)-D-Galp в K46. Кластеры генов KL46 и KL5 дополнительно включали гены *wzy*, которые продуцировали близкородственные белки, идентичные на 94%. *Wzy*_{K5} образовывал связь α -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp между единицами K5, *Wzy*_{K46} катализировал образование такой же связи в КПС. Таким образом, анализ генного кластера биосинтеза KL46 подтверждал структуру КПС K46, полученную химическими и физико-химическими методами анализа.

КПС *A. baumannii* LUN5553 (K90) [222].

КПС был выделен из сухих бактериальных клеток, как было описано выше. Методом моносахаридного анализа было определено присутствие в КПС Gal и GlcNAc. В результате гидролиза 2% уксусной кислотой был получен модифицированный полисахарид (МПС) свободный от Pse5Ac7Ac и низкомолекулярная фракция псевдаминовой кислоты (Pse5Ac7Ac), разделение было произведено с помощью гель-жидкостной хроматографии на геле Sephadex G-50. Остаток Pse5Ac7Ac был идентифицирован сравнением химических сдвигов ¹H и ¹³C ЯМР спектров и связевых констант с опубликованными данными [214]. С помощью спектров ¹H и ¹³C ЯМР были выявлены три спиновые системы: β -GlcpNAc (A), α -GlcpNAc (B) и α -Galp (C) (Приложение. Таблица П6). Химические сдвиги были отнесены с использованием двумерных экспериментов ¹H,¹H COSY,

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC. Типы замещения были определены с помощью экспериментов HSQC и ROESY. Так в эксперименте HSQC сигналы C3 остатка **A** и **B** и C6 остатка **B** при δ 79.9, 80.7 и 66.7, соответственно, были значительно смещены в область слабого поля в МПС в сравнении с теми же сигналами в соответствующих незамещенных моносахаридах при δ 72.0, 75.1 и 61.9, соответственно [205]. Последовательность моносахаридных остатков была определена по двумерному гомоядерному эксперименту $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY, который продемонстрировал следующие корреляции: α -Gal H1/ α -GlcNAc H6a, α -GlcNAc H1/ β -GlcNAc H3 и β -GlcNAc H1/ α -GlcNAc H3 при δ 4.99/3.68, 5.36/3.78 и 4.61/3.76, соответственно. Химические сдвиги C-2,3,4,5,6 остатка **C** были очень схожи с незамещенным моносахаридом α -Galp. Эти данные указывали на разветвлённое строение МПС с 3,6-замещенным остатком α -GlcNAc в месте разветвления и терминальным остатком α -Gal в боковой цепи (Рисунок 65).

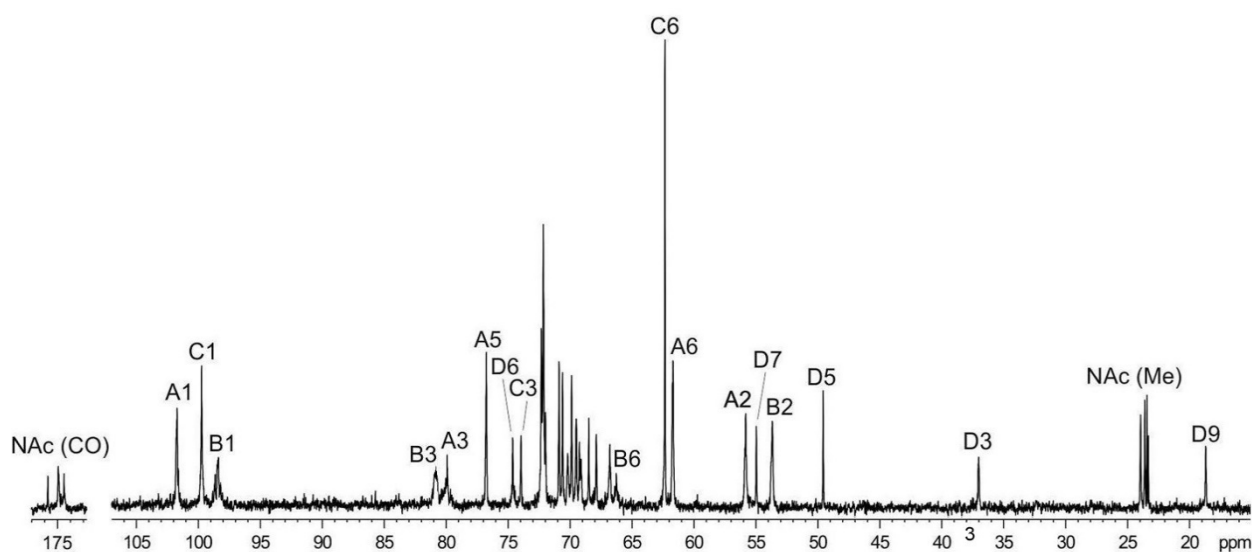


Рисунок 65. ^{13}C ЯМР спектр КПС LUN5553.

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР исходного КПС К90 до гидролиза содержали сигналы характерные для остатка β -Psep5Ac7Ac (остаток **D**). Аксиальная ориентация карбоксильной группы, указывающая на β -конфигурацию остатка Pse, была определена по относительной большой разнице между химическими сдвигами HЗакс и HЗэкв в спектре ^1H ЯМР в 0.87 м.д.. Конфигурация аномерного атома псевдаминовой кислоты была определена по химическому сдвигу C6 при δ 74.6 (сравнение с опубликованными данными δ 71.4 и 74.3 для α - и β -Psep5Ac7Ac,

соответственно [214]). В спектре ^{13}C ЯМР КПС К90 сигнал С3 остатка $\alpha\text{-Galp}$ был смещен в область слабого поля при δ 74.0, в сравнении с этим же химическим сдвигом в МПС при δ 70.9, следовательно остаток $\beta\text{-Pse5Ac7Ac}$ был присоединен именно в положение С3 остатка $\alpha\text{-Galp}$. Таким образом была определена структура КПС К90 *A. baumannii* LUN5553 показанная на Рисунке 66.

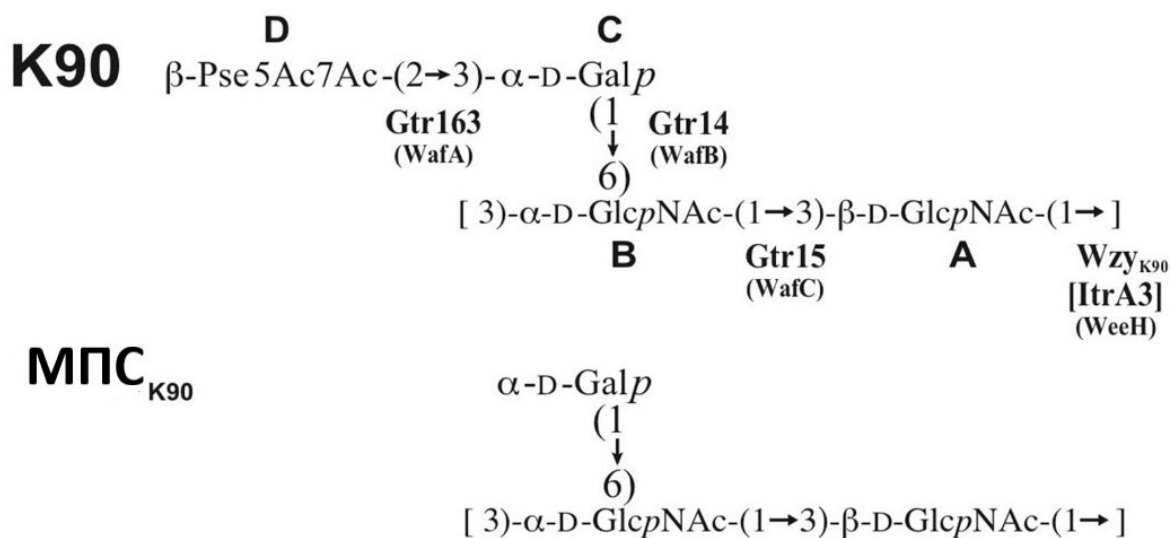


Рисунок 66. Структуры КПС К90 и МПС, полученного кислотным гидролизом.

Генный кластер биосинтеза КПС LUN5553 (KL90)

Кластер генов KL90 (Рисунок 67) включал модуль из шести генов *psa*, *psaABCDEF*, необходимый для синтеза нон-2-улозоновой кислоты (*Pse5Ac7Ac*), и модуль генов (*galU*, *ugd*, *gpi*, *gne1*, *pgm*), катализирующий синтез простых сахарных нуклеотидов, таких как UDP-D-GlcpNAc, UDP-D-GalpNAc и UDP-D-Galp.

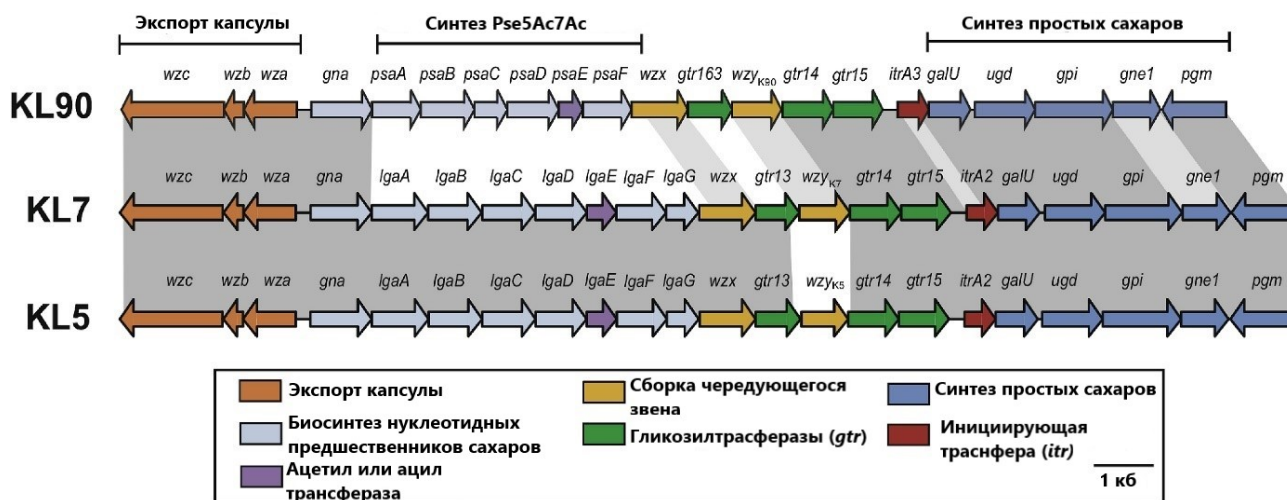


Рисунок 67. Генный кластер биосинтеза КПС К90.

Кластер генов также включал консервативные гены экспорта КПС (*wza-wzb-wzc*), процессинга К-звеньев (*wzx* и *wzy*) и гены трех гликозилтрансфераз, два из которых (*gtr14* и *gtr15*) ранее наблюдались в *A. baumannii* KL5 и KL7 [22,24]. Однако KL90 включал *itrA3*, а не *itrA2*, который был обнаружен в кластерах KL5 и KL7. Поскольку известно, что *ItrA2* переносит D-GalpNAc с UDP-D-GalpNAc на UndP для инициации синтеза К-звеньев, а ген *itrA2* присутствовал в кластерах генов KL5 и KL7, КПС К5 и К7 начинались с D-GalpNAc. Однако присутствие *itrA3* в KL90 указывало на то, что звено КПС К90 имело D-GlcpNAc, а не D-GalpNAc в качестве первого сахара, поскольку известно, что *ItrA3* специфичен для UDP-D-GlcpNAc [22, 24]. Гены гликозилтрансфераз *gtr14* и *gtr15* в кластерах генов KL5 и KL7 обладали той же каталитической активностью, что и в KL90. *Gtr15*_{К5/К7} катализировал присоединение D-GlcpNAc из UDP-D-GlcpNAc к иницирующему моносахариду, связанному с липидом UndP-D-GalpNAc через α -(1→3) связь. *Gtr14*_{К5/К7} образовывал связь α -D-Galp-(1→6)-D-GlcpNAc. Третий ген гликозилтрансферазы *Gtr163*_{К90}, связывал Pse5Ac7Ac с D-Galp. Полимераза *Wzy*_{К90} имела 54% идентичность с *Wzy*_{К7} из KL7, и ранее было показано, что *Wzy*_{К7} катализировал образование β -D-GalpNAc-(1→3)-D-GlcpNAc связи между К-звеньями. Таким образом, КПС К90 имел родственную с КПС К7 связь β -D-GlcpNAc-(1→3)-D-GlcpNAc, образованную *Wzy*_{К90}. Таким образом, генный кластер биосинтеза KL90 полностью соответствует структуре КПС К90.

КПС *A. baumannii* RES546 (K135) [212]

КПС был выделен из сухих бактериальных клеток. Методом моносахаридного анализа было определено присутствие в КПС Gal и GlcNAc. При изучении ¹H и ¹³C ЯМР спектров полисахарида было обнаружено присутствие изомера нон-2-улозоновой кислоты. В ЯМР спектрах присутствовали сигналы N-ацетильных групп (Рисунок 68) при δ_C 23.0-23.8 (CH₃) и 175.5–175.8 (CO), δ_H 2.00-2.10, а также характерные сигналы для нонулозоновой кислоты при δ_C 37.2 (C3), 18.3 (C9), δ_H 1.07 (H9), 1.59 и 2.52 (H3 акс и экв).

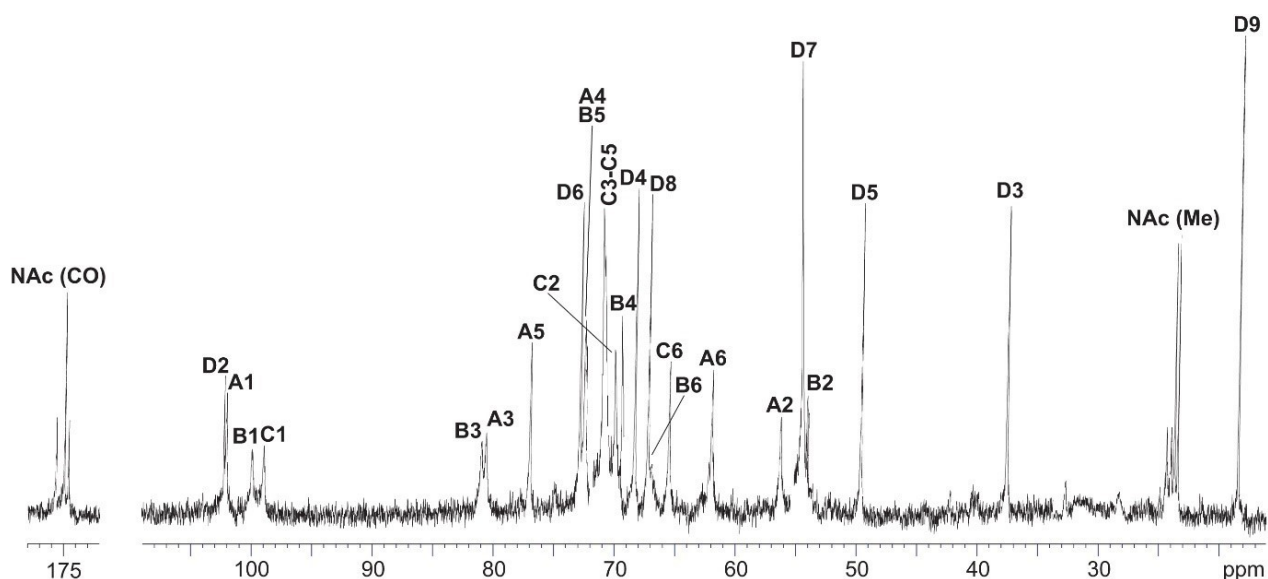


Рисунок 68. Спектр ^{13}C ЯМР КПС *A. baumannii* RES-546.

Полная структура КПС *A. baumannii* RES-546 была установлена с помощью одномерной и двумерной ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии (Приложение. Таблица П7) и подтверждена мягким кислотным гидролизом и периодатным окислением. КПС К135 содержал остаток 5,7-ди-N-ацетил-8-эпипсевдаминовой кислоты, ранее не встречавшийся в природе. Этот моносахарид является частью дисахаридной боковой цепи, основная цепь КПС состоит из гомополимера $\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glc}\rho\text{NAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Glc}\rho\text{NAc}\text{-}(1\rightarrow$.

Структура КПС (Рисунок 69) была подтверждена анализом гликозида $\beta\text{-8ePseAc2}\text{-}(2\rightarrow 1)\text{-Gro}$ (гликозид **1**) и линейного полимера GlcNAc (полисахарида **2**), полученных периодатным окислением КПС. Химический сдвиг С6 для остатка изомера нон-2-улозоновой кислоты в полисахариде RES-546 при δ 72.5 аналогичен химическому сдвигу С6 при δ 73.0 м.д. свободной $\beta\text{-8ePse5Ac7Ac}$, имеющей аксиальную карбоксильную группу, но значительно отличается от сдвига 70.3 м.д. $\alpha\text{-8ePseAc2}$ с экваториальной карбоксильной группой [214]. Следовательно, 8-эпипсевдаминовая кислота в КПС имеет аксиальную карбоксильную группу и связана через β -связь.

8-эпипсевдаминовая кислота образует часть боковой цепи дисахариды $\beta\text{-8ePseAc2}\text{-}(2\rightarrow 6)\text{-Gal}$ (гликозид **1**). Присоединение боковой цепи к положению С6

Таблица 8. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР синтетически полученных и описанных в литературе моносахаридов Pse5Ac7Ac и 8e-Pse5Ac7Ac [214] и моносахарида **2**, полученного из КПС K135.

	НЗэкв, НЗакс	Н4	Н5	Н6	Н7	Н8	Н9
	С3	С4	С5	С6	С7	С8	С9
	Жзакс,4	Жзэкв,4	Ж4,5	Ж5,6	Ж6,7	Ж7,8	Ж8,9
	1.80, 2.01	4.20	4.27	4.08	4.17	4.10	1.10
	35.6	66.1	49.9	71.4	54.0	68.1	16.7
α -Pse5Ac7Ac	12.0	4.6	3.7	1.0	10.7	3.3	6.5
α -8e- Pse5Ac7Ac	1.82, 2.03	4.25	4.29	4.27	3.82	4.12	1.09
	35.5	66.1	49.9	70.3	54.4	66.4	20.0
	12.3	5.0	4.3	1.8	10.1	1.2	6.6
Моносахарид	1.81, 1.93	4.20	4.25	4.21	3.79	4.14	1.08
2 (8-e- Pse5Ac7Ac)	36.2	66.8	50.3	70.4	54.8	66.0	20.2
	13.2	5.2	4.5	1.4	10.4	1.4	6.6

Генный кластер биосинтеза КПС KL135

Кластер генов KL135 (Рисунок 70) включал модуль из шести генов (*psaABCDEF*) синтеза С8-эпимера Pse5Ac7Ac (8ePse5Ac7Ac). Для всех изученных к настоящему времени штаммов *A. baumannii*, включающих в своем геноме гены *psaABCDEF*, в структуре КПС обнаружен Pse5Ac7Ac. Присутствие 8ePse5Ac7Ac, а не Pse5Ac7Ac, в КПС K135 было подтверждено дополнительным изучением химических сдвигов свободного моносахарида (описано выше).

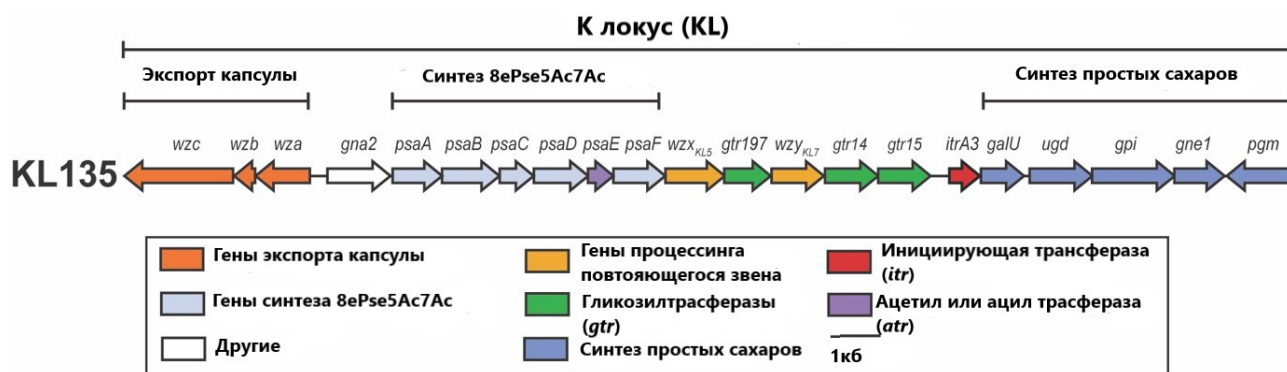


Рисунок 70. Генный кластер биосинтеза КПС *A. baumannii* K135.

Связи от двух гликозилтрансфераз, кодируемых *gtr14* и *gtr15*, были предсказаны ранее для КПС *A. baumannii* K5 [22], K7 [24], K46 [215] и K90 [222]. В генных кластерах K5, K7 и K90 Gtr14 образовывал связь α -D-Galp-(1→6)-D-GlcpNAc, такая же связь присутствовала в КПС K135, а значит Gtr14 отвечала за ее образование. Предполагается, что Gtr15 обладал ослабленной специфичностью в отношении своего акцепторного сахара, поскольку он переносит D-GlcpNAc либо на акцептор D-GlcpNAc, либо на D-GalpNAc через α -(1→3) связь. Тип акцептора определялся присутствием либо ItrA2, либо ItrA3, и поскольку ген *itrA3* присутствовал вместе с *gtr15* в KL135, предполагалось, что Gtr15 отвечал за образование связи α -D-GlcpNAc-(1→3)-D-GlcpNAc. Таким образом, оставшаяся гликозилтрансфераза *gtr197* образовывала связь β -8ePse5Ac7Ac-(2→6)-D-Galp. Следовательно, β -замещенный D-GlcpNAc в основной цепи является первым сахаром, а полимераза Wzy катализировала образование связи β -D-GlcpNAc-(1→3)-D-GlcpNAc между K-звеньями, что согласуется со структурой КПС (Рисунок 69).

* * *

Все исследованные выше КПС имеют уникальное строение, некоторые из них являются структурно родственными друг другу (Таблица 4). Во всех исследованных КПС с нонулозоновой кислотой, остаток кислоты присутствовал 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 -Psep5Ac7RHb и β -8ePsep5Ac7Ac входят в состав дисахаридной боковой цепи, включающей дополнительно остаток α -Gal, который замещается в основную цепь полисахарида через 1→6 связь.

3.3.2 Капсульные полисахариды *Acinetobacter baumannii*, содержащие дезоксипиранозиды

КПС *A. baumannii* SGH807 (K70) [221]

КПС был выделен водно-фенольной экстракцией. По результатам сахарного анализа и метода абсолютной конфигурации КПС K70 содержит остатки L-FucNAc и D-FucNAc в соотношении ~2:1. Дальнейшее исследование КПС показало, что структура также включает D-GalNAcA. D-конфигурация GalNAcA следовала из данных генного кластера.

Структура КПС была определена с помощью одномерных и двумерных ^1H и ^{13}C ЯМР экспериментов (Приложение. Таблица П8). В частности, в спектре ^{13}C ЯМР присутствовали сигналы для четырех аномерных углеродов при δ_{C} 97.9-102.9, C6 GalNAcA при δ_{C} 175.7 (CO₂H) и FucNAc при δ_{C} 16.5-16.8 (CH₃), трех сигналов связанных с азотом (C2) аминогрупп при δ_{C} 49.8-53.2 и четырех N-ацетильных групп при δ_{C} 23.6-23.8 (CH₃) и 174.1-174.8 (CO). В спектре ^1H присутствовали сигналы для четырех аномерных протонов при δ_{H} 4.59-5.48, H6 D-FucNAc при δ_{H} 1.18-1.28 (CH₃) и четырех N-ацетильных групп при δ_{H} 1.91-2.03 (Рисунок 71).

В спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY КПС были обнаружены корреляции H1/H2–H4 спиновых систем остатков **C** и **D** и корреляции H1/H2–H3 для остатков **A** и **B**, что было расшифровано с помощью эксперимента $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY. Относительно большая связевая константа $J_{1,2} \sim 7$ Гц указывала на β -конфигурацию остатка **C**, в то время как остальные остатки **A**, **B** и **D** были α -связанными и характеризовались маленькой связевой константой $J_{1,2}$ (<4 Гц), что было подтверждено химическими сдвигами C5 [205].

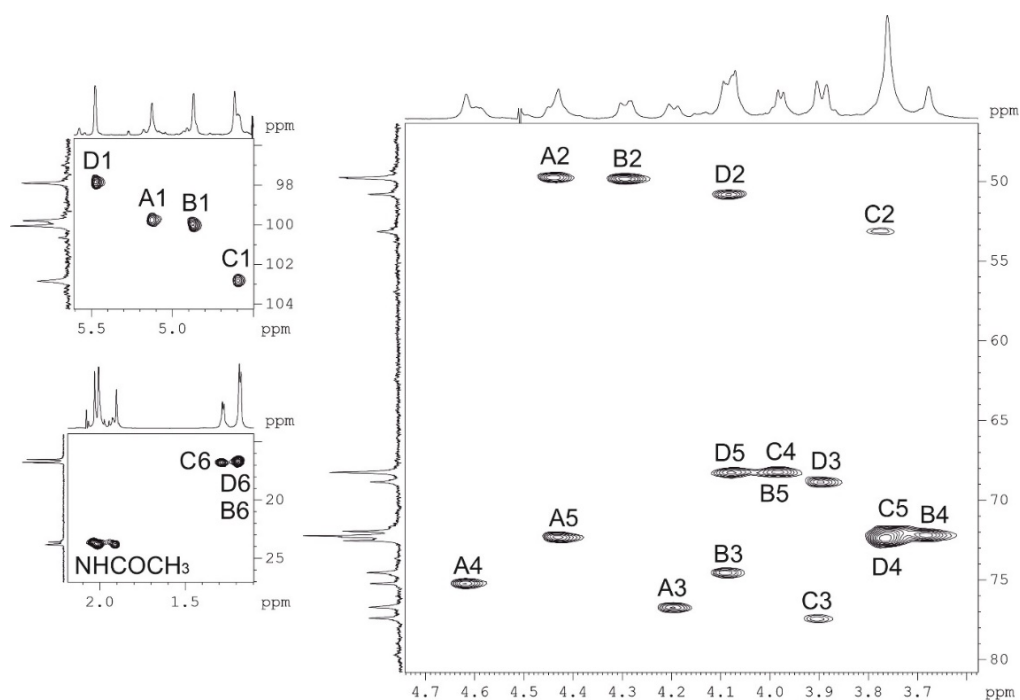


Рисунок 71. Фрагменты двумерного спектра $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC КПС *A. baumannii* K70.

В спектре $^1\text{H},^1\text{H}$ ROESY КПС были обнаружены следующие корреляции между аномерными протонами и протонами связанных атомов углерода: **A** H1/**B** H3, **B** H1/**C** H3, **C** H1/**A** H3 и **D** H1/**A** H4, что указывает на следующие позиции замещения моносахаридов в повторяющемся звене: $\rightarrow 3)\text{-D}(1\rightarrow 4)\text{-A}\text{-(}1\rightarrow 3)\text{-B}\text{-(}1\rightarrow 3)\text{-C}\text{-(}1\rightarrow$.

Структура КПС (Рисунок 72) была подтверждена расщеплением по Смитту, в результате которого был получен модифицированный полисахарид (МПС), соответствующий основной цепи КПС K70 (Рисунок 71). МПС изучали методами спектроскопии ^1H и ^{13}C ЯМР, включая двумерные эксперименты. С помощью метода ГЖХ были идентифицированы L-FucNAc и D-FucNAc в соотношении $\sim 1:1$, из чего следует, что остаток **D** является L-FucNAc. Дальнейшее изучение структуры основной цепи МПС и исходного КПС было невозможно без генетических данных.

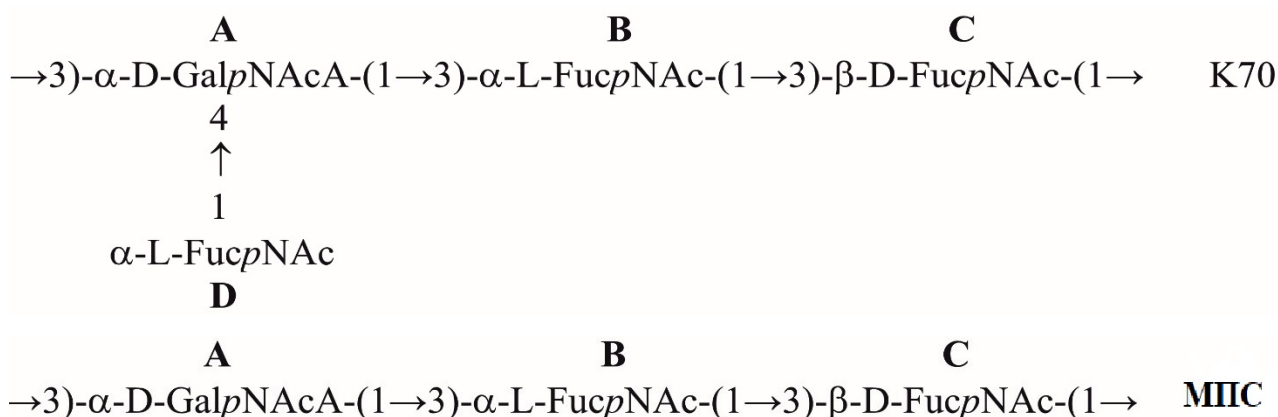


Рисунок 72. Структуры КПС *A. baumannii* K70 и МПС, полученного в результате распада по Смиту.

Характеристика генного кластера биосинтеза КПС *A. baumannii* KL70.

Генный кластер KL70 (Рисунок 73) имел типичное для ацинетобактера строение с генами экспорта капсулы, процессинга повторяющегося звена, гликозилтрансферазами и другими генами.

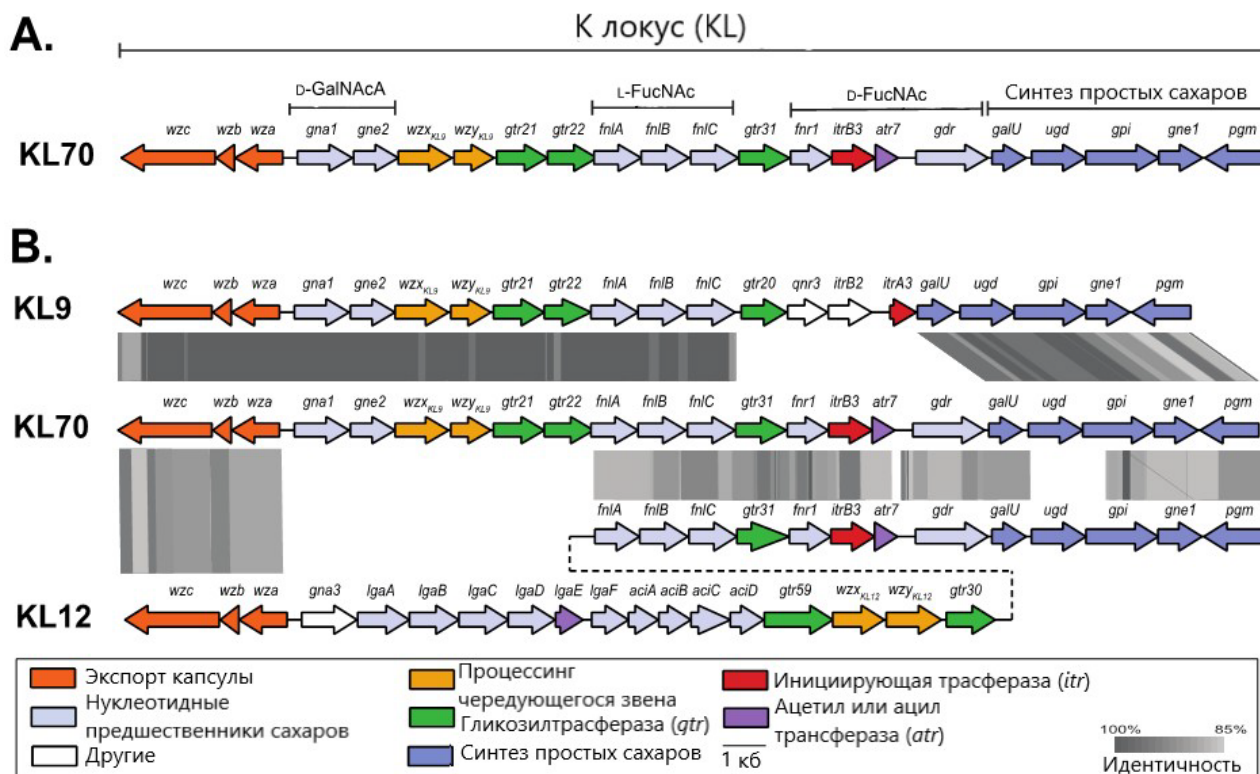


Рисунок 73. Структура генных кластеров (A) KL70, (B) KL9, KL70 и K112.

Как было обнаружено ранее, КПС K70 состоит из тетрасахаридного повторяющегося звена, состоящего из основной трисахаридной цепи α-D-

GalpNAcA-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-β-D-FucpNAc и бокового остатка L-FucpNAc, связанного через α-(1→4) связь с остатком D-GalpNAcA (Рисунок 74). Структурный анализ КПС не может определить, какой остаток в основной цепи представляет собой первый сахар К-звена, однако эти данные следуют из анализа генного кластера полисахарида, так присутствие гена *itrB3* в KL70 указывало на то, что остаток D-FucpNAc является первым сахаром повторяющегося звена КПС. Поскольку в полученной структуре присутствует только один остаток D-FucpNAc, этот остаток был отнесен к первому сахару биологического звена КПС.

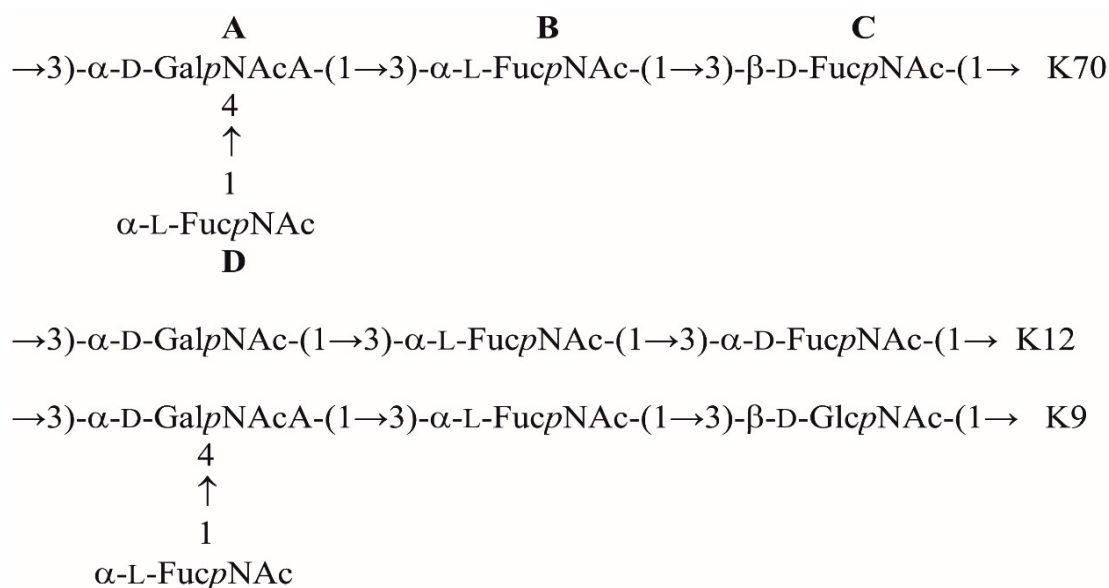


Рисунок 74. Структуры КПС *A. baumannii* K70, K12 [26] и K9 [221].

В генном кластере присутствовали три гликозилтрансферазы *gtr21*, *gtr22* и *gtr31*. Gtr31 кодировался геном, который ранее был обнаружен в ряде кластеров биосинтеза КПС *A. baumannii*, таких как KL12 [26], KL13 и KL73 (входят в состав данной работы) [219] и KL125 [223]. Было предсказано, что в этих структурах Gtr31 образовывал общую для этих КПС связь α-L-FucpNAc-(1→3)-D-FucpNAc, и такая же связь присутствует в КПС K70. В каждом из этих кластеров ген *gtr31* являлся частью генного модуля, который также включал *fnr3* и *gdr* для синтеза UDP-D-FucpNAc и *itrB3* для включения D-FucpNAc в качестве первого сахара.

Остальные гликозилтрансферазы (Gtr21 и Gtr22) кодировались генами, общими для *A. baumannii* KL9. КПС K9 и K70 имеют общий сегмент цепи α-L-FucpNAc-(1→4)-α-D-GalpNAcA-(1→3)-L-FucpNAc, который катализировался

общими для KL70 и KL9 гликозилтрансферазами. Таким образом была определена структура КПС *A. baumannii* K70 (Рисунок 74).

КПС *A. baumannii* RCH51 (K24) [224]

КПС был выделен из сухих бактериальных клеток, как было описано выше. Методом моносахаридного анализа было установлено присутствие GlcNAc, GalNAc, Fuc3NAc и Gal в примерно равном соотношении. С помощью одномерной и двумерной ЯМР спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C (Рисунок 75) было выявлено пять спиновых моносахаридных систем: α -D-GlcNAc (A), α -D-Gal (B), β -D-GlcNAc (C), β -D-Fuc3NAc (D) и α -D-GalNAc (E), все моносахариды находились в пиранозной форме (Приложение. Таблица П9).

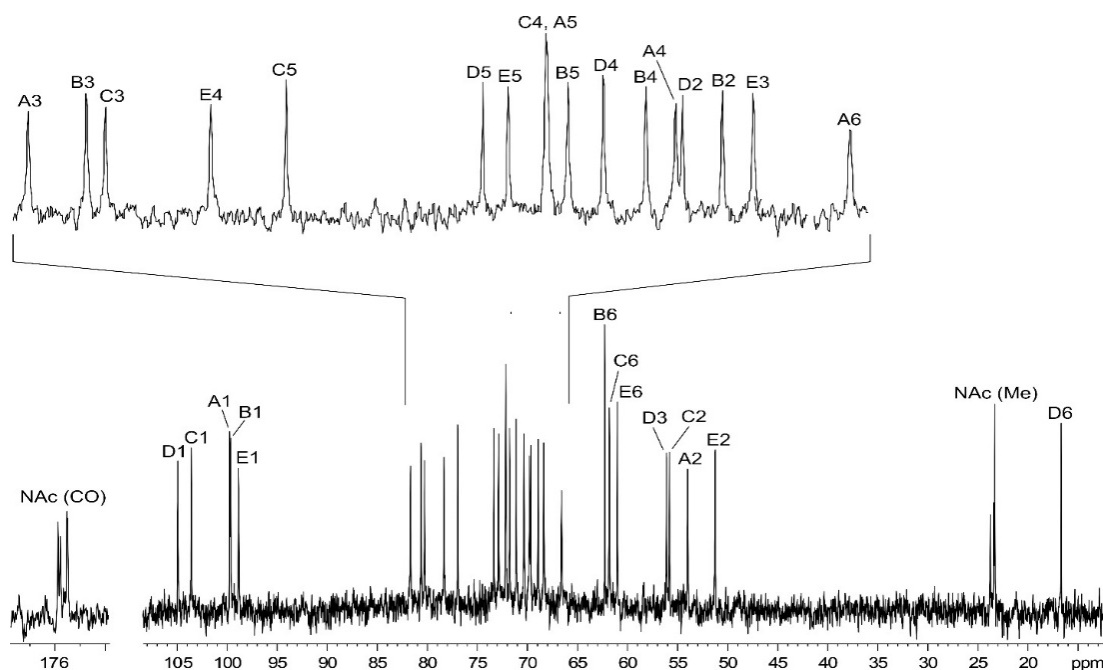


Рисунок 75. ^{13}C ЯМР спектр ^{13}C КПС *A. baumannii* RCH51.

А спектре ^1H , ^1H TOCSY были обнаружены следующие корреляции: H1/ H-2,3,4,5 для остатков A и C, что указывает на *глюко*-конфигурацию этих остатков и H1/ H-2,3,4 для остатков B, D и E, что указывает на *галакто*-конфигурацию. β -конфигурация остатков C и D была определена на основании корреляции H1/ H5 в спектре ^1H , ^1H ROESY, тогда как α -конфигурация остатков A, B и E следовала из относительно низких связевых констант $J_{1,2}$ (<3 Гц) (Рисунок 76).

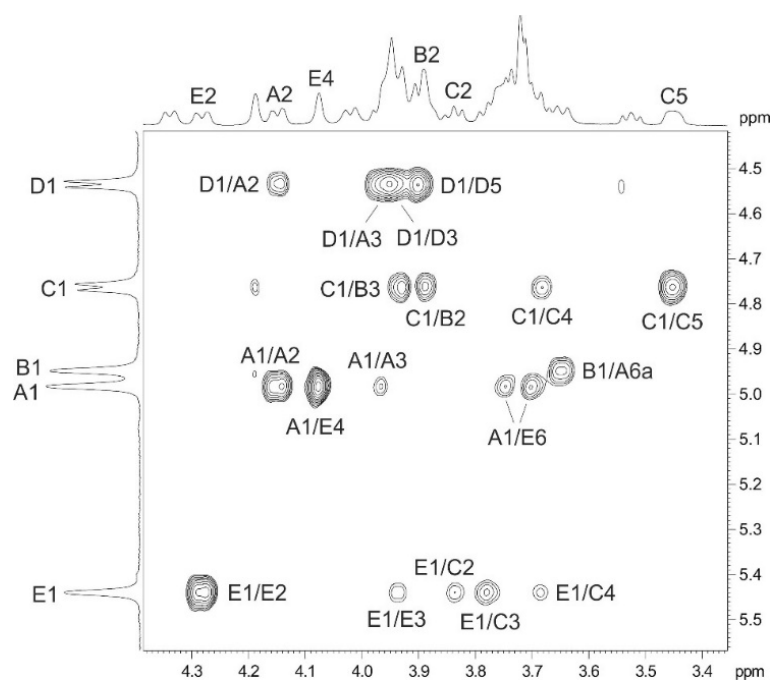


Рисунок 76. Фрагмент двумерного спектра $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY КПС *A. baumannii* RCH51.

Смещение в слабое поле сигналов С3 остатков **С** и **В**, С4 остатка **Е**, С3 и С6 остатка **А** при δ 80.3, 80.6, 78.3, 81.7, 66.6 (Рисунок 75), по сравнению с их положениями в соответствующих незамещенных моносахаридах, совместно с корреляциями, обнаруженными в эксперименте $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY, свидетельствуют о разветвленном строении КПС: **С**→**В**→ (**Д**→) **А**→**Е**. Таким образом, КПС *A. baumannii* K24 имеет строение, приведенное на Рисунке 77.

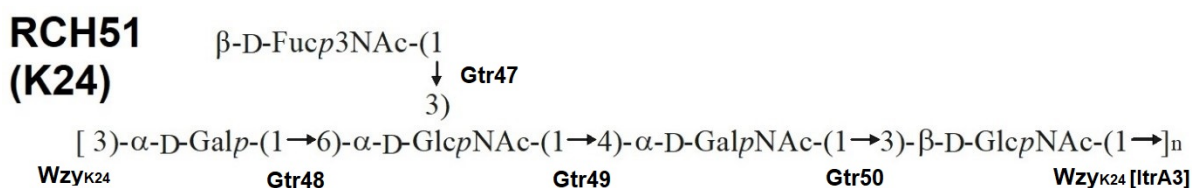


Рисунок 77. Структура КПС *A. baumannii* K24.

Характеристика генного кластера биосинтеза КПС *A. baumannii* KL24.

Генный кластер KL24 (Рисунок 78) имел характерные для вида *A. baumannii* сегменты: гены экспорта капсулы, синтеза нуклеотидных предшественников простых сахаров, а также dTDP-D-Fuc3NAc, четыре гена гликозилтрансфераз и гены процессинга.

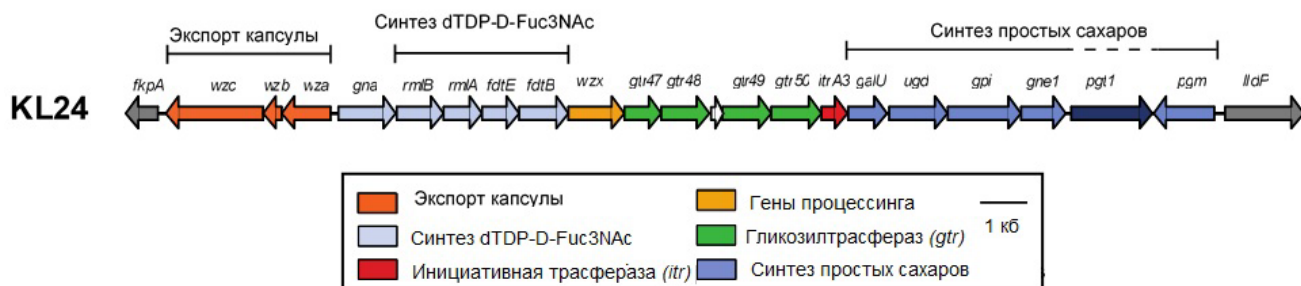


Рисунок 78. Генный кластер биосинтеза капсулы KL24.

Интересной особенностью KL24 являлось то, что полимераза Wzy находилась не в генном кластере, а на геномном острове в другой части хромосомы (Рисунок 79).

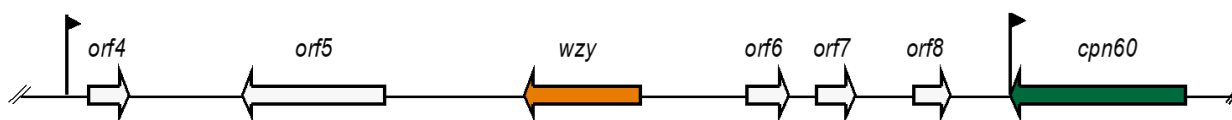


Рисунок 79. Геномный остров, на котором располагается ген полимеразы wzy.

Гены гликозилтрансфераз *gtr49*, *gtr50* и *itrA3* соседствовали друг с другом в кластере KL24, такая же группа генов была найдена в *A. baumannii* KL43, KL47 и KL88 [41]. Гликозилтрансфераза Gtr50_{KL24} на 98% была идентична Gtr50_{KL43} и на 94% идентична Gtr50_{KL47}, которые образуют связь α -D-GalpNAc-(1→3)-D-GlcpNAc в КПС K43 и K47, следовательно и в КПС Gtr50 отвечала за образование этой связи. Аналогично, Gtr49_{KL24} на 90% идентична Gtr49 в KL43 и в KL47, которая образует связь α -D-GlcpNAc-(1→4)-D-GalpNAc. Третья гликозилтрансфераза в KL24 (Gtr48_{KL24}) была на 73% идентична Gtr62_{K30}, которая отвечала за связь α -D-Galp-(1→6)-D-Glcp [35]. КПС K24 включает сегмент α -D-Galp-(1→6)-D-GlcpNAc-(1→4)-D-GalpNAc-(1→3)-D-GlcpNAc с C3-замещенным D-GlcpNAc, который является первым сахаром в K-звене. Оставшаяся гликозилтрансфераза Gtr47_{KL24} была на 50% идентична WafD у *A. nosocomialis* LUN3483 [225], которая катализировала образование связи β -D-Fucp3NRHb-(1→3)-D-GalpNAc в соответствующей полисахаридной структуре и вполне вероятно, что Gtr47_{KL24} являлась гликозилтрансферазой, образующей связь β -D-Fucp3NAc-(1→3)-D-

Glc_pNAc в K24. Структура КПС K24 согласуется с данными генного кластера KL24.

КПС *A. baumannii* BAL212 (K57) [226]

КПС был выделен из сухих бактериальных клеток методом Вестфалия. Методом моносахаридного анализа было обнаружено присутствие в КПС GalNAc, Qui4N и Glc. Структура КПС была определена с помощью одномерной и двумерной ЯМР спектроскопии на ядрах ¹H и ¹³C. На основе связевых констант и характерных химических сдвигов в спектрах ¹H и ¹³C ЯМР были идентифицированы три остатка α-GalpNAc (A, B, C) и по одному остатку β-Quip4NAc (D) и α-Glcp (E). Последовательность моносахаридов в повторяющемся звене была определена с помощью двумерного эксперимента ¹H, ¹H ROESY, в котором были обнаружены следующие корреляции: A H1 / D H3, B H1 / A H3, C H1 / B H4 и D H1 / C H3 при δ_H 5.08 / 3.72, 5.14 / 3.98, 4.94 / 4.08 и 4.58 / 4.12, соответственно. Из-за отсутствия корреляции для H1 Glcp (E), место присоединения этого остатка к цепи определялось по перекрестному пику между H1 Glcp и C6 3-замещенного GalpNAc (C) при δ_H 4.91/67.3 в спектре ¹H, ¹³C НМВС. Положения замещения были подтверждены сравнением соответствующих сигналов в спектре ¹³C ЯМР с сигналами незамещенных моносахаридов по их смещению в слабопольную область на 5-10 м.д.. На основании полученных данных был сделан вывод о структуре КПС *A. baumannii* K57, которая представлена на Рисунке 80.

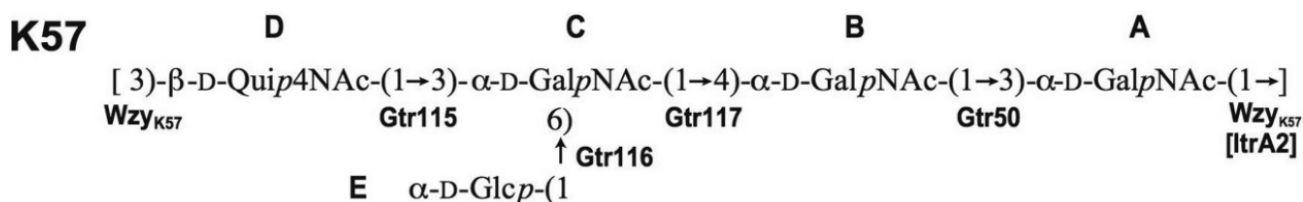


Рисунок 80. Структура КПС *A. baumannii* BAL212 (K57).

Характеристика генного кластера биосинтеза КПС *A. baumannii* KL57.

Генный кластер BAL212 имел типичное для вида *A. baumannii* расположение, с генами экспорта капсул слева (Рисунок 81) и генами для синтеза простых сахаров

справа. Центральный сегмент KL57 включал группу генов (*rmlB*, *rmlA*, *vioA* и *vioB*), которые отвечали за синтез D-Qui4NAc.

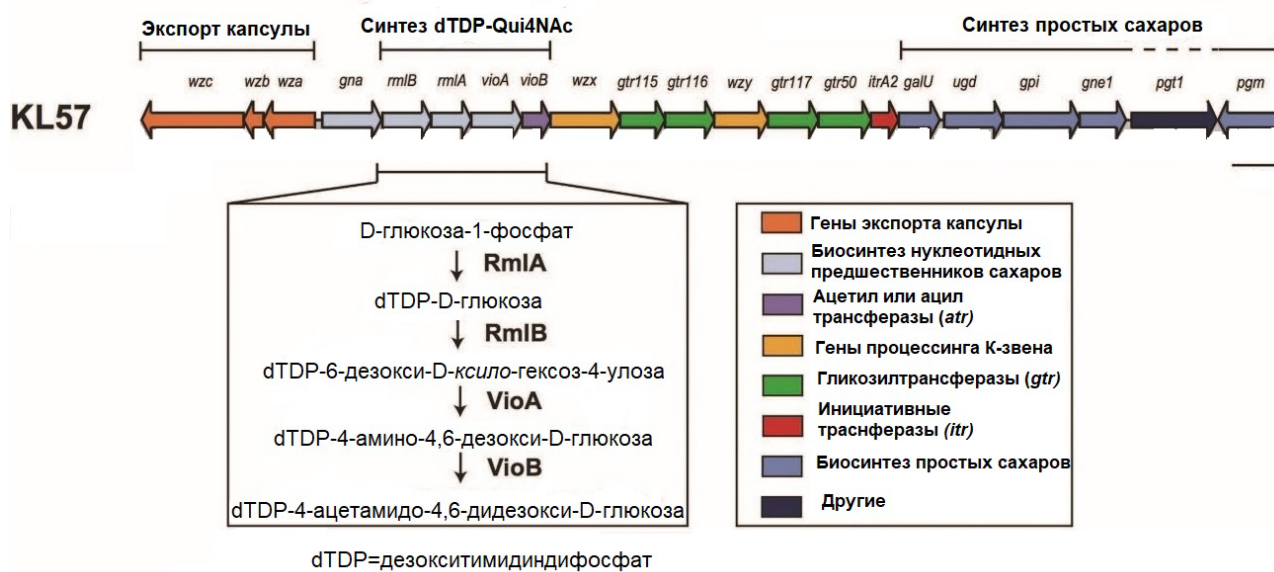


Рисунок 81. Структура генного кластера KL57.

Генный кластер KL57 кодировал иницирующую трансферазу ItrA2, на 96% идентичную ItrA2 у *A. baumannii* NIPH190, которая была ответственна за связывание D-GalpNAc с липидным носителем ундекаprenилфосфатом при инициации синтеза К-звена [41]. Поэтому можно было сделать вывод, что остаток D-GalpNAc является первым моносахаридов К-звена K57. Непосредственно перед *itrA2* в KL57 находился ген, кодирующий гликозилтрансферазу, которая связывала второй остаток D-GalpNAc с D-GalpNAc через α -(1→3) связь. Трансфераза Gtr117 была ответственна за связь α -D-GalpNAc-(1→4)-D-GalpNAc, Gtr116 - за связь α -D-Glcp-(1→6)-D-GalpNAc, а Gtr115 - за связь β -D-Quip4NAc-(1→2)-D-GalpNAc. В середине сегмента генного кластера присутствовала полимераза Wzy, отвечающая за образование связи α -D-GalpNAc-(1→3)-D-Quip4NAc между К-звеньями K57. Структура КПС K57 согласуется с данными генного кластера KL57.

КПС *A. baumannii* 46-1632 (K144) [227]

КПС был выделен из *A. baumannii* 46-1632 методом водно-фенольной экстракции, методом моносахаридного анализа было выявлено наличие в КПС Rha и GlcN в примерном соотношении 2:1. Абсолютные конфигурации моносахаридов

были установлены с помощью анализа ^{13}C ЯМР спектра с учетом известных закономерностей эффектов гликозилирования [205], L-конфигурация Rha была подтверждена с помощью метода ГЖХ в виде перацетилированного (*S*)-2-октилрамнозида [202].

В спектрах ^1H и ^{13}C ЯМР было обнаружено шесть сигналов аномерных атомов, относящихся к четырем остаткам дезоксигексоз и двум остаткам гексоз (Приложение. Таблица П10). Один остаток GlcNAc был определен по сигналам при δ_{H} 2.05 в спектре ^1H и при δ_{C} 23.8 (CH_3) и 176.1 (CO) а также 56.9 (C2) в спектре ^{13}C ЯМР. Другой остаток гексозы был отнесен к GlcA в связи с корреляционным пиком между группой CO_2H (δ_{C} 175.1) и H5 GlcA (δ_{H} 3.93) в гетероядерном эксперименте $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC. Анализ двумерного эксперимента $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC для КПС выявил гексахаридное повторяющееся звено, состоящее из четырех остатков Rha и по одному остатку GlcA и GlcNAc.

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР были расшифрованы с помощью двумерных экспериментов, таких как $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 82). Конфигурации гликозидных связей были установлены по химическим сдвигам C5 в спектре ^{13}C ЯМР сравнением с опубликованными данными для α - и β -пиранозидов [205]. β -Конфигурация остатков GlcNAc (**A**) и GlcA (**E**) были подтверждены относительно большими значениями связевых констант $J_{1,2} = 8.5$ и 6.5 Гц, соответственно, и по корреляциям H1/ H3 и H1/ H5 в спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY КПС. α -конфигурация остатков Rha (**B**, **D**, **C**, **F**) была подтверждена по наличию корреляций H1/H2 и отсутствию H1/ H3 в H1/ H5 в спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY.

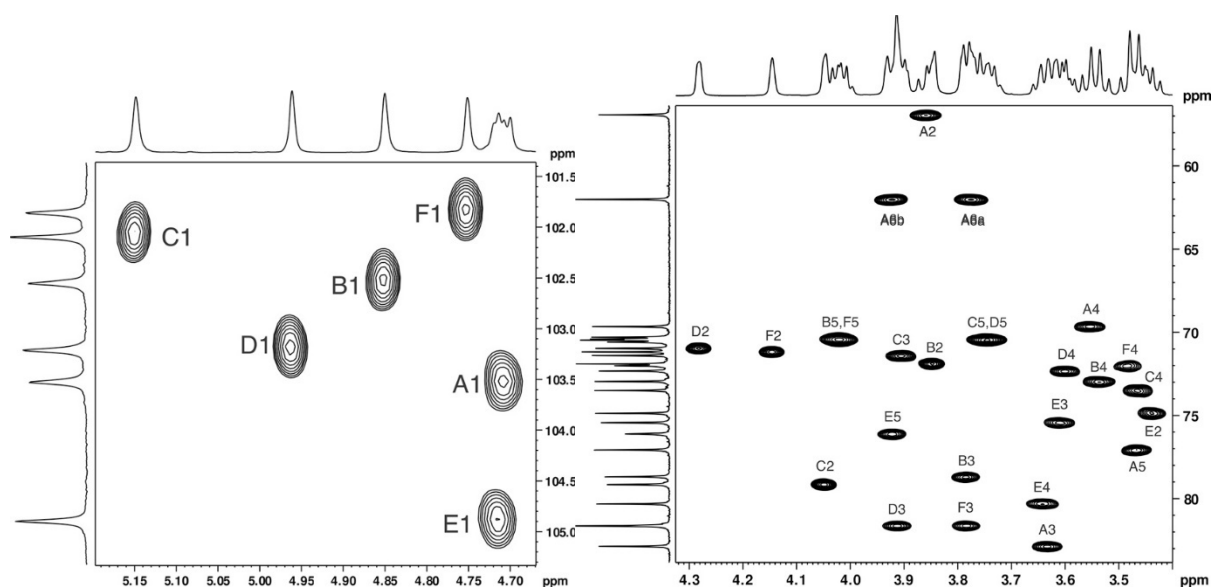


Рисунок 82. Фрагменты спектра ^1H , ^{13}C HSQC КПС К144.

Анализ связей и последовательностей был проведен с помощью двумерного эксперимента ^1H , ^1H ROESY, который продемонстрировал следующие межзвеньевые корреляции: Rha **F** H1/ GlcA **E** H4, GlcA **E** H1/ Rha **D** H3, Rha **D** H1/ Rha **C** H2, Rha **C** H1/ Rha **B** H3, Rha **B** H1/ GlcNAc **A** H3 и GlcNAc **A** H1/ Rha **F** H3 при δ_{H} 4.75/3.64, 4.72/3.91, 4.96/4.05, 5.15/3.79, 4.85/3.63 и 4.71/3.78, соответственно.

Участки гликозилирования были подтверждены по позиции сигналов C3 остатка **A**, C3 остатка **B**, C2 остатка **C**, C3 остатка **D**, C4 остатка **E** и C3 остатка **F** в области слабого поля при δ 82.9, 78.7, 79.2, 81.7, 80.3 и 81.6, соответственно, в спектре ^{13}C ЯМР полисахарида в сравнении с сигналами в незамещенных соответствующих моносахаридах [205,206].

Было установлено, что полисахарид К144 имеет линейное строение, представленное на Рисунке 83.

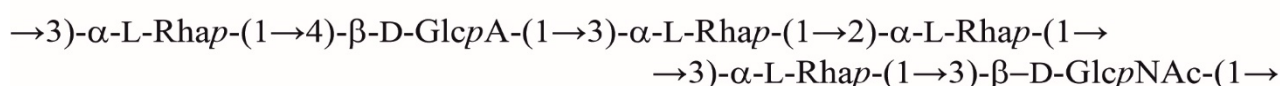


Рисунок 83. Структура КПС К144.

Структура КПС была подтверждена периодатным окислением по Смигу, которое привело к образованию двух олигосахаридов (ОС1 и ОС2) (Рисунок 84) из-за расщепления связи между GlcA и одним остатком Rha. Олигосахариды были разделены с помощью гель-жидкостной хроматографии. Их структуры были определены с помощью одномерных и двумерных ЯМР экспериментов. ОС1 и ОС2 содержат по два остатка Rha, одному GlcNAc и эритровую кислоту в качестве агликона, образующуюся из 4-замещенного остатка GlcA в случае образования ОС1 или лактон эритровой кислоты в случае ОС2. Структуры ОС1 и ОС2 были подтверждены с помощью ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, как было описано выше для КПС. Строение было подтверждено с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением. В масс-спектрах присутствовали пики ионов $[\text{M}-\text{H}]^+$ при m/z 630.2254 и m/z 612.2143 (экспериментальные значения) против расчетных m/z 630.2251 и 612.2145 для ОС1 и ОС2, соответственно.

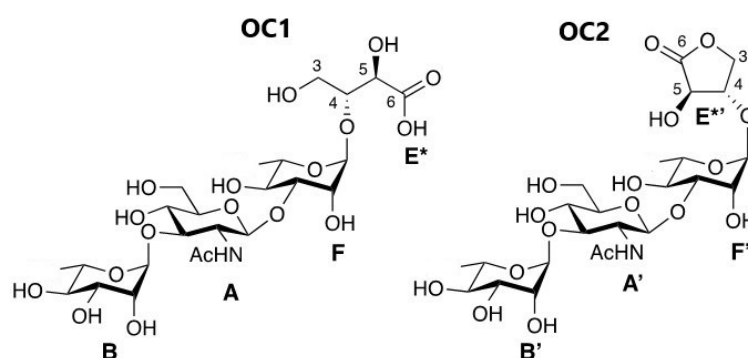


Рисунок 84. Структуры ОС1 и ОС2, полученных в результате распада по Смигу КПС K144.

Генный кластер биосинтеза КПС KL144

Структура K144 включает гексасахаридное повторяющееся звено, включающее D-GlcpNAc, D-GlcpA и четыре остатка L-Rhap (Рисунок 85), что согласуется с генами синтеза простых и сложных нуклеотидных предшественников моносахаридов, присутствующих в кластере генов KL144.

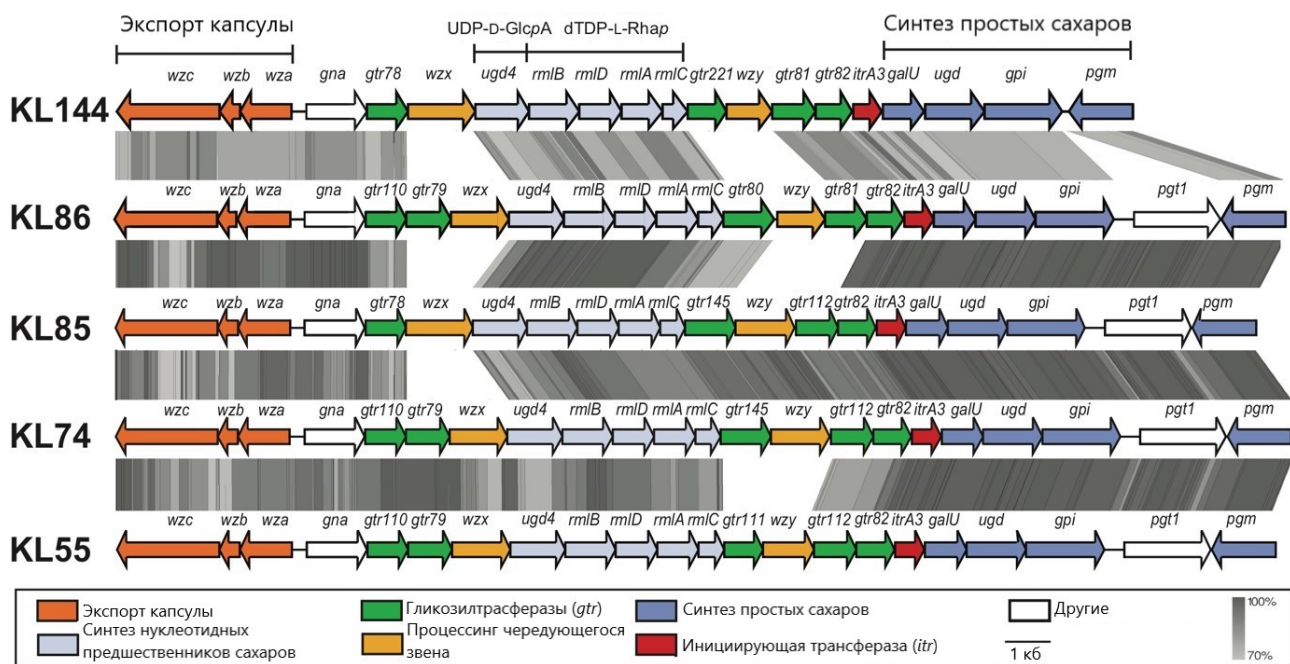


Рисунок 85. Генные кластеры биосинтеза КПС KL144, KL85, KL86, KL74 и KL55 [44].

Поскольку KL144 включал ген *itrA3* для инициации трансферазы GlcpNac-1-P, D-GlcpNac является первым сахаром звена КПС K144. Таким образом, Wзу_{K144} образовывал связь β-D-GlcpNac-(1→3)-L-Rhap между K-звеньями. Моносахаридный состав КПС K144 аналогичен составу КПС K55, K74, K85 и K86 [46]. Сравнение кластеров генов KL144 с кластерами KL86, KL55, KL74 и KL85 выявило значительное сходство последовательностей между всеми пятью кластерами генов. Ген *gtr82* присутствовал во всех пяти родственных кластерах генов, и ранее предполагалось, что Gtr82 образует связь α-L-Rhap-(1→3)-D-GlcpNac в КПС K55, K74 и K85 [44]. Та же самая связь присутствует в K144, таким образом, Gtr82 был присвоен соответствующей связи. Аналогичным образом, Gtr78, кодируемый KL144, также был обнаружен в KL85. Ранее было предсказано, что Gtr78 образует связь α-L-Rhap-(1→4)-D-GlcpA в K85 и эта связь также присутствует в КПС K144. Gtr221 на 60% идентичен Gtr111 из KL55, который катализирует образование связи β-D-GlcpA-(1→3)-L-Rhap в КПС K55. КПС K144 включает в себя такой же участок полисахарида, поэтому к этой связи был присвоен Gtr22. Gtr81 был на 35% идентичен Gtr112, что позволяет предположить,

что он также может быть многофункциональным. Кроме того, Gtr81 на 78% идентичен с Gtr159 из KL87, который образует связь α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-L-Rhap в структуре K87 [47]. Таким образом, Gtr81 представлял собой новую многофункциональную Gtr, которая, вероятно, образовывала трисахарид в K144 и отвечала за образование связей α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap и α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)-L-Rhap. Генный кластер биосинтеза капсулы KL144 соответствует структуре КПС K144.

КПС *A. baumannii* KZ1098 (K26) [228]

КПС был выделен методом Вестфалья. С помощью метода моносахаридного анализа КПС методом ГЖХ было обнаружено присутствие в КПС Rha, Man, 6dTal, Glc и GlcN в соотношении $\sim 1: 1.1: 0.7: 1.7: 0.6$, соответственно. В спектрах ^1H (Рисунок 86) и ^{13}C ЯМР КПС KZ1098 были обнаружены сигналы O-ацетильной группы при $\delta_{\text{H}} 2.19$ и $\delta_{\text{C}} 21.7$ (CH_3). Соотношение этих сигналов по отношению к сигналам N-ацетильных групп при $\delta_{\text{H}} 2.09$ и $\delta_{\text{C}} 23.7$ (CH_3) указывало на $\sim 80\%$ степень O-ацетилирования КПС.

Присутствие нестехиометрического O-ацетилирования в КПС вызывало структурную гетерогенность и как следствие плохую разрешимость ЯМР экспериментов. Для определения полной структуры КПС O-ацетат удалили с помощью 12% водного раствора NH_4OH . O-дезацетилирование существенно повлияло на химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР остатка 6dTal (остаток **B**), в то время как в случае других моносахаридных остатков никакого изменения химических сдвигов обнаружено не было, что говорит о том, что O-дезацетилирование не привело к другим структурным изменениям (Приложение. Таблица П11).

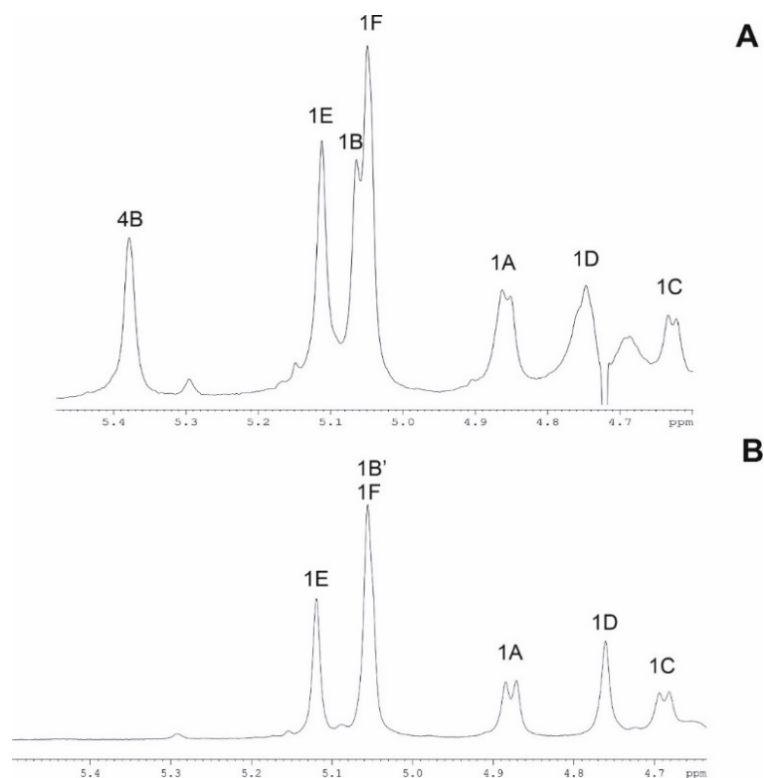


Рисунок 86. Фрагменты спектров ^1H исходного КПС (**A**) и полисахарида после дезацетилирования (**B**).

Спектр ^{13}C ЯМР О-дезацетилированного полисахарида (ДПС) содержал шесть аномерных сигналов при δ 95.2-103.0, двух метильных групп (С6 6-дезоксигексоз) при δ 16.7 и 17.8, четырех гидроксиметильных групп (С6 гексоз) при δ 61.6-62.8, одного N-связанного углерода (C2 GlcNAc) при δ 56.9, другие моносахаридные сигналы при δ 66.6-82.8 и сигналы одной N-ацетильной группы при δ 23.7 (CH_3) и 175.3 (CO). В ^1H ЯМР спектре ДПС присутствовали сигналы шести аномерных атомов при δ 4.69-5.12, двух метильных групп (H6 6-дезоксигексоз) при δ 1.24 и 1.29, другие протонные сигналы при δ 3.39-4.55 и одной N-ацетильной группы при δ 2.09 м.д.. Повторяющееся гексасахаридное звено ДПС состояло из двух остатков Glc (**C** и **F**) и по одному остатку Man (**D**), Rha (**E**), 6dTal (**B**) и GlcNAc (**A**).

Спектр ^1H ЯМР ДПС был расшифрован с использованием двумерных экспериментов $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY и TOCSY, затем был расшифрован ^{13}C ЯМР спектр с использованием эксперимента $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 87). Конфигурации гликозидных связей были установлены по химическим сдвигам C5 в спектре ^{13}C

ЯМР сравнением с опубликованными данными для α - и β -пиранозидов [205]. Последовательность замещения моносахаридных остатков в ДПС была определена с помощью двумерного эксперимента $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY, в котором наблюдались следующие корреляционные пики: Glc **F** H1/Rha **E** H2, Rha **E** H1/Man **D** H3, Man **D** H1/Glc **C** H4, Glc **C** H1/6dTal **B** H3, 6dTal **B** H1/ GlcNAc **A** H3 и GlcNAc **A** H1/Man **D** H2. Типы замещения были так же подтверждены с помощью данных спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC.

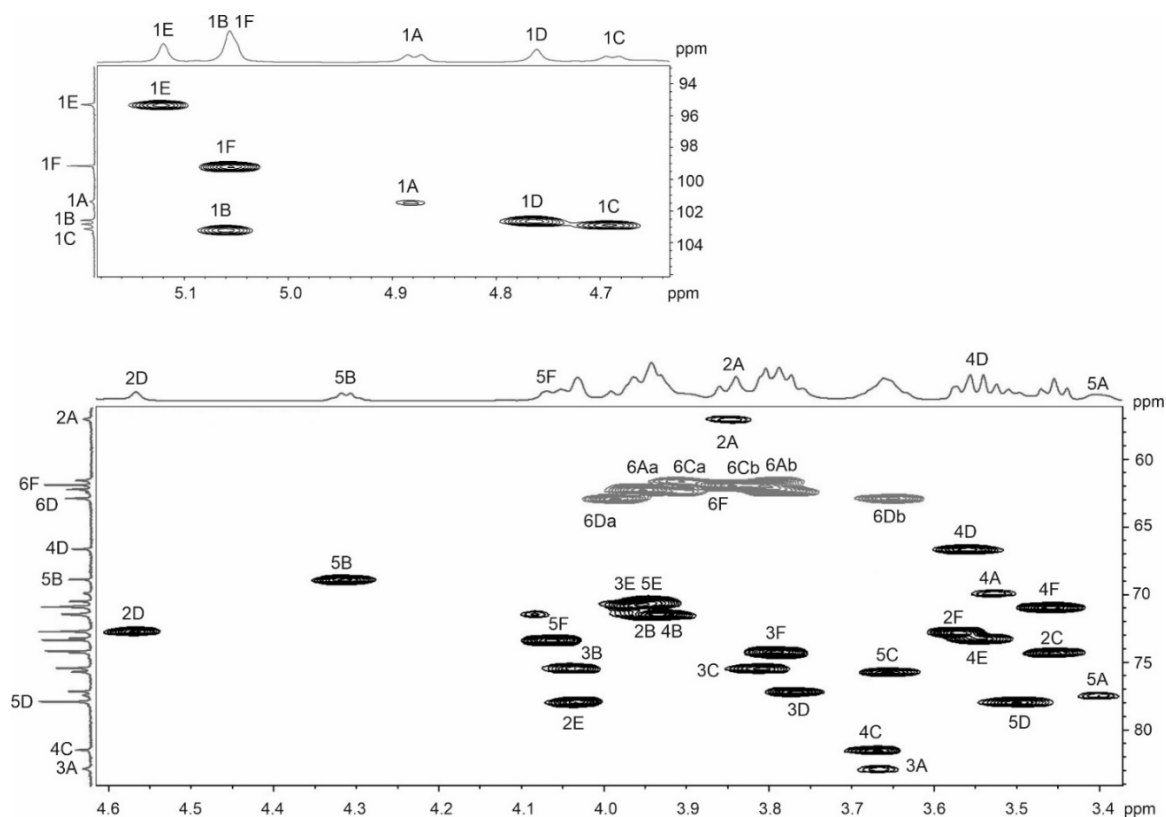


Рисунок 87. Фрагменты двумерного $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC ЯМР спектра ДПС KZ1098.

Структура ДПС была подтверждена с помощью распада по Смитсу, который привел к окислению остатка **C** в основной цепи и остатка **F** в боковой цепи с образованием олигосахарида (ОС), в качестве агликона у которого был эритрит. Структура ОС была установлена с использованием ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, как было описано для ДПС. С помощью метода масс-спектрометрии высокого разрешения в масс-спектрах были обнаружены следующие ионы для ОС m/z 634.2544 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 656.2361 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ и 672.2092 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (рассчитанные значения: m/z 634.2553, 656.2372 и 672.2112, соответственно).

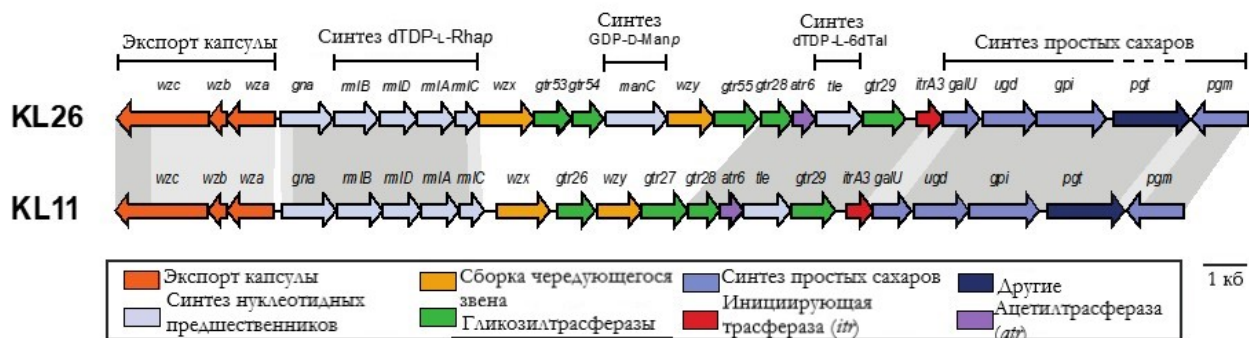


Рисунок 89. Генные кластеры биосинтеза КПС K26 и K11 [25].

Он также включал группу генов *rmlBDAC* для синтеза dTDP-L-Rha, *tle* для синтеза dTDP-L-6dTal и еще ген, функция которого ранее не была установлена у *A. baumannii*. Продукт этого нового гена был на 49% идентичен ManC из *Escherichia coli*, который превращает Man-1-P в GDP-D-Man [25]. Таким образом, ген был предварительно назван *manC*. Сегмент генного кластера KL26 *gtr28-atr6-tle-gtr29-itrA3* являлся общим с кластером KL11 *A. baumannii*. Структура КПС K11 известна [25] и ранее было предсказано, что Gtr28 и Gtr29 образуют первую и вторую связи (β -D-Glcp-(1→3)- α -L-6dTalp-(1→3)-D-GlcpNAc) в основной цепи КПС K11. Однако роль Atr6 в ацетилировании КПС не установлена. Поэтому ожидалось, что K26 будет включать тот же трисахаридный сегмент, что и в КПС K11, а также дополнительные остатки D-Manp и L-Rhap, добавленные к структуре оставшимися тремя гликозилтрансферазами, кодируемыми KL26. Gtr53 отвечал за образование связи α -D-Glc-(1→2)- α -L-Rha, Gtr54 за связь α -L-Rha-(1→3)- α -D-Man и Gtr55 за α -D-Man-(1→2)- β -D-Glc, как в КПС K83 [25]. Структура генного кластера KL26 соответствует структуре КПС K26.

КПС *A. baumannii* 48-1789 (K106) и MAR24 (K112) [229]

КПС были выделены с помощью водно-фенольной экстракции. С помощью метода моносахаридного анализа родственных КПС 48-1789 и MAR24 было определено наличие 6dTal, Glc и GlcNAc в соотношении ~1.0 : 0.8 : 3 в случае 48-1789 и Rha, 6dTal, Glc and GlcNAc в соотношении ~1.5 : 1.0 : 0.8 : 3 в случае MAR24.

С помощью двумерной и одномерной ЯМР спектроскопии в КПС 48-1789 было определено четыре спиновые системы: β -GlcNAc (**A**), α -GlcNAc (**D**), α -6dTalp (**B**) и β -Glc (**C**). В КПС MAR24 были найдены те же моносахариды за исключением дополнительного остатка β -Rhap (**E**) (Приложение. Таблица П12). Все моносахариды были представлены в пиранозной форме. В спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY КПС 48-1789 были обнаружены следующие корреляции: H1 с H-2,3,4,5,6 для остатка **A**, H1 с H2 остатка **B**, H1 с H-2,3,4,5 остатка **C** и H1 с H-2,3,4,6 для остатка **D** (Рисунок 90).

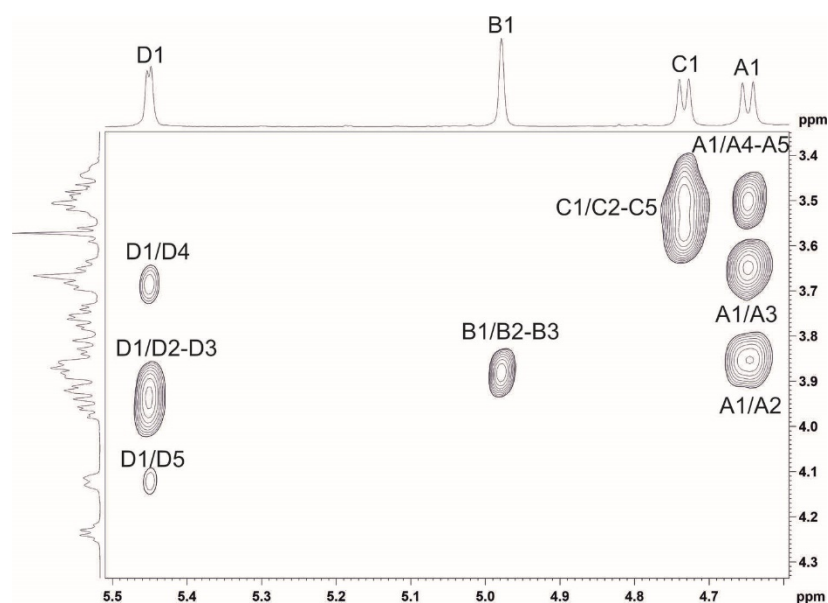


Рисунок 90. Фрагмент двумерного спектра $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY КПС 48-1789.

Протонные сигналы каждой спиновой системы были установлены с помощью гомоядерного эксперимента $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY. В связи с относительно большой связевой константой $J_{1,2} \sim 7-8$ Гц остатки **A** и **C** были отнесены к β -связанным, в то время как α -связанный остаток **D** был охарактеризован маленьким значением константы $J_{1,2}$ (< 4 Гц). Конфигурации гликозидных связей были подтверждены химическими сдвигами C5 в спектре ^{13}C ЯМР сравнением с опубликованными данными для α - и β -пиранозидов [205]. Сравнение химических сдвигов углерода остатка **B** с опубликованными данными показало, что остаток **B** в случае КПС 48-1789 имеет α -конфигурацию. Последовательность моносахаридных остатков в цепи была определена с помощью гетероядерного эксперимента $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$

НМВС, в котором были выявлены следующие корреляции аномерного протона и связанного углерода соседнего остатка: Н1 (**A**) с С4 (**D**), Н1 (**B**) с С3 (**A**), Н1 (**C**) с С3 (**B**) и Н1 (**D**) с С2 (**C**) (Рисунок 91). Слабопольное положение сигналов при δ 77.2, 83.3, 76.4 и 80.7 для сигналов С2 остатка **C**, С3 остатков **A** и **B** и С4 остатка **D**, соответственно, свидетельствовало о линейной структуре КПС 48-1789 и выявило участки гликозилирования моносахаридов в повторяющемся К-звене.

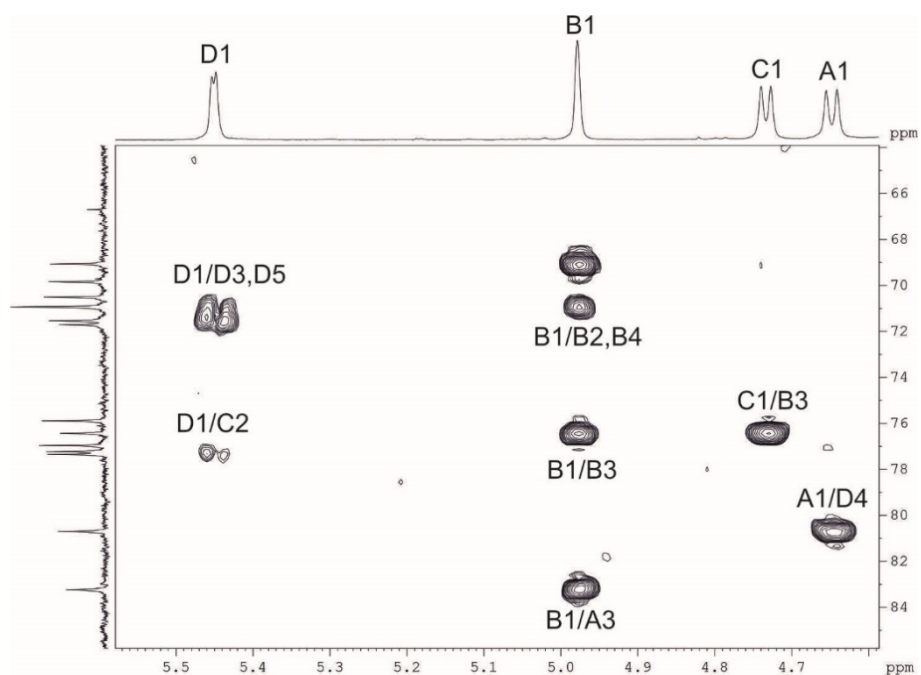


Рисунок 91. Фрагмент двумерного спектра ^1H , ^{13}C НМВС КПС 48-1789.

Корреляции в спектре ^1H , ^1H TOCSY для остатков **A-D** в КПС K112 были очень похожи на те, что были представлены в спектре КПС K106. Присутствовала только дополнительная корреляция Н1/Н2 для остатка **E**. При сравнении химических сдвигов ^{13}C ЯМР остатков **B** и **E** с опубликованными данными соответствующих моносахаридов (Приложение. Таблица П12) было установлено, что остаток **B** имел α -конфигурацию, а остаток **E** β -конфигурацию [205]. Картина замещения в повторяющемся звене K112 КПС *A. baumannii* MAR24 была определена с помощью двумерного гетероядерного эксперимента ^1H , ^{13}C НМВС, в котором наблюдались следующие корреляции: Н1 (**A**)/ С3 (**D**), Н1 (**B**)/С3 (**A**), Н1 (**C**)/С3 (**B**) и Н1 (**E**)/С4 (**D**) (Рисунок 92).

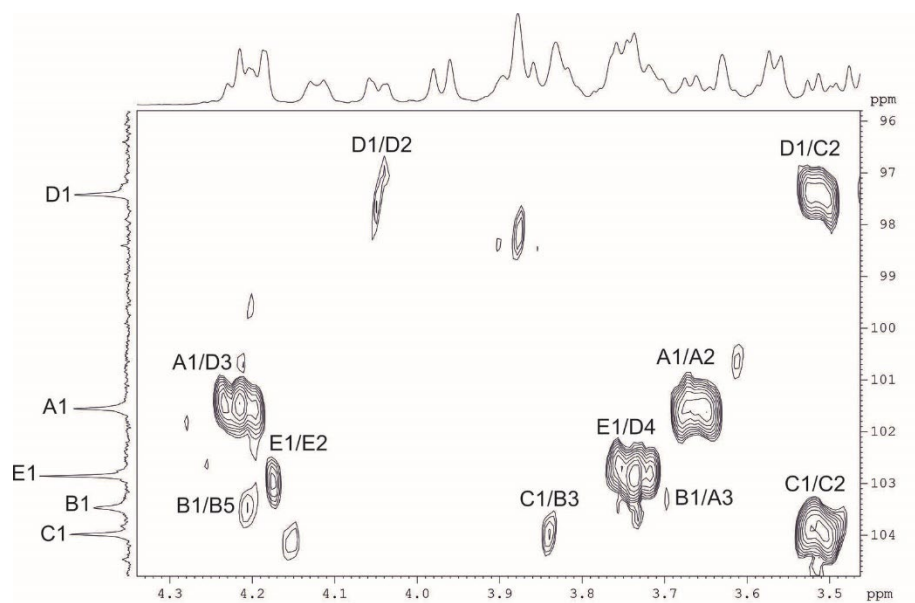
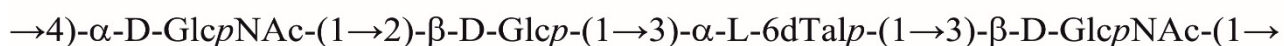


Рисунок 92. Фрагмент двумерного спектра ^1H , ^{13}C HMBSC КПС MAR24.

Таким образом было установлено строение КПС K106 и K112 (Рисунок 93).

КПС K106



КПС K112

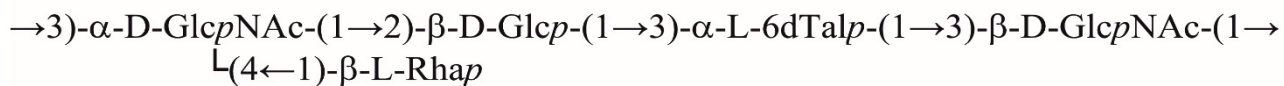
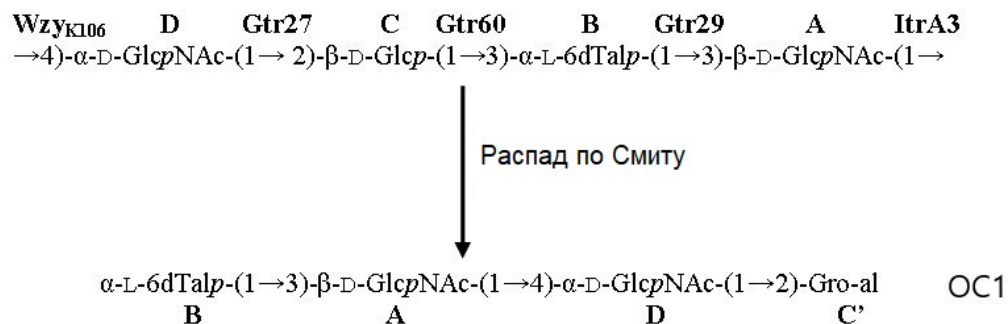


Рисунок 93. Структуры КПС K106 и K112.

Структуры КПС были подтверждены деградацией по Смитту с последующей идентификацией образующихся олигосахаридов (ОС1-ОС3) с помощью ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии. ОС1 и ОС2 являются ожидаемыми продуктами, содержащими глицеральдегид в качестве агликона, который был получен из 2-замещенного остатка $\beta\text{-Glc}$ (C) (Рисунок 94). ОС3 имеет циклический агликон из-за неполного гидролиза разрушенного остатка $\beta\text{-Glc}$ (C).

A. baumannii K106 (48-1789)



A. baumannii K112 (MAR24)

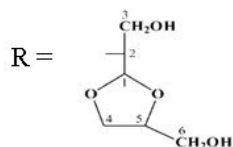
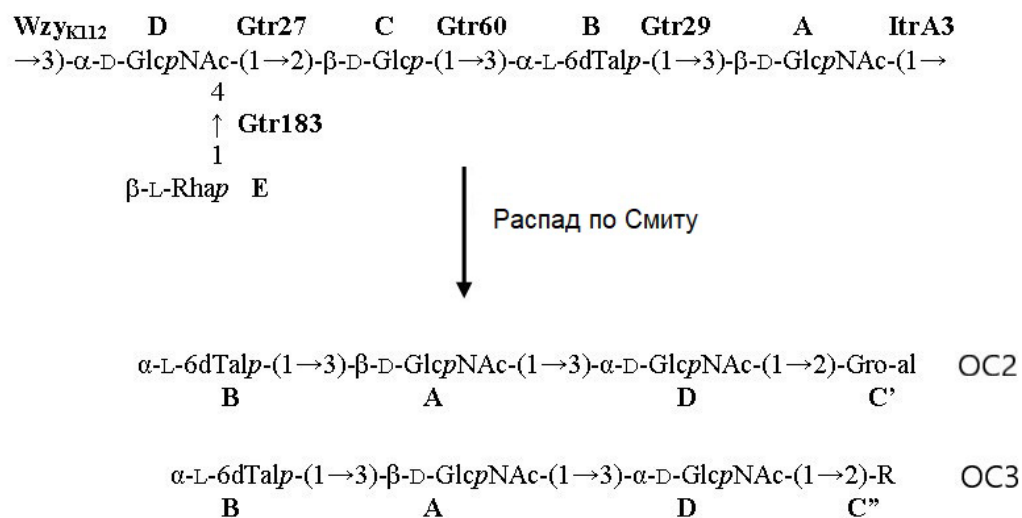


Рисунок 94. Распад по Смиту КПС K106 и K112.

Характеристика генных кластеров KL106 и KL112

Генные кластеры KL106 и KL112 включали гены *rmlBDAC* для синтеза dTDP-L-Rhap и ген эпимеразы *tle* для образования dTDP-L-6dTalp (Рисунок 95). Генные кластеры KL106 и KL112 были идентичны большей частью генов, отличались только областью, содержащей гены *wzx* и *wzy*, с дополнительным геном *gtr* (*gtr183*), обнаруженным в KL112. Как в KL106, так и в KL112 центральная часть кластера была представлена следующими генами *gtr27-gtr60-atr8-tle-gtr29-itra3*. Структуры К-звеньев КПС K106 и K112 включали один и тот же фрагмент α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow 3).

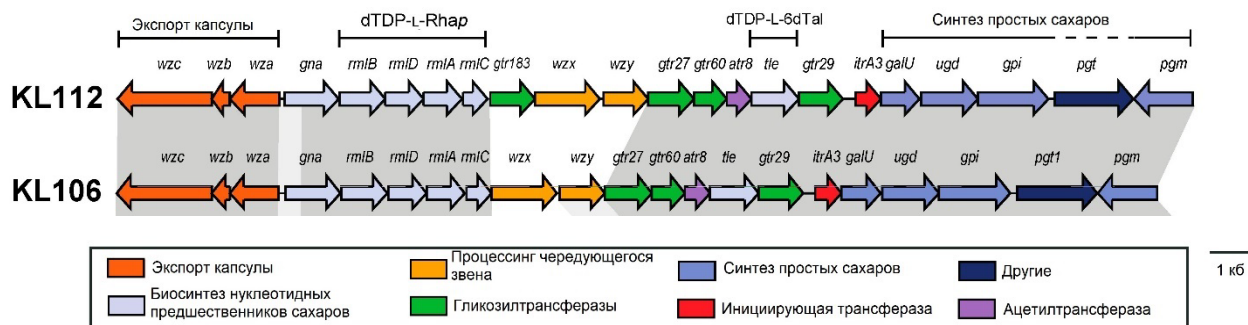


Рисунок 95. Генные кластеры KL106 и KL112.

Однако, учитывая уникальный ген *wzy* и дополнительный ген *gtr183* в KL112, предполагалось, что КПС К112 будет включать дополнительный моносахаридный остаток с другой связью между К-звеньями. Состав общей основной цепи согласовался с ролью, предсказанной ранее для белков Gtr27, Gtr60, Gtr29 и ItrA3 в KL112. Каждое К-звено КПС начинается с β -связанного остатка D-GlcpNAc, переносимого ItrA3, что позволило с уверенностью определить связи, образованные различными Wzy полимеразми. Wzy_{KL106} и Wzy_{KL112} были идентичны на 80% и образовывали одинаковую связь β -D-GlcpNAc-(1→4)-D-GlcpNAc между К-звеньями [25]. Помимо общей основной цепи КПС К112 включает боковой сахар L-Rhap, который присоединен к остатку D-GlcpNAc в основной цепи. В KL112 фермент Gtr183_{KL112} присоединял этот сахар через β -(1→4) связь. Таким образом, анализ генных кластером KL112 и KL106, подтверждает структуры КПС К106 и К112.

КПС *A. baumannii* A388 (K20) и G21 (K21) [230].

КПС был выделен с помощью метода Вестфалля. С помощью методов моносахаридного анализа в КПС К20 и К21 было выявлено присутствие D-Gal и D-GlcNAc. Химические сдвиги ¹H ЯМР внутри каждой спиновой системы были отнесены с использованием двумерных экспериментов ¹H,¹H COSY и TOCSY. Было выделено четыре спиновые системы, включая QuiN4N (остаток **A**), GlcA (остаток **B**), GlcN (остаток **C**) и Gal (остаток **D**), все находились в пиранозной форме (Приложение. Таблица П14).

Относительно большие связевые константы $J_{1,2} \sim 7-8$ Гц указывали на β -конфигурацию всех моносахаридов в КПС. С помощью метода ЯМР спектроскопии в КПС было обнаружено наличие неуглеводного заместителя - 3-гидроксипропанойльной группы (ЗНб) и ацеталя пировиноградной кислоты (Pyr). Они были определены по Н/С корреляциям в гетероядерном спектре $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 96) и ключевым корреляциям в спектре $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC: C1/ H3 и C2/ H3 при δ 175.0/1.51 и 101.2/1.51 для Pyr, H2/C1, H2/C3, H4/C2 и H4/C3 при δ 2.32/175.1, 2.32/66.2, 1.21/46.3 и 1.21/66.2 для ЗНб, соответственно.

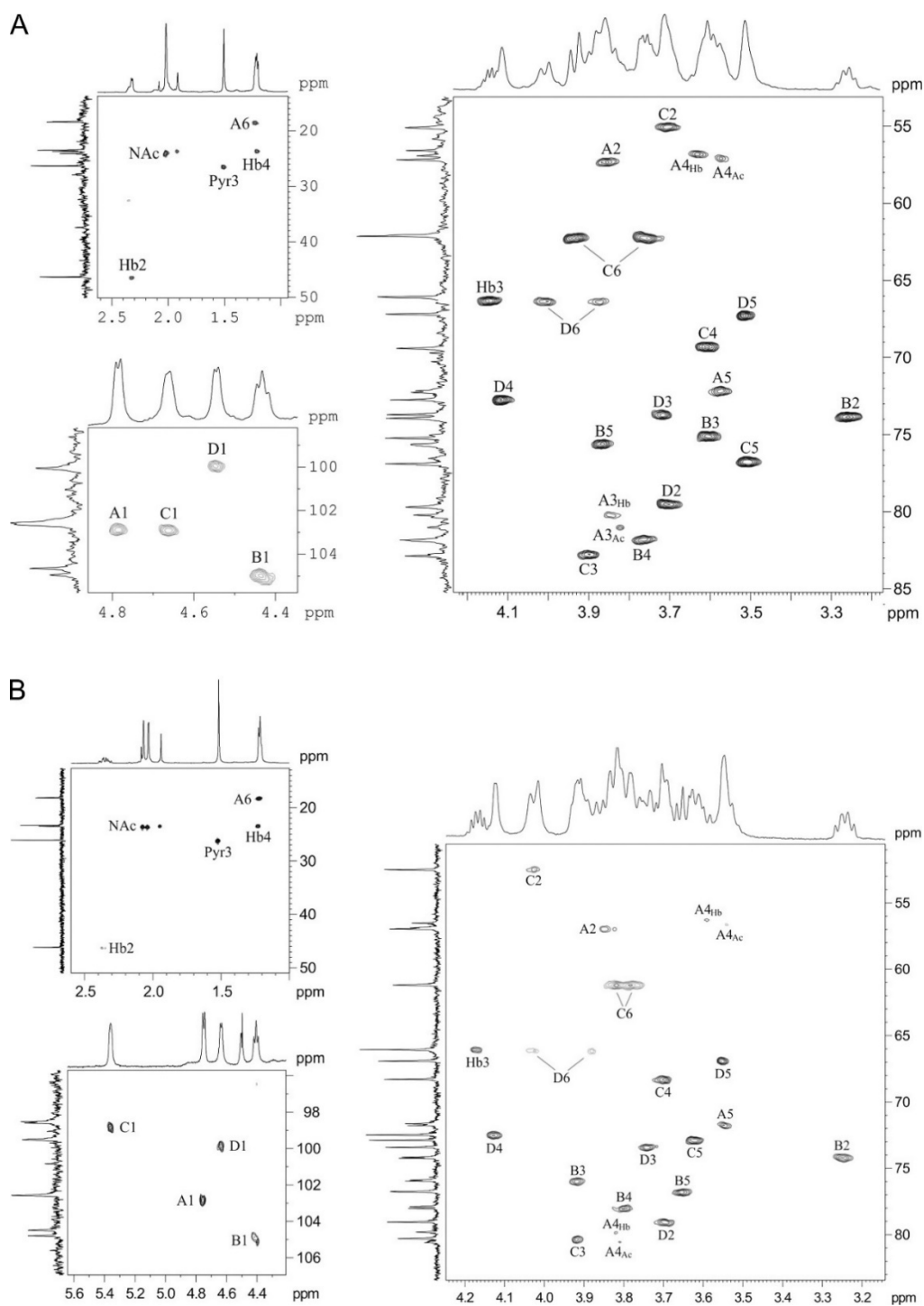


Рисунок 96. Фрагменты двумерного спектра ^1H , ^{13}C HSQC КПС K20 (A) и K21 (B).

S-конфигурация остатка 3-гидроксибутаноила была определена с помощью ГЖХ в виде трифторацетата-(S)-2-октилового эфира. Слабопольное положение сигналов C4 и C6 остатка $\beta\text{-Gal}$ при δ 72.6 и 66.2, соответственно, в комбинации с сильнопольным положением сигнала C5 при δ 67.2, в сравнении с позицией этих сигналов в незамещенном моносахариде $\beta\text{-Galp}$ [205] доказывало, что Руг

присоединен в 4 и 6 положение галактозы. Химический сдвиг δ 26.3 С3 для Руг указывал на R-конфигурацию [231]. Позиция сигналов в слабом поле гликозилированных атомов углерода С3 остатков **A** и **C**, С4 остатка **B** и С2 остатка **D** при δ 80.8, 82.6, 81.6 и 79.5, в сравнении с химическими сдвигами этих сигналов в незамещенных моносахаридах [205], указывала на позиции замещения моносахаридных остатков в повторяющемся звене. Последовательность моносахаридов в повторяющемся звене КПС была определена с помощью двумерного эксперимента $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY, в котором наблюдались корреляции между аномерными протонами и протонами соседних сахаров Н1 (**A**)/Н4 (**D**), Н1 (**D**)/ Н3 (**C**), Н1 (**C**)/ Н4 (**B**) и Н1 (**B**)/Н3 (**A**) (Рисунок 97). Остаток QuiN4N давал две серии сигналов в ЯМР спектрах, в которых наблюдалась разница в кросс-пиках Н4/С4 (основной при δ 3.63/ 56.7 и минорный при δ 3.57/57.1) наиболее заметная в спектрах $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 96).

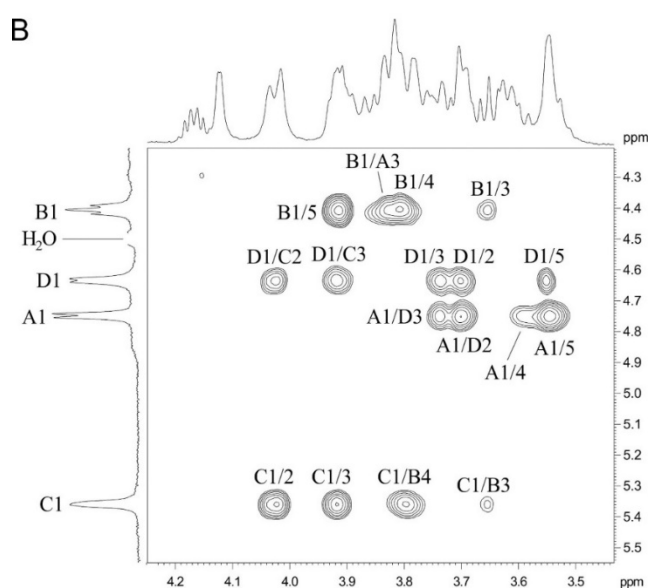
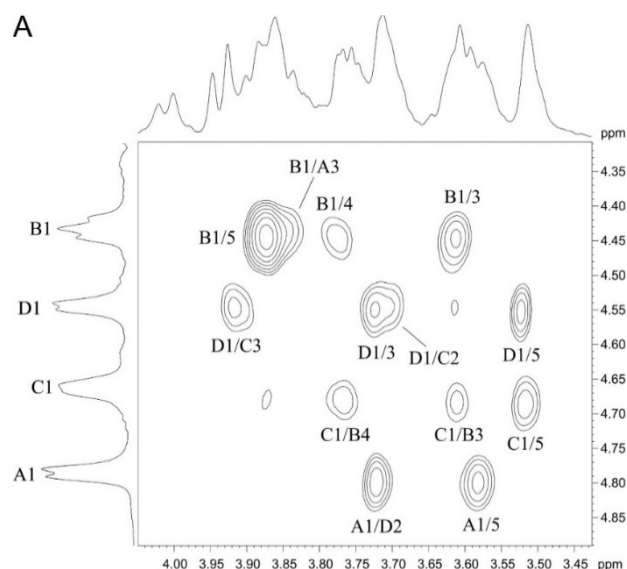


Рисунок 97. Фрагменты ЯМР спектров ^1H , ^1H ROESY КПС K20 (A) и K21 (B).

Скорее всего, наблюдаемая неоднородность являлась результатом вариации типа N-ацильного заместителя при N4 QuiN4N [3Nb и Ac]. Для подтверждения этого факта ЯМР спектры КПС были сняты в смеси H_2O : D_2O (9:1), что позволило обнаружить протоны, непосредственно связанные с азотом. Сигналы трех NH протонов были обнаружены в области δ 7.50–7.90 и отнесены к GlcN NH₂ (δ 7.64), QuiN4N NH₂ (δ 7.85, 7.87) и QuiN4N NH₄ (δ 7.51, 7.53). Отнесение было произведено с помощью экспериментов ^1H , ^1H COSY и ^1H , ^1H TOCSY. В спектре ^1H , ^1H ROESY присутствовали корреляции для NH₂ GlcN и NH₂ QuiN4N с NAc

группами при δ 7.64/ 2.02 и 7.85, 7.87/ 2.02, соответственно, и NH₄ QuiN4N с H₂ N3Hb группой при δ 7.51/2.32 (мажорная) и NAc группа при δ 7.53/1.92 (минорная).

Позиция замещения 3-гидроксibuтаноильной группы в 4N QuiNAc4N(3Hb) была подтверждена по корреляции между H4 QuiN4N и C1 N3Hb (CO группа) при δ 3.63/175.1 в спектре ¹H, ¹³C HMBSC. Соотношение интенсивностей сигналов H₂ для 3Hb и Ac в QuiN4N производных (AHb и AAc, соответственно) демонстрировало, что N-ацильные группы представлены в КПС в соотношении ~2:1, соответственно. Основываясь на этих данных, было сделано заключение о том, что КПС K20 *A. baumannii* A388 имеет структуру, показанную на Рисунке 98.

Структура была подтверждена распадом по Смитсу, который привел к расщеплению остатка GlcA (B) с получение олигосахарида A→D→C с треоновой кислотой в качестве агликона (частично 1,4-лактон).

Структура КПС K21 очень похожа на структуру КПС штамма K20, рассмотренную выше. Одномерные и двумерные спектры ¹H и ¹³C ЯМР КПС K21 и K20 очень похожи, за исключением сигналов для остатка α-GlcpNAc (Приложение. Таблица П14). При сравнении спектров ЯМР было установлено, что структуры КПС K20 и K21 отличаются лишь аномерной конфигурацией остатка C (β- в случае КПС K20 и α - в КПС K21). Таким образом, структуры КПС K21 и K20 можно наблюдать на Рисунке 98.

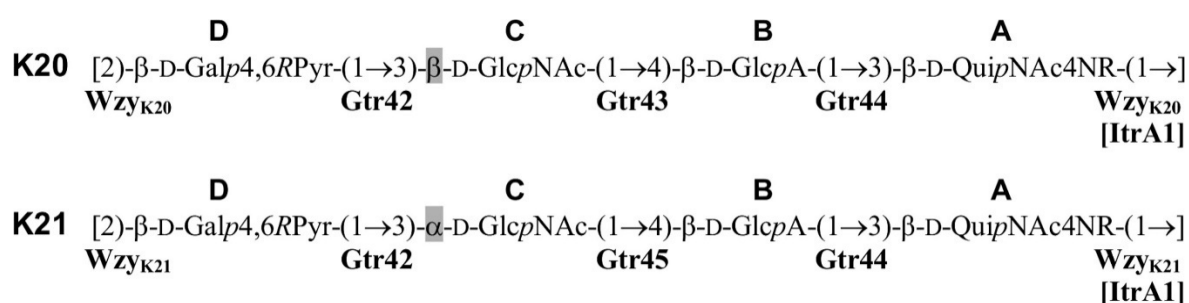


Рисунок 98. Структуры КПС K20 и K21 с обозначением гликозилтрансфераз, ответственных за образование гликозидных связей в КПС.

Характеристика генных кластеров KL20 и KL21

Генный кластер KL20 имел типичное расположение для *A. baumannii* с центральной областью, окруженной генами экспорта КПС (*wza-wzb-wzc*) и генами *galU*, *ugd*, *gpi*, *gne1* и *pgm* для синтеза простых нуклеотидных предшественников сахаров, таких как, например, D-GalpNAc (Рисунок 99).

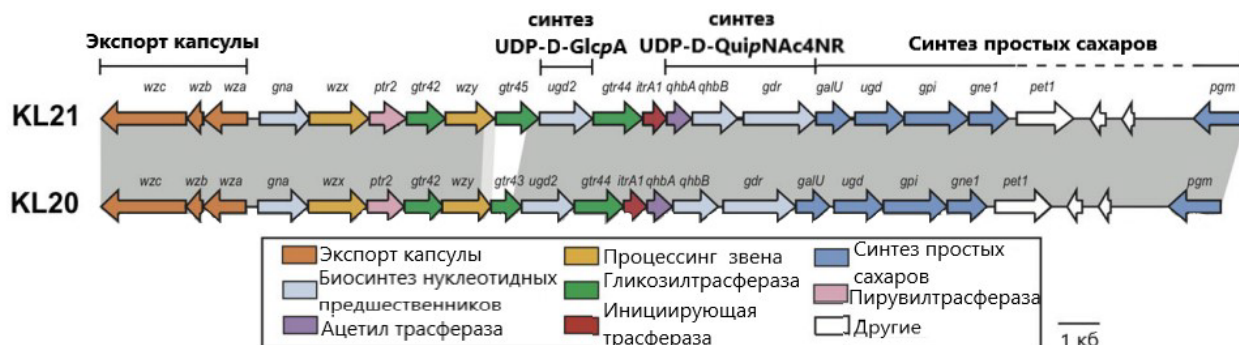


Рисунок 99. Генные кластеры биосинтеза КПС KL20 и KL21.

Оба KL20 и KL21 включали гены *qhbA*, *qhbB* и *gdr*, участвующие в синтезе UDP-D-QuipNAc4NR, где ацил представляет собой либо (S)-3-гидроксибутаноил или ацетил [232]. Также в генном кластере присутствовал ассоциированный ген иницирующей трансферазы (*itrA1*), который необходим для инициации синтеза КПС при добавлении UDP-D-QuipNAc4NR к ундекапренилфосфату во внутренней мембране [232]. KL20 и KL21 содержали по три гена гликозилтрансфераз (*gtr*), хотя только два (*gtr42* и *gtr44*) являлись общими для двух кластеров генов. Продукты гена *wzy* были идентичны на 91%, что позволило предположить, что они могли образовывать такую же или подобную связь между К-звеньями. Гликозилтрансферазы кодировали белки Gtr43 и Gtr45, которые образовывали связь β -D-GlcpNAc-(1→4)-D-GlcpA в КПС K20 и связь α -D-GlcpNAc-(1→4)-D-GlcpA в КПС K21. Генные кластеры KL20 и KL21 кодировали идентичные белки Gtr44, которые были на 36% идентичны Gtr52 из *A. baumannii* K25. Было предсказано, что Gtr52 катализирует образование связи β -D-ManpNAcA-(1→3)-D-QuipNAc4NR в КПС K25 [33] и аналогичной связи β -D-GlcpA-(1→3)-D-QuipNAc4NR в КПС K20 и K21, которая формировалась с помощью Gtr44 в K20 и K21. Точно так же белок Gtr42 был идентичен на 99% и на 31% с Gtr33 из *A. baumannii* KL14, который, как

ранее предполагалось, образует связь β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow 3)-D-Galp [27]. Gtr42 также на 46% был идентичен WdcF из кластера генов O-антигена O59 *Salmonella enterica*, который так же катализирует образование связи β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-GlcpNAc в полисахариде O59 [233]. Таким образом, Gtr42 был отнесен к связи β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-GlcpNAc в структурах КПС K20 и K21. Генные кластеры KL20 и KL21 соответствуют установленным структурам КПС K20 и K21.

КПС *A. baumannii* REV1184 (K98) [234]

КПС был выделен методом Вестфалю. Методом ГЖХ были выявлены QuiNAc, GlcNAc и GalNAc в соотношении 0.2: 1.0: 0.5. Структура КПС была установлена с помощью одномерной и двумерной ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, включая такие двумерные эксперименты как $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и HMBC (Приложение. Таблица П15). В ^{13}C ЯМР спектре (Рисунок 100) присутствовали сигналы шести аномерных атомов углерода при δ_{C} 99.7-103.5, шести NAc групп при δ_{C} 23.4-23.8 (CH_3) и 174.8-175.9 (CO), C6 сигнал GalNAcA при δ_{C} 173.7 (CO_2H), GlcNAc, GalNAc_{4,6R}Pyr и GalNAc при δ_{C} 66.6, 66.4 и 61.8 (CH_2O) и QuiNAc при δ_{C} 17.9 (CH_3), шести N-связанных атомов углерода (C2) GlcNAc, GalNAc_{4,6R}Pyr, GalNAc, QuiNAc и GalNAcA при δ_{C} 49.4-56.1, сигналы ацетали 4,6-R-пировиноградной кислоты при δ_{C} 174.9 (C1), 100.6 (C2) и 26.3 (C3) и другие сигналы.

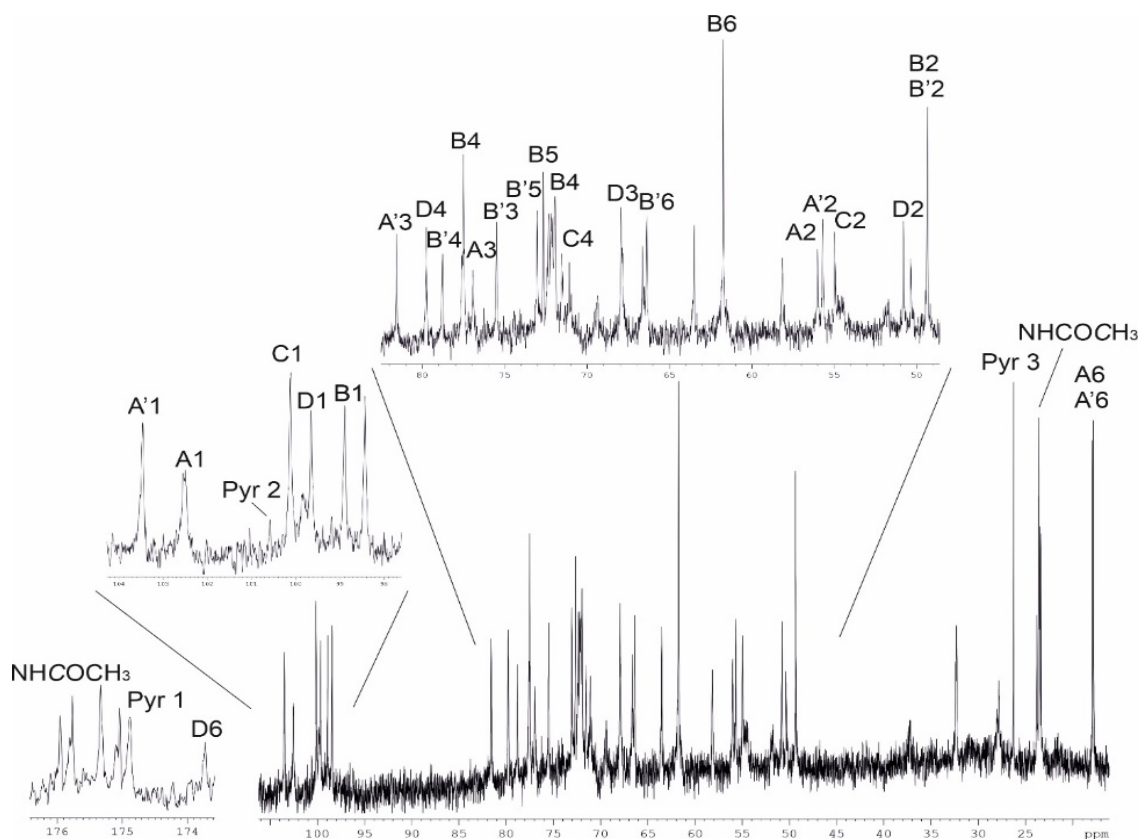


Рисунок 100. Спектр ^{13}C ЯМР КПС REV1184.

В спектре ^1H ЯМР КПС было найдено шесть аномерных сигналов при δ_{H} 4.58-5.36, H6 сигнал QuiNAc при δ_{H} 1.16 (CH_3), H3 ацетали пировиноградной кислоты при δ_{H} 1.54 (CH_3) и четырех N-ацетильных групп при δ_{H} 1.94-2.04. Было идентифицировано шесть спиновых систем: D-QuipNAc (**A**), D-QuipNAc (**A'**), D-GalpNAc (**B**), 4,6-RPyr-D-GalpNAc (**B'**), D-GlcpNAc (**C**) и D-GalpNAcA (**D**), все моносахариды находились в пиранозной форме.

^1H , ^{13}C HSQC спектр в области сильного поля содержал синглетный сигнал метильной группы при (H/C 1.54/26.3 м.д.), который коррелировал в спектре HMBC с двумя углеродами: ацетальным (100.6 м.д.) и карбоксильным (174.9 м.д.). Сравнение химических сдвигов метильных групп с данными из литературы позволило предположить, что ацетальный углерод имеет R-конфигурацию [231]. Место замещения ацетали пировиноградной кислоты было определено в спектре ^1H , ^{13}C HMBC по кросс-пику C2 пирувата с H6 остатка **B** при 100.6 / 3.92.

Дальнейшая расшифровка спектров ^1H и ^{13}C ЯМР КПС потребовала упрощения структуры. КПС подвергли гидролизу в умеренно кислых условиях и проводили последующее фракционирование с помощью гель-жидкостной хроматографии на TSK-40 с получением очищенного образца модифицированного полисахарида (МПС) без ацетали пировиноградной кислоты. Структура МПС была изучена с помощью ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, включая одномерные эксперименты ^1H и ^{13}C ЯМР и двумерные $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и HMBC.

Сигналы внутри каждой спиновой системы были отнесены с использованием гомогенного эксперимента $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY и $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY. В спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY наблюдались корреляции H1/H2–H5 для остатков **A** и **C**, H1/H2–H4 для остатков **B** и **D**. Относительно большая связевая константа $J_{1,2} \sim 7\text{--}8$ Гц указывает на β -конфигурацию остатков **A** и **B**, в то время как α -связанные остатки **C** и **D** характеризовались меньшим значением константы $J_{1,2} < 4$ Гц.

Слабополярная позиция сигналов C3 остатков **A** и **B**, C6 остатка **C** и C4 остатка **D** при δ_{C} 81.6, 77.8, 66.5 и 79.6 указывает на то, что остатки **A** и **B** являются 3-замещенными, остаток **C** 6-замещенным и остаток **D** – 4-замещенным. В спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY были обнаружены межзвеньевые корреляции между H1 **D**/ H3 **A**, H1 **A**/ H3 **B**, H1 **B**/ H6 **C** и H1 **C**/ H4 **D**, из которых следуют позиции замещения моносахаридных остатков в К-звене КПС.

Установленная структура КПС была подтверждена с помощью метода распада по Смигу, который привел к деструкции остатка $\alpha\text{-D-GlcpNAc}$ с образованием трисахарида с остатком глицерина в качестве агликона (OC) (Рисунок 101). Его структура была установлена с помощью ЯМР спектроскопии и подтверждена масс-спектрометрией высокого разрешения, где был обнаружен ион $[\text{M-H}]^-$ при m/z 698.2619 (экспериментальное, рассчитанное m/z 698.2625).

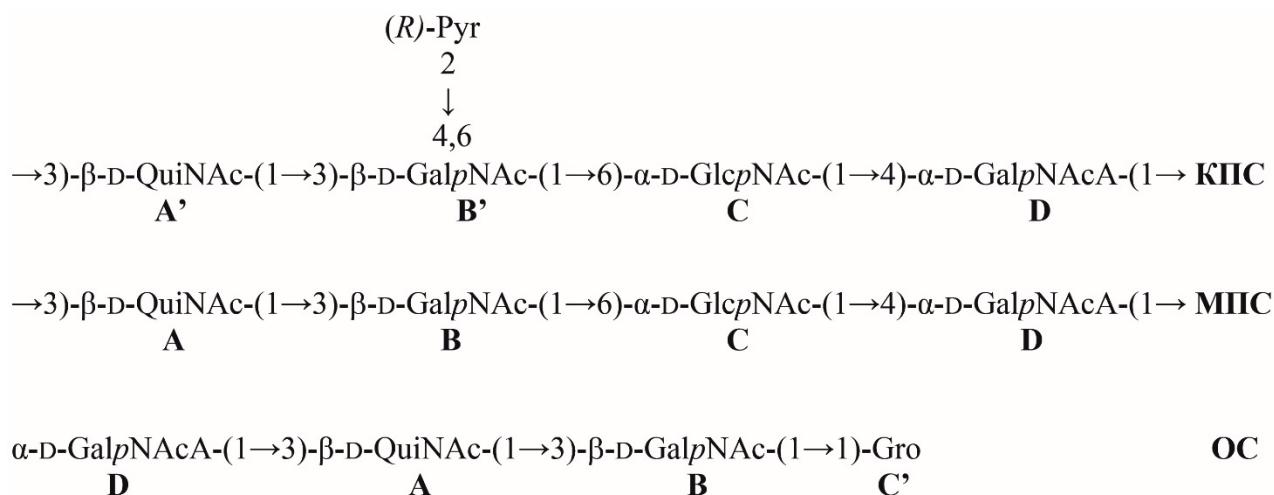


Рисунок 101. Структуры КПС K98, МПС и ОС, полученных в результате кислотного гидролиза и распада по Смиты

Генный кластер биосинтеза КПС K98

Моносахаридный состав КПС K98 очень похож на состав КПС K4 [21]. Однако общая топология повторяющегося звена КПС K98 отличается. Звено КПС K98 линейное с остатком D-GalpNAc_{4,6}-Pyr в основной цепи, тогда как этот остаток является боковым остатком в звене КПС K4 [21]. Различие в топологии, вероятно, связано с наличием разных генов *wzy* в соответствующих генных кластерах (Рисунок 102).

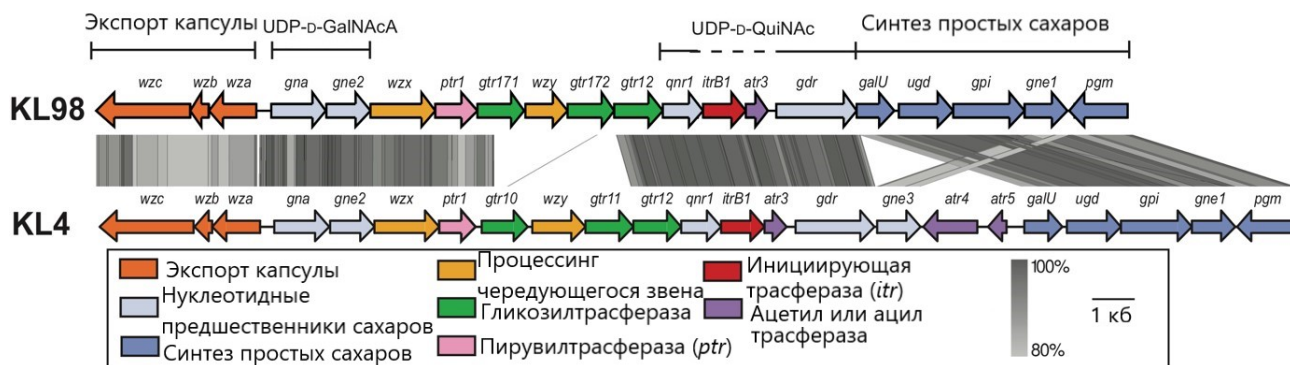


Рисунок 102. Генные кластеры биосинтеза КПС KL98 и KL4.

Поскольку генные кластеры KL4 и KL98 включали ген трансферазы *itrB1*, иницирующей связывание D-QuipNAc-1-P с UndP, D-QuipNAc был определен как первый сахар биологического звена КПС. Таким образом, полимеразы Wzy_{K98} отвечала за образование связи $\beta\text{-D-QuipNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-D-GalpNAc}$ (A' \rightarrow B') между К-звеньями в КПС K98.

Повторяющееся звено K98 включает три гликозидные связи, которые соответствуют присутствию трех генов гликозилтрансфераз в кластере генов KL98. Только одна из этих связей, α -D-GalpNAc-(1→3)-D-QuipNAc, являлась общей с КПС K4. Поскольку Gtr12_{K4} был определен ответственными за образование этой связи в КПС K4, а *gtr12* являлся единственным геном гликозилтрансферазы, общим для двух кластеров, Gtr12_{K98} был назначен этой связи также в КПС K98. Оставшиеся две связи образовывали трисахаридный сегмент β -D-GalpNAc-(1→6)- α -D-GlcpNAc-(1→4)-D-GalNAcA в K98, который заменяет α -D-GalpNAc-(1→6)- α -D-GalpNAc-(1→4)-D-GalNAcA трисахаридный сегмент в K4 (Рисунок 103)

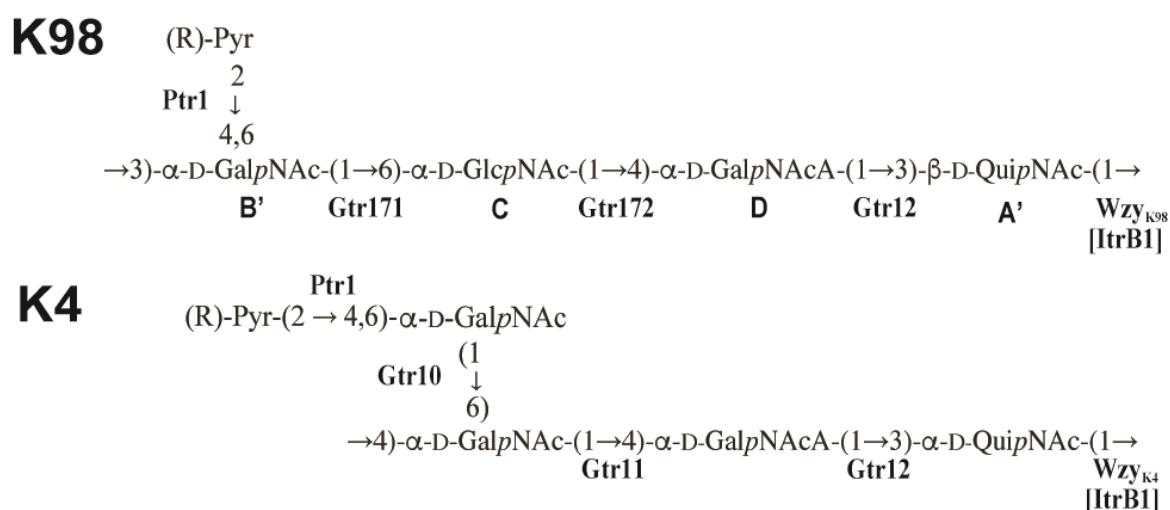


Рисунок 103. Структуры КПС K98 и K4 [21].

Различия между двумя трисахаридными сегментами соответствовали присутствию *gtr171* и *gtr172* в KL98 вместо *gtr10* и *gtr11* в KL4. Было обнаружено, что Gtr171_{K98} имел 67% идентичность аминокислотной последовательности с Gtr10_{K4}. Поскольку связь α -D-GalpNAc-(1→6)-D-GlcpNAc в K98 аналогична связи α -D-GalpNAc-(1→6)- α -D-GalpNAc, образованной Gtr10_{K4}, Gtr171_{K98} был отнесен к связи B'→C. Gtr172_{K98} имел 44% идентичность аминокислотной последовательности с Gtr49_{K24}, кодируемым KL24 из *A. baumannii* RCH51. Ранее было предсказано, что Gtr49_{K24} образует связь α -D-GlcpNAc-(1→4)-D-GalpNAc в КПС K24 [224]. K98 включает аналогичную связь α -D-GlcpNAc-(1→4)-D-

GalpNAcA и ей соответствует Gtr172_{K98}. Структура КПС K98 соответствует генному кластеру KL98.

3.3.3 Капсульные полисахариды *A. baumannii*, состоящие из гекса- и гексааминопиранозидов

КПС MAR17-1041 (K139) [235], LUN5534 (K82) [236], KZ1093 (K128) [237], MAR303 (K116) [238], AB36-1454 (K127) [239] и AB5001 (K3) [218] (Рисунок 104) были выделены из сухих бактериальных клеток, как было указано выше. КПС изучали с помощью ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии, включая двумерные эксперименты ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY, ¹H, ¹³C HSQC и HMBC.

Спектры ¹H и ¹³C ЯМР КПС LUN5534 содержали сигналы для ацетала пировиноградной кислоты (Pur) [236]. Они были идентифицированы по корреляциям C1/H3 и C2/H3 при δ 175.0/1.51 и 101.2/1.51, соответственно, в спектре ¹H, ¹³C HMBC. Для того, чтобы определить положение Pur, эта группа была удалена из полисахарида с помощью дополнительного кислотного гидрола в более жестких условиях (2% AcOH, 5 часов, 100 °C). Структура модифицированного КПС была выяснена с помощью ЯМР экспериментов (Приложение. Таблица П16-П19). В исходном образце КПС по сравнению с МПС сигналы для C4 и C6 β -Gal были смещены в область слабого поля (до δ 72.6 и 66.2, соответственно), а сигнал C5 был смещен до δ 67.2. На основании этих данных сделан вывод о том, что Pur присоединен в положение C4 и C6 остатка Galp. Химический сдвиг δ 26.3 для C3 Pur указывал на то, что ацеталь имеет (R)-конфигурацию [231].

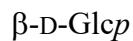
Было установлено, что в состав этих КПС входят только консервативные моносахаридные остатки: гексозы (галактоза и глюкоза) и гексоамины (галактозамин и глюкозамин) и в случае КПС AB5001 также присутствовала глюк-2,3-диамин-4-О-ацетилуроновая кислота. Структура полисахарида LUN5534 отличается линейным строением, тогда как остальные полисахариды являются разветвленными и имеют боковую цепь. Структуры КПС были установлены и приведены ниже на Рисунке 104.

AB5001 (K3)

1



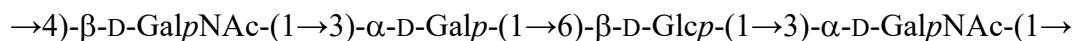
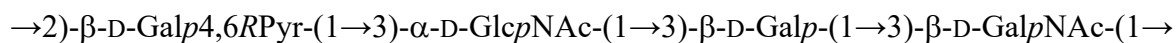
4

**MAR17-1041 (K139)**

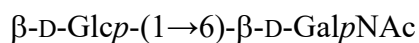
1



6

**LUH5534 (K82)**

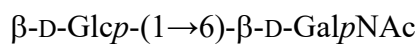
RPyr обозначает (*R*)-1-карбоксииэтилиден (ацеталь пировиноградной кислоты).

MAR303 (K116)

1



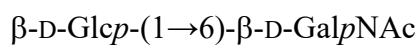
4

**AB36-1454 (K127)**

1



6

**KZ1093 (K128)**

1



6



Рисунок 104. Структуры КПС AB5001 (K3), LUH5534 (K82), MAR17-1041 (K139), MAR303 (K116), KZ1093 (K128) и AB36-1454 (K127).

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

Капсульный полисахарид является первичным рецептором для большого числа бактериофагов *A. baumannii*, имеющих хвостовые шипы – ферменты, 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*.

Для расщепления использовали очищенные препараты КПС. Полученные при расщеплении олигосахариды разделяли с помощью гель-жидкостной хроматографии и исследовали методом HR ESI MS 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 HR ESI полученных олигосахаридов показал, что они являются мономерами и/или олигомерами повторяющихся звеньев КПС. Моносахарид, находящийся на восстанавливающем 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 олигосахариды 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. Было установлено, что все олигосахариды имеют такой же моносахаридный состав, что и КПС, из которых они были получены.

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 олигосахаридов К-звена (мономеров, димеров или тримеров). В Таблице 9 показаны места разрыва полисахаридной цепи. В случае КПС *A. baumannii* KZ1098 было установлено, что фаговая деполимераза являлась де-О-ацетилазой, соответственно в результате обработки КПС фаговой деполимеразой был получен модифицированный полисахарид.

Таблица 9. Расщепление КПС деполимеразами бактериофагов и профагов.

Штамм <i>A. baumannii</i> (К тип)	Фаговая деполимераза	Разрываемая связь в КПС	Олигомеры
B05 (K9)	gp48 фага АРК09	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
AУЕ (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 АРК14	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 АРК2	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 АРК2	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 АРК116	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 фага АРК37.1	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 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 └(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 └(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 └(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 └(2←1)- β -D-GlcpA-(4←1)- α -L-Rhap-(3←1)- α -L-Rhap n=1,2,3

Расщепление КПС *A. baumannii* B05 деполимеразой gr48 фага APK09 привело к образованию олигосахаридов **1** и **2** (Рисунок 105) [240]. Основным продуктом октасахарид **1** соответствовал димеру повторяющегося звена КПС. Он состоял из четырех остатков L-FucNAc, двух остатков D-GalNAcA и двух остатков D-GlcNAc. По данным ^1H и ^{13}C ЯМР один из остатков GlcNAc находился в виде α,β -аномеров, т.е. был на восстанавливающем конце олигосахарида. Структура **1** подтверждалась масс-спектром HR ESI, в котором присутствовал пик двухзарядного иона $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ при m/z 802.3092 (рассчитанное значение m/z 802.3049). Масс-спектр второго олигосахарида **2** содержал ион $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ при m/z 1199.9654 (расчетное значение m/z 1199.9665). Олигосахарид **2** представляет собой тример повторяющегося К-звена КПС. Деполимераза gr47 фага BS54 расщепляет КПС *A. baumannii* B05 по $\beta 1\rightarrow 3$ -гликозидной связи между остатками GlcNAc и GalNAcA соседних повторяющихся звеньев. Таким образом, деполимераза gr47 является глюкозидазой и расщепляет КПС по гидролитическому механизму.

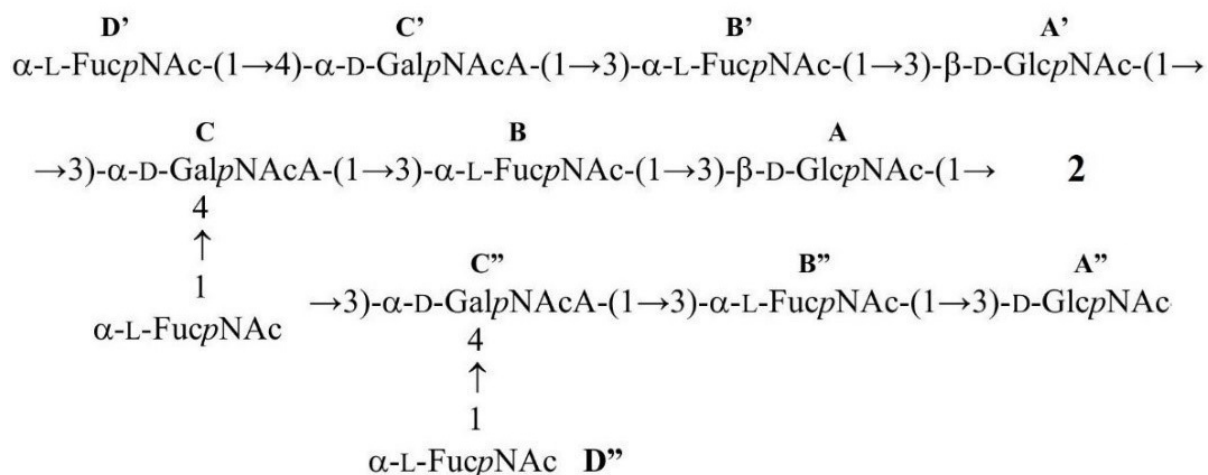
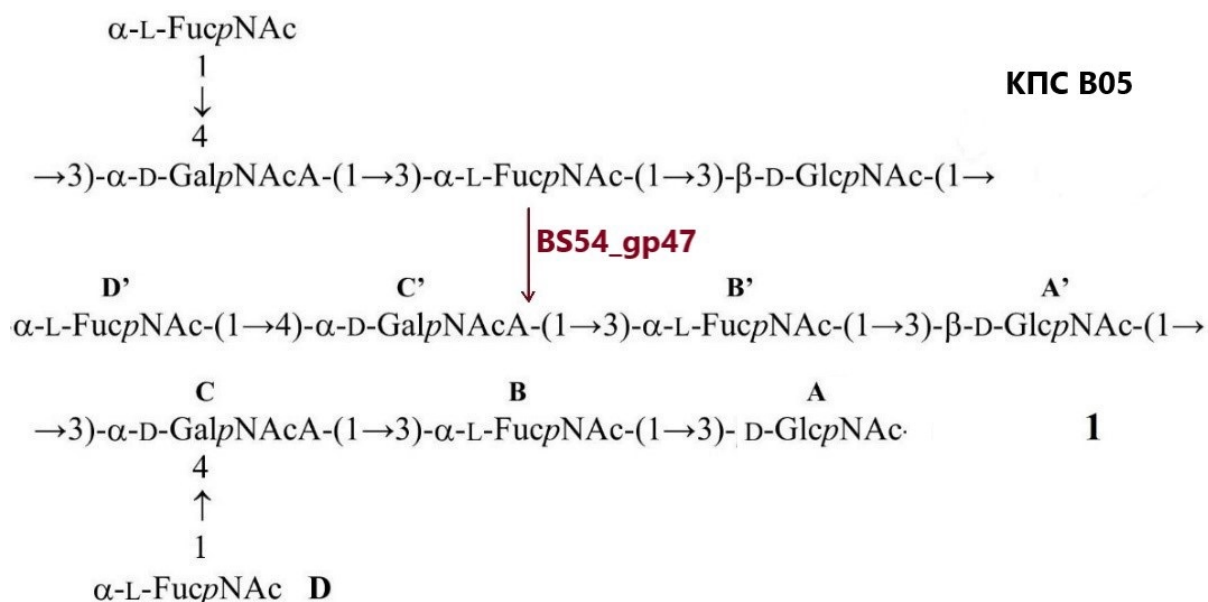


Рисунок 105. Расщепление КПС *A. baumannii* В05 деполимеразой gp47 фага BS54.

Продукты расщепления КПС *A. baumannii* В8300 деполимеразой ДрoВ8300, полученной из профага штамма *A. baumannii* В8300 фракционировали гель-проникающей хроматографией с выделением олигосахаридов **3** и **4** (Рисунок 106) [241]. Спектр ^{13}C ЯМР основного олигосахаридов **3** содержал сигналы четырех аномерных атомов связанных моносахаридов (остатки **A**, **B**, **C** и **D**) при δ 103.4-104.6 и одного моносахарида на восстанавливающем конце (остаток **E**) при δ 94.7 и 95.2 (для α - и β -аномера, **E α** и **E β** , соответственно). Олигосахарид **3** является пентасахаридом: в масс-спектре HR ESI с регистрацией положительных ионов был

^{13}C ЯМР показали наличие двух аномерных сигналов остатков α -GalNAc и α -GlcNAc (**B** и **C**) при δ 98.5 и 100.1 и двух сигналов остатка QuipNAc4NR (**A**) на восстанавливающем конце олигосахарида при δ 92.2 и 95.7 для α - и β -аномера остатка **A**. Масс-спектр HR ESI олигосахарида **5** (при R=Ac) содержал пик с m/z 667.2834 (расчетное значение для $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_{16}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 667.2891), а при (R= (S)-3-гидроксибутаноил) - пик с m/z 711.3864 (расчетное значение для $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_{17}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 711.3892). Олигосахарид **5** является трисахаридом, который соответствует К-звену КПС. Спектры ^{13}C и ^1H ЯМР олигосахарида **6** содержали сигналы схожие по значениям с таковыми для олигосахарида **5** и присутствие МПС АУЕ. Масс-спектр HR ESI олигосахарида **6** содержал пик с m/z 1315.6212 (расчетное значение при R=Ac, $\text{C}_{52}\text{H}_{82}\text{N}_8\text{O}_{31}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 1315.6211). Таким образом олигосахарид **6** является гексасахаридом - димером К-звена КПС АУЕ, а деполимераза DpoAB5075 обладает бацилозаминазидазной активностью и селективно расщепляет связь β -QuiNAc4NR-(1 \rightarrow 4)- α -GlcNAc в КПС по гидролитическому механизму.

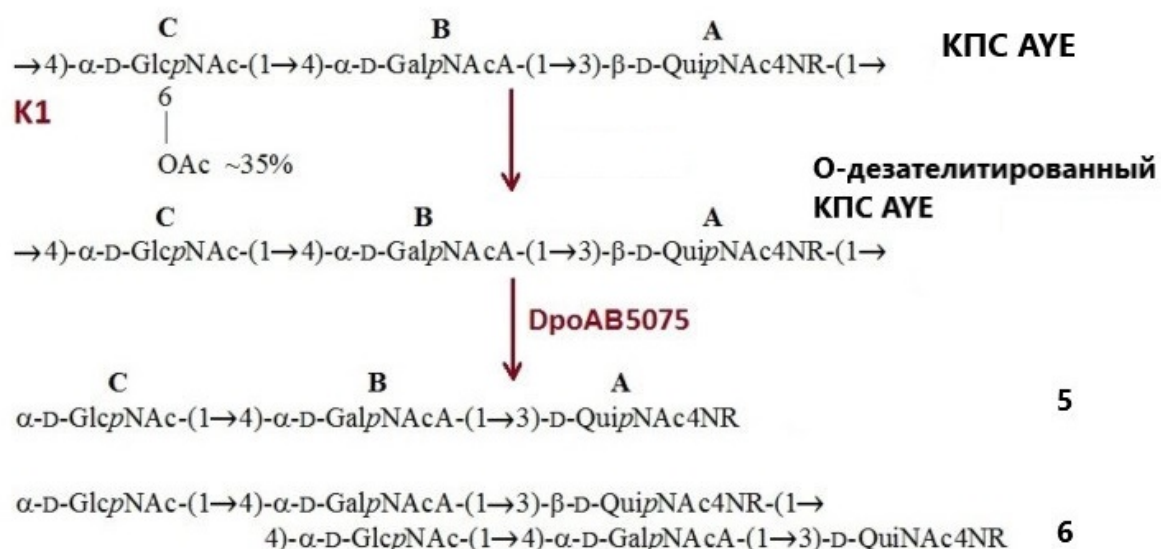


Рисунок 107. Расщепление КПС *A. baumannii* АУЕ профаговой деполимеразой DpoAB5075, полученной из штамма *A. baumannii* 5075.

В результате расщепления КПС *A. baumannii* АВ5256 деполимеразой gp49 фага АРК1 было получено два олигосахарида **7** и **8** (Рисунок 108) [240]. ^1H и ^{13}C ЯМР

исследование олигосахаридов было проведено стандартными методами. Масс-спектр HR ESI олигосахарида **7** содержал пики при m/z 911.3351 и 933.3170 (рассчитанное значение для $C_{34}H_{59}N_2O_{26}$, $[M+H]^+$, m/z 911.3351 и для $C_{34}H_{58}N_2NaO_{26}$, $[M+Na]^+$, m/z 933.3158). Масс-спектр олигосахарида **8** содержал сигналы для ионов $[M+H]^+$ при m/z 1803.6447 и 1825.6342 (рассчитанное значение для $C_{68}H_{115}N_4O_{51}$, m/z 1803.6447; для $C_{68}H_{114}N_4NaO_{51}$, $[M+Na]^+$, m/z 1825.6307). Следовательно, олигосахарид **7** является пентасахаридом, а олигосахарид **8** – декасахарид – мономером и димером К-звена, соответственно. Таким образом, деполимераза gp48 фага BS48 разрывает 1→6 связь между α -GalNAc и β -GalNAc по гидролитическому механизму и является галактозидазой.

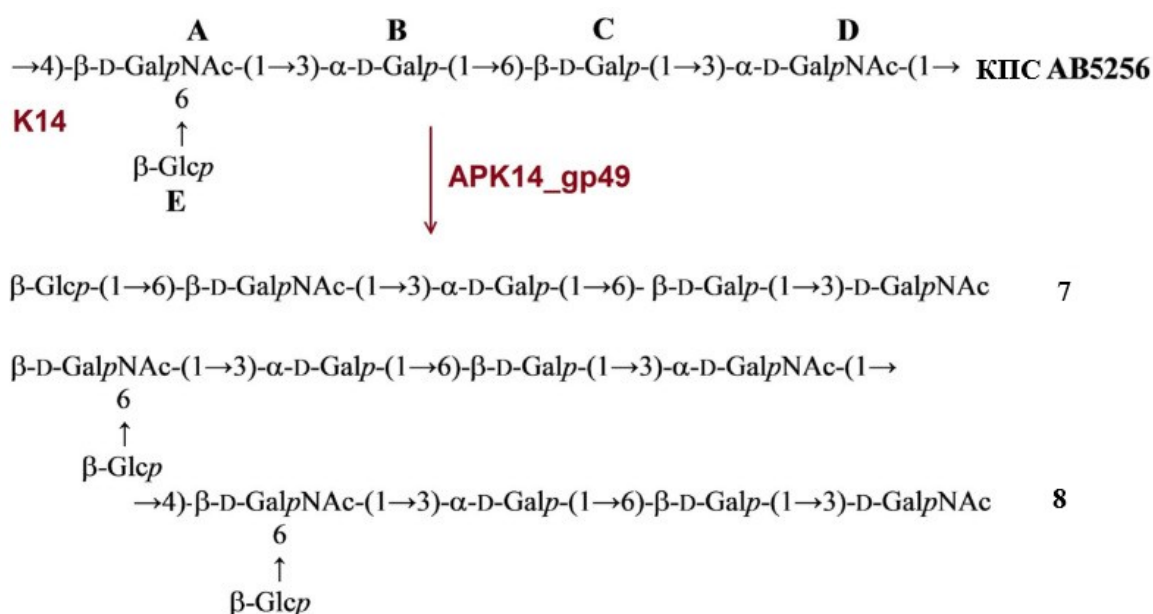


Рисунок 108. Расщепление КПС *A. baumannii* Ab5256 деполимеразой gp49 фага APK14.

КПС AC1CU и B11911 имеют одинаковую по строению основную цепь, единственное отличие заключается в 7-N-ацильном заместителе остатка **D** в боковой цепи КПС (Рисунок 109), что не должно было влиять на расщепление. Действительно, в обоих случаях расщепление деполимеразой gp43 бактериофага APK2 привело к разрыву связи между β -D-GalpNAc-(1→3)- β -D-Galp (**A**→**B**) с образованием тетрасахаридов (**9** и **11**) и октасахаридов (**10** и **12**), соответствующих мономерам и димерам К-звеньев, соответственно [242]. Эта же связь разрывалась в КПС MAR303 под действием деполимеразы gp44 бактериофага APK116, что

приводило к образованию мономера - пентасахарида **13** и димера - декасахарида **14**. Спектры ^{13}C ЯМР во всех трех случаях выявили наличие D-GalpNAc на восстанавливаемом конце при δ 92.3-92.6 и 95.7-96.5 (для α - и β -аномера). Строение олигосахаридов было подтверждено масс-спектрометрией HR ESI с анализом отрицательных и положительных ионов. Были зарегистрированы ионы $[\text{M}-\text{H}]^-$ с m/z 904.3411 (расчетное значение m/z 904.3416) для олигосахарида **9**, 17991.6796 (расчетное значение m/z 1791.67991) для **10**, 860.3156 (расчетное значение m/z 860.3154) для олигосахарида **11**, 1703.6288 (расчетное значение m/z 1703.6274) для **12**, для олигосахаридов **13** и **14** были зарегистрированы положительные ионы $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 911.3367 и 1803.6628 (расчетные значения m/z 911.3369 и 1803.6596, соответственно). Деполимеразы gr43 и gr44 являются галактозидазами и расщепляют КПС по гидролитическому механизму по связи β -GalNAc-(1 \rightarrow 3)- α/β -Gal.

Обработка КПС *A. baumannii* K26 деполимеразой *Aristophanes_gp41* не вызвала существенных изменений в спектральных данных ^1H и ^{13}C ЯМР при сравнении спектров до и после обработки деполимеразой, за исключением остатка **B** (6dTal) [243]. Необычное низкопольное положение сигнала H-4 6dTal при δ_{H} 5.38 объяснялось 4-О-ацетилированием этого остатка сахара. Обработка ферментом хвостового шипа фага вызвала сдвиг этого сигнала в сильное поле до δ_{H} 3.93 (Рисунок 110). Это смещение произошло из-за устранения дезэкранирующего эффекта О-ацетильной группы, которая, находилась в положении 4 остатка **B** в исходном КПС. В остальном спектры ЯМР ^1H и ^{13}C КПС до и после О-деацетилирования существенно не различались, следовательно, О-деацетилирование деполимеразой не вызывало других структурных изменений.

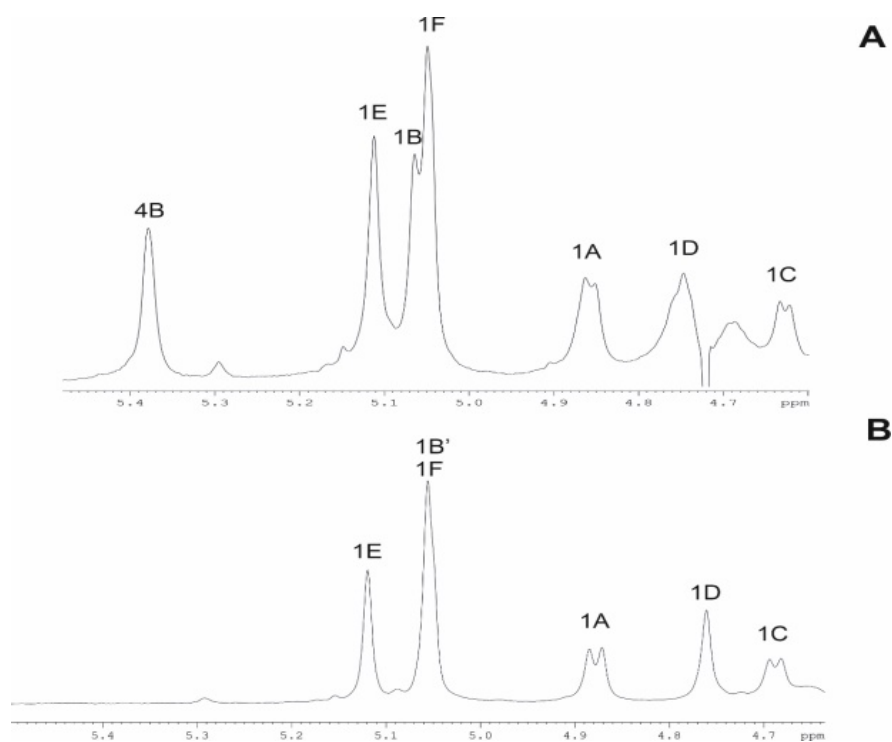


Рисунок 110. Фрагменты спектров ^1H ЯМР КПС *Acinetobacter baumannii* KZ1098: (А) до О-деацетилирования; (В) после О-деацетилирования фаговой деполимеразой.

Таким образом, *Aristophanes_gp41* представляет собой деацетилазу, которая вызывает О-деацетилирование 6dTal в повторяющемся звене K26 (Рисунок 111).

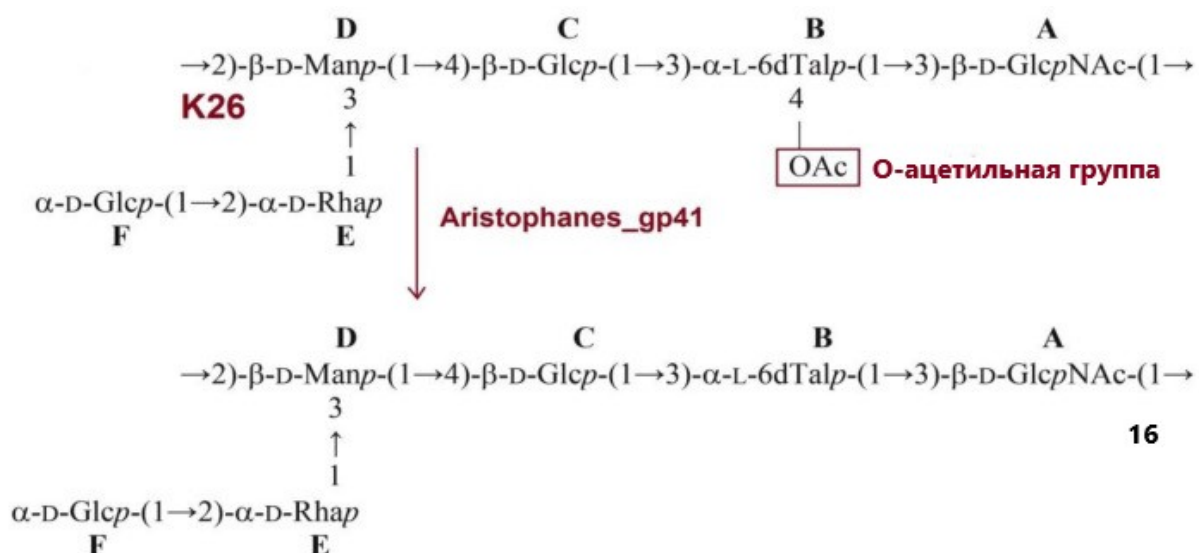


Рисунок 111. Схема деацетилирования КПС *A. baumannii* KZ1098

деполимеразой gp41 бактериофага *Aristophanes*.

Структура КПС *A. baumannii* AB5001, отнесенная к типу К3, была определена в данной работе. КПС имеет разветвленное тетрасахаридное повторяющееся звено, содержащее остатки $\beta\text{-D-GalpNAc}$ (A), $\beta\text{-D-Glc}$ (B), $\alpha\text{-D-Galp}$ (C) и $\beta\text{-D-GlcNAc3Ac}$ (D) [240]. Деполимеризация привела к образованию мономера без O-ацетатной группы (**16a**), мономера с O-ацетатной группы (**16b**) и смеси димеров с двумя O-ацетатными группами и одной O-ацетатной группой в одном или другом звене (**17**) олигосахарида (Рисунок 112). Строение олигосахаридов было подтверждено масс-спектрометрией HR ESI с анализом отрицательных ионов: ион $[\text{M-H}]^-$ с m/z 802.2727 (расчетное значение m/z 802.2735) для **16a**, 844.2831 (расчетное значение m/z 844.2841) для **16b** и двухзарядные ионы $[\text{M-2H}]^{2-}$ с m/z 793.2691, 814.2742 и 835.2795 (расчетные значения m/z 793.2682, 814.2735 и 835.2788, соответственно), которые соответствуют олигосахаридам **17**. Деполимераза gp49 обладает галактозидазной активностью и селективно расщепляет КПС по связи $\beta\text{-GalNAc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Gal}$.

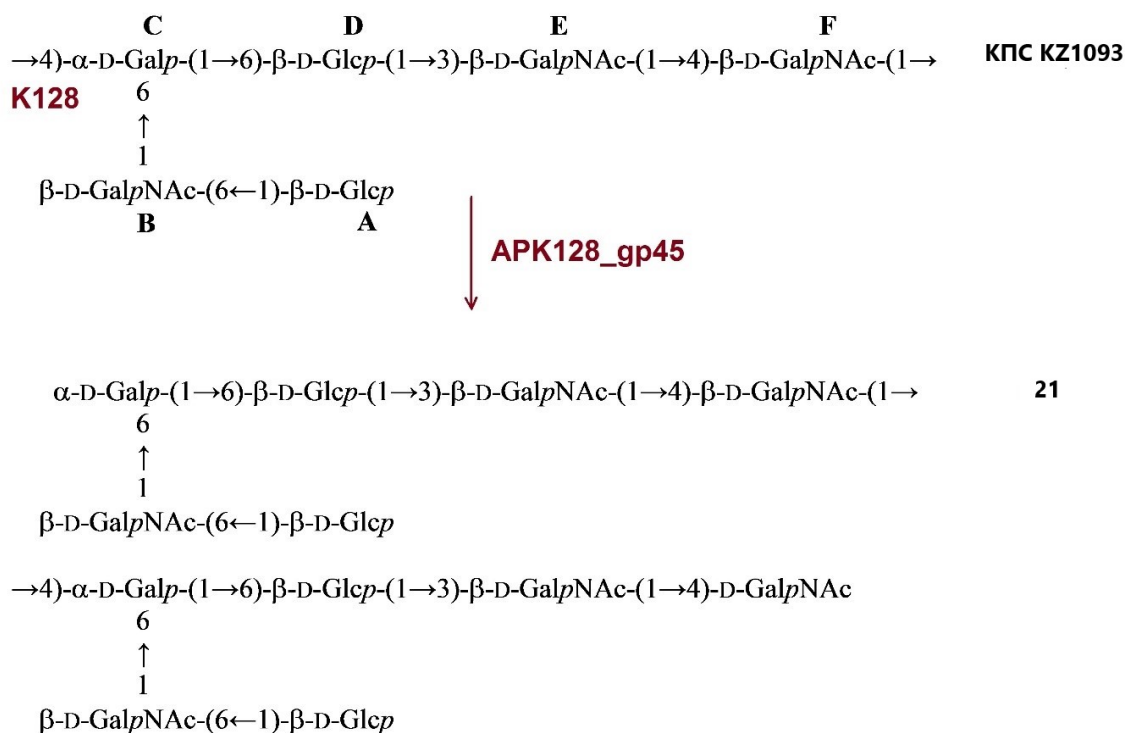


Рисунок 114. Расщепление КПС *A. baumannii* KZ-1093 хвостовой деполимеразой APK128_gp45.

КПС *A. baumannii* D4 представляет из себя трисахаридное повторяющееся звено, содержащего остатки β-D-Galp (A), β-Pse5Ac7Ac (B) и β-D-GalpNAc (C) [29]. Обработка КПС деполимеразой APK16_gp47 привела к образованию только мономера **22** К-звена с разрывом связи между остатками A и C (Рисунок 115) [240]. Строение олигосахарида **22** было подтверждено масс-спектрометрией высокого разрешения, где был зарегистрирован ион [M-H]⁻ *m/z* 862.3276 (расчетное значение *m/z* 862.3310), соответствующий мономеру К-звена полисахарида D4.

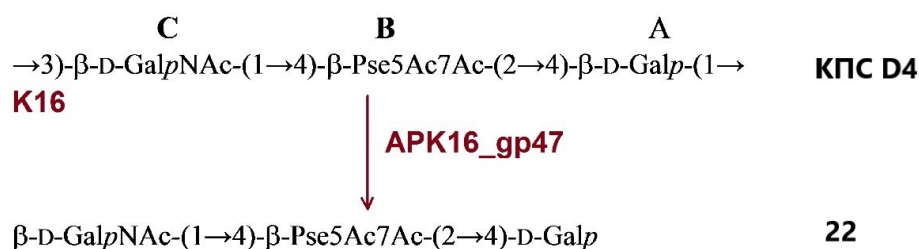


Рисунок 115. Расщепление КПС *A. baumannii* D4 фаговой деполимеразой APK16_gp47.

Структура КПС *A. baumannii* RES-2490 идентична КПС K106 *A. baumannii* 48-1789, структура которого была установлена в данной работе. КПС построен из тетрасахаридного повторяющегося звена, содержащего α -D-GlcpNAc (**A**), α -D-Glcp (**B**), β -D-GalpNAc (**D**) и α -L-6dTalp (**C**). Обработка КПС APK106_gp50 привела к образованию мономера **23** и димера **24** повторяющегося звена КПС (Рисунок 116). Строение олигосахаридов было подтверждено масс-спектрометрией HR ESI с анализом положительных ионов: ион $[M+H]^+$ с m/z 733.2870 (расчетное значение m/z 733.2873) для олигосахаридов **23** и 1447.5537 (расчетное значение m/z 1447.5568) для **24**.

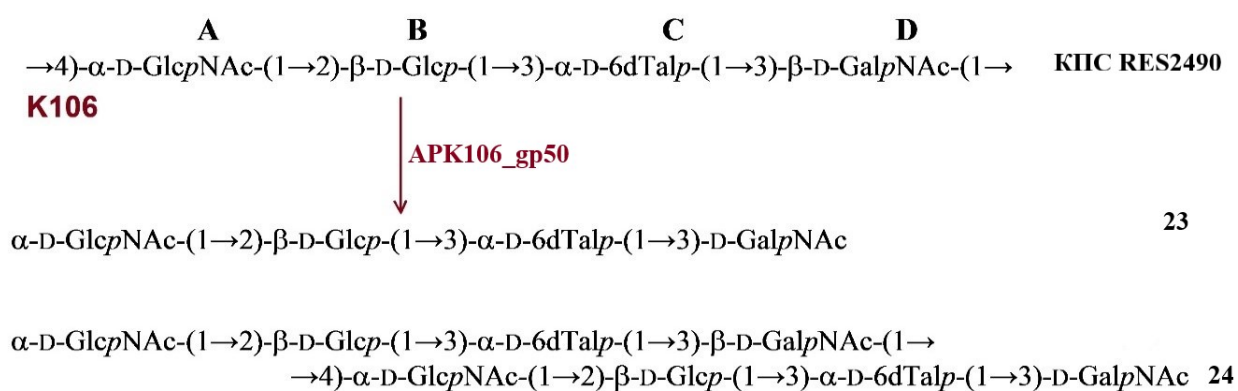
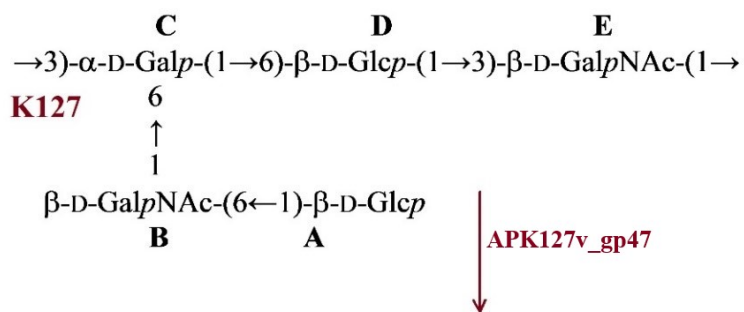


Рисунок 116. Расщепление КПС *A. baumannii* RES-2490 деполимеразой APK106_gp50.

КПС *A. baumannii* 36-1454, установленный в данной работе [239], построен из повторяющегося пентасахаридного звена, состоящего из β -D-Glcp (остатки **A** и **D**), β -D-GalpNAc (остатки **B** и **E**) и α -D-Galp (остаток **C**) [240]. Расщепление КПС деполимеразой APK127v_gp47 привело к образованию пентасахаридов **25**, соответствующего мономеру повторяющегося звена (Рисунок 117). Строение олигосахаридов **25** было подтверждено масс-спектрометрией HR ESI с анализом положительных ионов: ион $[M+Na]^+$ m/z 933.3157 (расчетное значение m/z 933.3170).



КПС 36-1454



Рисунок 117. Расщепление КПС *A. baumannii* 36-1454 деполимеразой APK127v_gp47.

КПС *A. baumannii* MAR55-66 представляет из себя гептасахаридное повторяющееся звено, построенное из $\beta\text{-D-GlcpA}$ (остаток **C**), $\beta\text{-D-GalpNAc}$ (остаток **G**) и пять остатков $\alpha\text{-L-Rha}$ (остатки **A**, **B**, **D**, **E**, **F**) [46]. Обработка КПС деполимеразой APK86_gp49 привела к образованию мономера **26**, димера **27** и тримера **28** повторяющегося К-звена (Рисунок 118) [240]. Механизм действия деполимеразы гидролитический.

С помощью фаговых деполимераз были получены олигосахариды разного состава и размера от трисахарида до генэйкосасахарида. В состав олигосахаридов входили разнообразные моносахариды, включая редко встречающиеся моносахариды, такие как Pse (КПС D4) и 6dTal (КПС RES2490). Таким образом, фаговые 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 или невозможно. В приведенном исследовании механизм действия всех деполимераз был гидролитическим. Деполимеразы gp43 фага APK2, gp44 фага APK116, gp45 фага APK128, gp 47 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 6dTal \leftarrow 4OAc, что может рассматриваться в химии углеводов как избирательное деацетилирование в нейтральных условиях (рН реакции 7.5) и может применяться в кислых полисахаридах, включающих уроновые кислоты, которые могут подвергаться β -элиминированию.

4. Экспериментальная часть

4.1. Выделение КПС

КПС выделяли из сухих бактериальных клеток водно-фенольной экстракцией по методу Вестфаля [201]: суспендированием 1 г клеток в 10 мл воды и их дальнейшей обработкой 45% раствором фенола (200 мл, 1 ч, 70°C). Реакционную смесь без разделения слоев диализовали против дистиллированной воды в течение трех дней до исчезновения запаха фенола и отделяли клеточную массу центрифугированием. Внутриклеточные компоненты денатурировали понижением рН раствора до 2 добавлением 50% раствора трихлоруксусной кислоты при 0°C. После отделения осадка центрифугированием (5000 обр./мин, 60 мин) проводили диализ против дистиллированной воды двое суток, повторно центрифугировали и супернатант лиофилизовали. Таким образом были получены сырые КПС, очищенные от клеточных стенок, белков и нуклеиновых кислот. Сырой КПС очищали методом гель-проникающей хроматографии на геле Sephadex G50 Superfine.

4.2. Гель-проникающая хроматография

Гель-проникающую хроматографию образцов КПС проводили на колонке ХК 26/70 (700 × 26 мм, слой геля 560 мм) (GE Healthcare) с гелем Sephadex G-50 Superfine (Amersham PLC, GE Healthcare) в 0.05 М пиридиний-ацетатном буфере pH 4,5. Продукты расщепления КПС фракционировали, используя колонку ХК 16/100 (1000 × 16 мм, слой геля 800 мм) (GE Healthcare), заполненную гелем Fractogel TSK HW-40 (S) (Tosoh Corporation, Токио, Япония) в 1% уксусной кислоте. В обоих случаях скорость потока составляла 0.5 мл/мин. Элюирование контролировали с помощью дифференциального рефрактометра (Knauer, Германия). Соответствующие фракции объединяли и лиофилизовали.

4.3. Определение состава капсульных полисахаридов

4.3.1. Анализ моносахаридов методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов

Аминосахара и нейтральные сахара определяли в виде ацетилированных полиолов [244] методом ГЖХ на хроматографе Maestro (Agilent 7820) («Интерлаб», Россия) с колонкой HP-5 (0.32 мм · 30 м) в градиенте температуры от 160 °С (1 мин) до 290 °С (7 °С/мин).

КПС (0.5 мг) гидролизовали 2М трифторуксусной кислотой (120 °С, 2 часа, 1 мл). Далее гидролизат отдували досуха в токе воздуха дважды с добавлением MeOH и восстанавливали раствором NaBH₄ (0.5 мл, 10 мг/мл) в 1 М NH₄OH (20 °С, 16 часов), затем подкисляли 99% AcOH (30 мкл), прибавляли 10% раствор AcOH в MeOH (0.5 мл) и растворитель удаляли в токе воздуха. Для полного удаления борной кислоты трижды добавляли MeOH (0.5 мл) с последующим удалением метилбората в токе воздуха. Полученные полиолы ацетилировали смесью уксусный ангидрид: пиридин (1:1, 100 °С, 1 ч), смесь упаривали и ацетилированные производные выделяли экстракцией в смеси вода: этилацетат. Ацетаты полиолов идентифицировали с использованием соответствующих производных, полученных из заведомых моносахаридов.

4.3.2. Определение абсолютных конфигураций компонентов

Абсолютную конфигурацию нейтральных и амино-сахаров определяли методом ГЖХ ацетилированных (*S*)-2-октил гликозидов и трифторацетилированных (*S*)-2-октиловых эфиров [202]. Для аминосахаров гидролизат растворяли в 0.4 мл NaHCO_3 при 0°C , добавляли по 20 мкл Ac_2O с промежутком в 15 минут два раза. После третьего добавления оставляли на перемешивание 30 мин). Полученную смесь разбавляли водой и нейтрализовали Amberlite (H^+). Гидролизат полисахарида (0.5 мг) обрабатывали (*S*)-2-октанолом (0.2 мл) в присутствии $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (20 мкл), смесь перемешивали 16 ч при 120°C , ацетилировали смесью уксусный ангидрид: пиридин (1:1, 100°C , 1 ч), экстрагировали смесью вода:этилацетат. Продукты анализировали методом ГЖХ в условиях, описанных выше.

3-Гидроксибутановую кислоту идентифицировали в виде трифторацетилированных (*S*)-2-октиловых эфиров в градиенте температуры от 130°C (1 мин) до 250°C ($3^\circ\text{C}/\text{мин}$). Трифторацетилирование проводили действием $(\text{CF}_3\text{CO})_2$ (0.2 мл, 4°C , 16 ч).

4.4. Модификация КПС

4.4.1. Мягкий кислотный гидролиз

Избирательную деградацию сырых КПС проводили 2% уксусной кислотой при 100°C , после центрифугирования (13000 обор./мин., 20 мин) и супернатант фракционировали хроматографией на ХК 16/100 (1000×16 мм, слой геля 800 мм) (GE Healthcare), заполненную гелем Fractogel TSK HW-40 (S) (Tosoh Corporation, Токио, Япония) в 1% уксусной кислоте, контролируя элюцию с помощью дифференциального рефрактометра (Knauer, Германия). Полисахаридную фракцию упарили и лиофилизовали.

4.4.2. О-дезацетилирование

КПС (20 мг) обрабатывали 12% NH_4OH (2 мл, 37 °С, 16 ч), аммиак удаляли в токе воздуха, реакционную смесь хроматографировали на геле Fractogel TSK40 (S), полисахаридную фракцию упарили и лиофилизовали.

4.4.3. О-дезацеталирование

Для удаление ацеталя пировиноградной кислоты, образец КПС (20 мг) обрабатывали 2% AcOH (2 мл, 100 °С, 6 ч), затем продукт выделяли с помощью гель-проникающей хроматографии на геле Fractogel TSK40, полисахаридную фракцию упаривали и лиофилизовали.

4.4.4. Распад по Смиту

Раствор полисахарида (20 мг) в водном 0.1 М растворе NaIO_4 (0.5 мл) выдерживали в герметично закрытом контейнере 48 ч в темноте при 20 °С [203]. Далее реакционную смесь восстанавливали NaBH_4 (30 мг, 16 ч, 24 °С), избыток NaBH_4 нейтрализовали 100% AcOH до $\text{pH}=5$, обессоливали с помощью гель-хроматографии на колонке с гелем TSK HW-40 в 1% AcOH , модифицированный полисахарид гидролизовали 2% AcOH (100°С, 2 ч) и выделяли продукты хроматографией на колонке с гелем TSK HW-40.

4.4.5. Сольволиз

Образец КПС гидролизовали $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (99.5%, 1 мл) при 40°С в течение 3 часов, добавляли 2-метил-1-пропанол (0.2 мл), после упаривания фракционировали продукты реакции с помощью гель-жидкостной хроматографии на геле Sephadex G-25 (125×1.2 см).

4.5. Расщепление КПС рекомбинантными деполимеразы

Рекомбинантные деполимеразы специфических бактериофагов и деполимеразы, кодируемые профагами *A. baumannii*, были получены коллабораторами М.М. Шнейдером и А.В. Поповой в рамках совместного исследовательского проекта.

К раствору очищенного образца КПС в 20 мМ буфере Tris-HCl pH 7,5

добавляли соответствующую фаговую деполимеразу при соотношении белок/КПС 1/100 (вес./вес.). Реакционную смесь выдерживали 16 ч при 37 °С, продукты выделяли гель-проникающей хроматографией на геле Fractogel TSK HW-40 (S). Наряду с олигосахаридными продуктами в каждом случае было получено небольшое количество нерасщепленного КПС.

4.6. Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением

Анализ ИЭР МС проводили на масс-спектрометре высокого разрешения micrOTOF II (Bruker Daltonics). Диапазон сканирования масс m/z 50–3000, калибровка использовалась как внешняя, так и внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, Fluka). Образцы (~50 нг/мкл) растворяли в смеси воды и ацетонитрила (1:1 по объему) и вводили шприцем в распылитель со скоростью потока 3 мкл/мин, в качестве газа-распылителя использовали азот (4 л/мин). Разность потенциалов на капиллярном входе составляла 4500 В или –3000 В при регистрации анионов и катионов, соответственно, выходная разность потенциалов 150 В, температура интерфейса 180 °С.

4.7. Спектроскопия ЯМР

Образцы КПС и олигосахаридов лиофилизировали двукратно из 99.9%-ной D₂O для замены подвижных протонов на атомы дейтерия, затем растворяли в 99.9%-ной D₂O. Для микроколичеств образцов (до 5 мг) использовали ампулы Shigemi. Спектры снимали на спектрометрах Bruker DRX500 и Bruker Avance II 600, сбор и обработку данных проводили с помощью программы Bruker TopSpin 2.1. В качестве внутреннего стандарта использовали натрий-3-триметилсилилпропаноат-2,2,3,3-d₄ (¹H 0 м. д., ¹³C –1.6 м. д.), температуру (25-50 °С) выбирали с учетом положения остаточного сигнала растворителя (HDO). В экспериментах с детектированием сигналов протонов остаточный сигнал HDO подавляли предоблучением в течение 1 секунды. Для детектирования NH-протонов съемку спектров ЯМР проводили в смеси H₂O: D₂O (9:1 по объему).

В экспериментах по двумерной спектроскопии ЯМР использовали следующие параметры:

COSY, разрешение 512 · 1024, заполнение нулями до 1024 по оси t1, 8 проходов на одну строку, спектральное окно 3501 Гц, релаксационная задержка 1 сек.

TOCSY, разрешение 512 · 1024, заполнение нулями до 1024 по оси t1, 16 проходов на одну строку, длительность MLEV17 спин-лока 60 мсек, релаксационная задержка 1 сек.

ROESY, разрешение 512 · 1024, заполнение нулями до 1024 по оси t1, 16 проходов на одну строку, спектральное окно 3501 Гц, время смешивания 200 мсек, релаксационная задержка 1 сек.

¹H, ¹³C HSQC, разрешение 256 · 1024, заполнение нулями до 512 по оси t1, 40 проходов на одну строку, спектральное окно 3501 Гц по оси t1 и 11875 Гц по оси t2, релаксационная задержка 1 сек.

¹H, ¹³C HMBSC, разрешение 512 · 1024, заполнение нулями до 1024 по оси t1, 80 проходов на одну строку, спектральное окно 1873.0 Гц по оси t1 и 17530 Гц по оси t2, релаксационная задержка 1.5 сек, задержка для развития многосвязевых корреляций 60 мсек (оптимизирована для КССВ 8 Гц). Аподизацию осуществляли по обеим осям t1 и t2 с помощью синусоидальной функции в эксперименте COSY или квадратичной синусоидальной функции в остальных экспериментах.

4.8. Биоинформатический анализ

Последовательность К-локусов для штаммов *A. baumannii* получена из базы данных GenBank [245]. Функции белков предсказывали с помощью биоинформатического инструмента BLASTp [246].

Выводы

1. Установлено строение 25 новых типов капсульных полисахаридов *Acinetobacter baumannii*. 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* было обнаружено пять изомеров 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновой кислоты (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, были впервые обнаружены и идентифицированы в природе в настоящей работе в составе КПС *A. baumannii* SGH0703 и RES546, соответственно.
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. Все они обладали гликозидазной активностью и расщепляли капсульные полисахариды по гидролитическому механизму.
6. Были выделены олигосахариды разного размера, включающие от 3 до 21 моносахаридных остатков. Некоторые олигосахариды включали такие редкие остатки как нонулозоновые кислоты, 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, DOI: 10.1134/S0006297917040101.
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, DOI: 10.1016/j.carres.2017.10.005.
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. DOI: 10.1099/mic.0.000430.
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-acetylviosamine. *Microbiology*, 2018, 164 (2), 217-220. DOI: 10.1099/mic.0.000598.
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. DOI: 10.1134/S0006297918070064.
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. DOI: 10.1093/glycob/cwy074.
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. DOI: 10.1016/j.carres.2019.107745.

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. DOI: 10.1371/journal.pone.0218461.

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. DOI: 10.1016/j.carres.2019.04.008.

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. DOI: 10.1016/j.carres.2019.107814.

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. DOI: 10.1016/j.carres.2019.107774.

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. DOI: 10.1128/JVI.01714-20.

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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.10.178.

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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.073.

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. DOI: 10.3390/ijms22115641.

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. DOI: 10.3390/v13091688.

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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.062.

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-acetylpsuedaminic acid linked by a KpsS3 glycosyltransferase. *Int J Biol Macromol.* 2022, 218, 310-316. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.135.

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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.07.136.

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. DOI: 10.1128/spectrum.01503-21.

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. DOI: 10.1134/S0006297923020049.

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. DOI: 10.1128/spectrum.03631-22.

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. DOI: 10.3390/ijms24109100.

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. DOI: 10.1128/spectrum.03025-23.

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, DOI:10.1016/j.carres.2022.108726.

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.

Список литературы

1. Pourhajibagher M., Hashemi F.B., Pourakbari B., Aziemzadeh M., Bahador A. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* to imipenem in Iran: a systematic review and meta-analysis // *Open Microbiol J.* 2016, **10**, 32–42.
2. Qi L, Li H, Zhang C, et al. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii* // *Front Microbio.* 2016, **7**, 483.
3. Miller, Wolfgang et al. Bacteriophage T4 Genome. // *Microbiology and molecular biology reviews.* 2003, **67**, 86-156.
4. Beijerinck M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien // *Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterda*, 1911, **19**, 1092–1103.
5. Baumann P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water // *J Bacteriol*, 1987, **96**, 1, 39–42.
6. Bouvet P.J., Grimont P.A. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter* // *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*, 1987, **138**, 5, 569–578.
7. Nemeč A, Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Vrestiakova E, Jezek P, Sedo O. Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* sp. nov. // *Microbiol.*, 2016, **66**(4), 1673–1685.
8. NamesforLife, LLC - A semantic services company [Electronic resource]. URL: <https://www.namesforlife.com>.
9. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology // *Int J Antimicrob Agents*, 2015, **45**, 568–585.
10. Mulin B, Talon D, Viel JF, Vincent C, Leprat R, Thouverez M, et al. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii* // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 1995, **14**, 569–576.
11. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* // *Antimicrob Agents Chemother.*, 2007, **51**, 3471–3484.

12. Wang Y.F., Dowzicky M.J.. In vitro activity of tigecycline and comparators on *Acinetobacter* spp. isolates collected from patients with bacteremia and MIC change during the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial // *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 2010, **68**, 73–79.
13. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK, Vartzili S, Nikita D, Michalopoulos A. Pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections: characteristics and outcome in a series of 28 patients // *Int J Antimicrob Agents*, 2008 **32**, 450–454.
14. Valencia R., Arroyo L.A., Conde M., Aldana J.M., Torres M.J., Fernandez-Cuenca F., et al. The Importance of *Acinetobacter* Species in the Hospital Environment // *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 2009, **30**, 257–263.
15. Rangel K., Chagas T.P.G., De-Simone S.G.. *Acinetobacter baumannii* Infections in Times of COVID-19 Pandemic. // *Pathogens*, 2021, **10**(8),1006.
16. Kon H., Schwartz D., Temkin E., Carmeli Y., Lellouche J.. Rapid identification of capsulated *Acinetobacter baumannii* using a density-dependent gradient test. // *BMC Microbiol.* 2020, **20**(1), 285.
17. Knirel Y.A., Valvano M.A. Bacterial polysaccharide structure and biosynthesis // *Encyclopedia of Biophysics (Roberts G.C.K., ed.). Heidelberg-New York-Dordrecht-London: Springer.* 2013,162–168.
18. Roshini J., Patro L.P.P., Sundaresan S. and Rathinavelan T.. Structural diversity among *Acinetobacter baumannii* K-antigens and its implication in the in silico serotyping // *Front. Microbiol.* 2023, **14**, 1191542.
19. Russo T. A., Beanan J. M., Olson R., MacDonald U., Cox A. D., Michael F. S., Campagnari A. A..The K1 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* is a potential therapeutic target via passive immunization // *Infection and immunity.* 2013, **81**(3), 915-922.
20. Kenyon J. J., Marzaioli A. M., Hall R. M., De Castro C. Structure of the K2 capsule associated with the KL2 gene cluster of *Acinetobacter baumannii*. // *Glycobiology.*2014, **24**(6), 554-563.

21. Kenyon J. J., Speciale I., Hall R. M., De Castro C.. Structure of repeating unit of the capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* D78 and assignment of the K4 gene cluster. // *Carbohydrate research*, 2016, 434, 12-17.
22. Arbatsky N. P., Kenyon J. J., Shashkov A. S., Shneider M. M., Popova A. V., Kalinchuk N. A., Knirel Y. A.. The K5 capsular polysaccharide of the bacterium *Acinetobacter baumannii* SDF with the same K unit containing Leg5Ac7Ac as the K7 capsular polysaccharide but a different linkage between the K units. // *Russian Chemical Bulletin*. 2019, **68**(1), 163-167.
23. Kenyon J. J., Marzaioli A. M., Hall R. M., De Castro C.. Structure of the K6 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* isolate RBH4. // *Carbohydrate research*. 2015, **409**, 30-35.
24. Sofya N. S., Kenyon J. J., Jia T., Popova A. V., Shneider M. M., Kasimova A. A., Knirel Y. A.. The K90 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* LUH5553 contains di-N-acetylpseudaminic acid and is structurally related to the K7 polysaccharide from *A. baumannii* LUH5533. // *Carbohydrate research*. 2019, **479**, 1-5.
25. Kenyon J. J., Shashkov A. S., Sofya N. S., Shneider M. M., Liu B., Popova A. V., Hall R. M.. *Acinetobacter baumannii* K11 and K83 capsular polysaccharides have the same 6-deoxy-L-talose-containing pentasaccharide K units but different linkages between the K units. // *International journal of biological macromolecules*. 2017, **103**, 648-655.
26. Kenyon J. J., Marzaioli A. M., Hall R. M., De Castro C.. Structure of the K12 capsule containing 5, 7-di-N-acetylacinetaminic acid from *Acinetobacter baumannii* isolate D36. // *Glycobiology*. 2015, **25**(8), 881-887.
27. Kenyon J. J., Hall R. M., De Castro C.. Structural determination of the K14 capsular polysaccharide from an ST25 *Acinetobacter baumannii* isolate, D46. // *Carbohydrate research*. 2015, **417**, 52-56.
28. Shashkov A. S., Liu B., Kenyon J. J., Popova A. V., Shneider M. M., Sofya N. S., Knirel Y. A.. Structures of the K35 and K15 capsular polysaccharides of *Acinetobacter baumannii* LUH5535 and LUH5554 containing amino and diamino uronic acids. // *Carbohydrate research*. 2017, **448**, 28-34.

29. Kenyon J. J., Arbatsky N. P., Sweeney E. L., Shashkov A. S., Shneider M. M., Popova A. V., Knirel Y. A.. Production of the K16 capsular polysaccharide by *Acinetobacter baumannii* ST25 isolate D4 involves a novel glycosyltransferase encoded in the KL16 gene cluster. // *International journal of biological macromolecules*. 2019, **128**, 101-106.
30. Kenyon J. J., Shashkov A. S., Shneider M. M., Popova A. V., Knirel Y. A., Hall R. M.. K17 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* isolate G7 contains an amide of 2-acetamido-2-deoxy-D-galacturonic acid with D-alanine. // *International journal of biological macromolecules*. 2020, **144**, 857-862.
31. Kenyon J. J., Shneider M. M., Senchenkova S. N., Shashkov A. S., Siniagina M. N., Malanin S. Y., Knirel Y. A.. K19 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* is produced via a Wzy polymerase encoded in a small genomic island rather than the KL19 capsule gene cluster. // *Microbiology*. 2016, **162**(8), 1479-1489.
32. Talyansky Y., Nielsen T. B., Yan J., Carlino-Macdonald U., Di Venanzio G., Chakravorty S., Spellberg B.. Capsule carbohydrate structure determines virulence in *Acinetobacter baumannii*. // *PLoS pathogens*. 2021, **17**(2), e1009291.
33. Sofya N. S., Shashkov A. S., Popova A. V., Shneider M. M., Arbatsky N. P., Miroshnikov K. A., Knirel Y. A.. Structure elucidation of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* AB5075 having the KL25 capsule biosynthesis locus. // *Carbohydrate research*. 2015, **408**, 8-11.
34. Shashkov A. S., Kenyon J. J., Senchenkova S. N., Shneider M. M., Popova A. V., Arbatsky N. P., Knirel Y. A.. *Acinetobacter baumannii* K27 and K44 capsular polysaccharides have the same K unit but different structures due to the presence of distinct wzy genes in otherwise closely related K gene clusters. // *Glycobiology*. 2016, **26**(5), 501-508.
35. Shashkov A. S., Kenyon J. J., Arbatsky N. P., Shneider M. M., Popova A. V., Miroshnikov K. A., Knirel Y. A.. Structures of three different neutral polysaccharides of *Acinetobacter baumannii*, NIPH190, NIPH201, and NIPH615, assigned to K30, K45, and K48 capsule types, respectively, based on capsule biosynthesis gene clusters. // *Carbohydrate research*. 2015, **417**, 81-88.

36. Cahill S. M., Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Shneider M. M., Popova A. V., Hall R. M., Knirel Y. A.. Elucidation of the K32 Capsular Polysaccharide Structure and Characterization of the KL32 Gene Cluster of *Acinetobacter baumannii* LUH5549. // *Biochemistry (Moscow)*. 2020, **85**(2), 241-247.
37. Arbatsky N. P., Shneider M. M., Shashkov A. S., Popova A. V., Miroshnikov K. A., Volozhantsev N. V., Knirel Y. A.. Structure of the N-acetylpseudaminic acid-containing capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* NIPH67. // *Russian Chemical Bulletin*. 2016, **65**(2), 588-591.
38. Arbatsky N.P., Shneider M.M, Kenyon J.J., Shashkov A.S., Popova A.V., Miroshnikov K.A., Volozhantsev N.V., Knirel Y.A.. Structure of the neutral capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* NIPH146 that carries the KL37 capsule gene cluster. // *Carbohydr Res*. 2015, **413**, 12-5.
39. Kenyon J. J., Shneider M. M., Senchenkova S. N., Shashkov A. S., Siniagina M. N., Malanin S. Y., Knirel Y. A.. K19 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* is produced via a Wzy polymerase encoded in a small genomic island rather than the KL19 capsule gene cluster. // *Microbiology*. 2016, **162**(8), 1479-1489.
40. Sofya N. S., Popova A. V., Shashkov A. S., Shneider M. M., Mei Z., Arbatsky, N. P., Knirel Y. A.. Structure of a new pseudaminic acid-containing capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* LUH5550 having the KL42 capsule biosynthesis locus. // *Carbohydrate research*. 2015, **407**, 154-157.
41. Shashkov A. S., Kenyon J. J., Arbatsky N. P., Shneider M. M., Popova A. V., Miroshnikov K. A., Knirel Y. A.. Related structures of neutral capsular polysaccharides of *Acinetobacter baumannii* isolates that carry related capsule gene clusters KL43, KL47, and KL88. // *Carbohydrate research*. 2016, **435**, 173-179.
42. Deng Q, Zhang J, Zhang M, Liu Z, Zhong Y, Liu S, Cui R, Shi Y, Zeng H, Yang X, Lin C, Luo Y, Chen H, Wu W, Wu J, Zhang T, Lu Y, Liu X, Zou Q, Huang W. Rapid Identification of KL49 *Acinetobacter baumannii* Associated with Clinical Mortality. // *Infect Drug Resist*. 2020, **13**, 4125-4132.
43. Shashkov A. S., Kenyon J. J., Arbatsky N. P., Shneider M. M., Popova A. V., Knirel Y. A., Hall R. M.. Genetics of biosynthesis and structure of the K53 capsular

polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* D23 made up of a disaccharide K unit. // *Microbiology*. 2018, **164**(10), 1289-1292.

44. Kenyon J. J., Arbatsky N. P., Sweeney E. L., Zhang Y., Senchenkova S. N., Popova A. V., Knirel Y. A.. Involvement of a multifunctional rhamnosyltransferase in the synthesis of three related *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharides, K55, K74 and K85. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, **166**, 1230-1237.

45. Arbatsky N.P., Kasimova A.A., Shashkov A.S., Shneider M.M., Popova A.V., Perepelov A.V., Hall R.M., Kenyon J.J., Knirel Y.A.. Revised structure of the polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* LUH5551 assigned as the K63 type capsular polysaccharide. // *Carbohydr Res*. 2024, **535**, 109020.

46. Arbatsky N., Shashkov A., Chizhov A., Timoshina O., Shneider M., Knirel Y.. Structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* MAR 55–66. // *Russian Chemical Bulletin*. 2021, **70**, 592-599.

47. Arbatsky N.P., Popova A.V., Shneider M.M., Shashkov A.S., Hall R.M., Kenyon J.J., Knirel Y.A.. Structure of the K87 capsular polysaccharide and KL87 gene cluster of *Acinetobacter baumannii* LUH5547 reveals a heptasaccharide repeating unit. // *Carbohydrate research*. 2021, **509**, 108439.

48. Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Shneider M. M., Popova A. V., Kasimova A. A., Miroshnikov K. A., Knirel Y. A., Hall R. M., Kenyon J. J.. The K89 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* LUH5552 consists of a pentameric repeat-unit that includes a 3-acetamido-3,6-dideoxy-d-galactose residue. // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, **217**, 515-521.

49. Shashkov A. S., Shneider M. M., Sof'ya N. S., Popova A. V., Nikitina A. S., Babenko V. V., Knirel Y. A.. Structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* 1053 having the KL91 capsule biosynthesis gene locus. // *Carbohydrate research*. 2015, **404**, 79-82.

50. Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Shneider M.M., Popova A.V., Balaji V., Biswas I., Knirel Y.A., Kenyon J.J.. A novel ItrA4 d-galactosyl 1-phosphate transferase is predicted to initiate synthesis of an amino sugar-lacking K92 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* B8300. // *Research in microbiology*. 2021, **172**, 103815.

51. Whitfield C., Trent S. Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides // *Annu Rev Biochem.* 2014, **83**, 99–128.
52. Moffatt J, Harper M, Harrison P, Hale J, Vinogradov E, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of the lipopolysaccharide production. // *Antimicrob Agents.* 2010, **54**, 4971–4977.
53. McQueary C, Kirkup B, Si Y, Barlow M, Actis L, et al.. Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. // *J Microbiol.* 2012, **50**, 434–443.
54. Zhang G., Meredith T., Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. // *Curr Opin Microbiol*, 2013, **16**, 779–785.
55. Heinrichs D., Yethon J., Whitfield C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. // *Mol Microbiol.* 1998, **30**, 221–232.
56. Vinogradov E., Duus J., Brade H., Holst O.. The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606. // *Eur J Biochem.* 2002, **269**, 422–430.
57. Fregolino E., Fugazza G., Galano E., Gargiulo V., Landini P., et al. Complete lipooligosaccharide structure of the clinical isolate *Acinetobacter baumannii*, strain SMAL. // *Eur J Org Chem.* 2010, 1345–1352. doi: 10.1002/ ejoc.200901396.
58. Vinogradov E.V., Petersen B.O., Thomas-Oates J.E., Duus J., Brade H., Holst O. Characterization of a novel branched tetrasaccharide of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulopyranosonic acid. The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii* strain nctc 10303 (atcc 17904). // *J Biol Chem.* 1998, **273**(43), 28122-31.
59. Herrera C.M., Voss B.J., Trent M.S.. Homeoviscous Adaptation of the *Acinetobacter baumannii* Outer Membrane: Alteration of Lipooligosaccharide Structure during Cold Stress. // *mBio.* 2021, **12**(4), e0129521.
60. Chinemerem N. D., Ugwu M. C., Oliseloke A. C., Al-Ouqaili M.T.S., Chinedu I. J., Victor C. U., Saki M.. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. // *J Clin Lab Anal.* 2022, **36**(9), e24655.

61. Naureen Z., Dautaj A., Anpilogov K., Camilleri G., Dhuli K., Tanzi B., Maltese P.E., Cristofoli F., De Antoni L., Beccari T., Dundar M., Bertelli M.. Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. // *Acta Biomed.* 2020, **91**(13-S), e2020024.
62. Mallick, B., Mondal, P., Dutta, M. Morphological, biological, and genomic characterization of a newly isolated lytic phage Sfk20 infecting *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Shigella dysenteriae*1. // *Sci Rep.* 2021, **11**, 19313
63. Dublanchet A., Fruciano E. A short history of phage therapy // *Médecine et Maladies Infectieuses.* 2008, **38**, 8, 415-420.
64. Oliveira H., Sillankorva S., Merabishvili M., Kluskens L. D., Azeredo J.. Unexploited opportunities for phage therapy // *Front. Pharmacol.* 2015, **6**, 180.
65. Sarhan W. A., Azzazy H. M. Phage approved in food, why not as a therapeutic? // *Expert Rev. Anti. Infect.* 2015, **13**, 91–101.
66. Varga M. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone // *FEMS Microbiol Lett.* 2012, **332**, 2, 146-152.
67. Groman N.B. Genetic factors in *Corynebacterium diphtheriae* conversion // *J Bacteriol.* 1995, **70**, 6, 637-640.
68. Canchaya C. The impact of prophages on bacterial chromosomes // *Mol Microbiol.* 2004, **53**, 1, 9-18.
69. Ganeshan, Hosseinidoust. Phage Therapy with a focus on the Human Microbiota. // *Antibiotics.* 2019, **8**, 131.
70. M. I. Nicholas et al. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction // *Nature.* 2016, **533**, 346-352.
71. Z. Erez, et al. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. // *Nature.* 2017, **541**, 488-493.
72. Fokine A., Rossmann M.G.. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. // *Bacteriophage.* 2014, **4**(1), e28281.

73. Hendrix R.W., Smith M.C., Burns R.N., Ford M.E., Hatfull G.F. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, **96**(5), 2192-2207.
74. Lindberg A.A.. Bacteriophage receptors. // *Annu Rev Microbiol*. 1973, **27**, 205-41.
75. Летаров А.В., Куликов Е.Е.. Адсорбция бактериофагов на клетках бактерий. // *Успехи биологической химии*. 2017, **57**, 153-208.
76. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. // *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003, **67**(4), 593-656.
77. Leiman P.G., Molineux I.J.. Evolution of a new enzyme activity from the same motif fold. // *Mol Microbiol*. 2008, **69**(2), 287-90.
78. Weigele P.R., Scanlon E., King J.. Homotrimeric, beta-stranded viral adhesins and tail proteins. // *J Bacteriol*. 2003, **185**(14), 4022-30.
79. Majkowska-Skrobek G., Łatka A., Berisio R., Maciejewska B., Squeglia F., Romano M.. Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy. // *Viruses*. 2016, **8**(12), E324.
80. Stummeyer K., Schwarzer D., Claus H., Vogel U., Gerardy-Schahn R., Mühlenhoff M. Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. // *Mol Microbiol*. 2006, **60**(5), 1123-35.
81. Yan J.J., Zheng P.X., Wang M.C., Tsai S.H., Wang L.R., Wu J.J.. Allocation of *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates into four distinct groups by ompK36 typing in a Taiwanese university hospital. // *J Clin Microbiol*. 2015, **53**(10), 3256-63.
82. Timoshina O.Y., Kasimova A.A., Shneider M.M., Matyuta I.O., Nikolaeva A.Y., Evseev P.V., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Chizhov A.O., Shelentov A.A., Mikhaylova Y.V., Slukin P.V., Volozhantsev N.V., Boyko K.M., Knirel Y.A., Miroshnikov K.A., Popova A.V.. *Friunavirus* Phage-Encoded Depolymerases Specific to Different Capsular Types of *Acinetobacter baumannii*. // *Int J Mol Sci*. 2023, **24**(10), 9100.
83. Lukianova A.A., Shneider M.M., Evseev P.V., Egorov M.V., Kasimova A.A., Shpirt A.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Kostryukova E.S., Miroshnikov K.A. Depolymerisation of the *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide K21 by *Klebsiella* Phage K5. // *Int. J. Mol. Sci*. 2023, **24**, 17288.

84. Volozhantsev N.V., Borzilov A.I., Shpirt A.M., Krasilnikova V.M., Verevkin V.V., Denisenko E.A., Kombarova T.I., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Dyatlov I.A.. Comparison of the therapeutic potential of bacteriophage KpV74 and phage-derived depolymerase (β -glucosidase) against *Klebsiella pneumoniae* capsular type K2. // *Virus Res.* 2022, **322**, 198951.
85. Jan E.G., Herman H., Johannis P. K., Johannes F.G. V., Harm S., Margriet J., Jan M.N. W.. A bacteriophage-associated lyase acting on *Klebsiella* serotype K5 capsular polysaccharide. // *Carbohydrate research.* 1985, **142**(2), 338–343.
86. Jones B.A., Grace D., Kock R., Alonso S., Rushton J., Said M.Y., et al. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. // *Proc Natl Acad Sci.* 2013, **110**(21), 8399–404.
87. O'Neill J. Tackling drug resistant infections globally: final report and recommendations [Internet]. 2016.
88. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A., Laxminarayan R.. Global trends in antimicrobial use in food animals. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015, **112**(18), 5649-54.
89. Nhung N.T., Chansiripornchai N., Carrique-Mas J.J.. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. // *Front Vet Sci.* 2017, **4**, 126.
90. Chlebicz A. Ślizewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2018, **15** (5), 863.
91. Uzal F.A., Navarro M.A., Li J., Freedman J.C., Shrestha A., McClane B.A. Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. // *Anaerobe.* 2018, **53**, 11-20.
92. Stein RA, Katz DE. *Escherichia coli*, cattle and the propagation of disease. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2017, **364** (6), fnx050.
93. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2017. // *EFSA Journal.* 2018, **16**(12), 5500.

94. European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. // *EFSA Journal*. 2020, **18**(3), 6007.
95. Burki T. Antibiotic development pipeline slows to a trickle. // *Lancet Infect Dis*. 2017, **17**(11), 1128–9.
96. Fernández L., Gutiérrez D., Rodríguez A., García P.. Application of bacteriophages in the agro-food sector: a long way toward approval. // *Front Cell Infect Microbiol*. 2018, **8**, 1–5.
97. d’Herelle F. Sur le role du microbe bacteriophage dans la typhose aviare. // *C R Acad Sci*. 1919, **169**, 932–934.
98. Pyle N.J.. The bacteriophage in relation to Salmonella Pullorum infection in domestic fowl. // *J Bacteriol*. 1926, **12**(4), 245–261.
99. Smith H.W., Huggins M.B.. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. // *Microbiology*. 1982, **128**(2), 307–318.
100. Sklar I.B., Joerger R.D.. Attempts to utilize bacteriophage to combat salmonella enterica serovar enteritidis infection in chickens. // *J Food Safety*. 2001, **21**(1), 15–29.
101. Prescott J.F., Parreira V.R., Mehdizadeh Gohari I., Lepp D., Gong J.. The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens: what we know and what we need to know: a review. // *Avian Pathol*. 2016, **45**(3), 288–294.
102. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F, Ducatelle R. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. // *Avian Pathol*. 2004, **33**(6), 537–549.
103. Miller R.W., Skinner J., Sulakvelidze A., Mathis G.F., Hofacre CL. Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with Clostridium perfringens. // *Avian Dis*. 2010, **54**(1), 33–40.
104. Fischetti V.A. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. // *Int J Med Microbiol*. 2010, **300**, 357–362.
105. Wernicki A, Nowaczek A, Urban-Chmiel R. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. // *Virol J*. 2017, **14**(1), 179.

106. Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S. V., Machado M. A., Toth I., Salmond G. and Foster G. D.. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. // *Mol. Plant Pathol.* 2012, **13**, 614-629
107. Rombouts S., Volckaert A., Venneman S., Declercq B., Vandenneuvel D., Allonsius C. N., Van Malderghem C., Jang H. B., Briers Y., Noben, J. P., Klumpp J., Van Vaerenbergh J., Maes M. and Lavigne R.. Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. // *Front. Microbiol.* 2016, **7**, 279.
108. Elhalag K., Nasr-Eldin M., Hussien A. and Ahmad A.. Potential use of soilborne lytic Podoviridae phage as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*. // *J. Basic Microbiol.* 2018, **58**, 658-669.
109. Nagai H., Miyake N., Kato S., Maekawa D., Inoue Y. and Takikawa Y.. Improved control of black rot of broccoli caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using a bacteriophage and a nonpathogenic *Xanthomonas* sp. strain. // *J. Gen. Plant Pathol.* 2017, **83**, 373-381.
110. Gašić K., Kuzmanović N., Ivanović M., Prokić A., Šević M. and Obradović A.. Complete genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* specific bacteriophage KΦ1, its survival and potential in control of pepper bacterial spot. // *Front. Microbiol.* 2018, **9**, 2021.
111. Lim J.A., Jee S., Lee D. H., Roh E., Jung K., Oh C. and Heu S.. Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, **23**, 1147-1153.
112. Addy H. S., Askora A., Kawasaki T., Fujie M., Yamada T.. Utilization of filamentous phage φRSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. // *Plant Dis.* 2012, **96**, 1204-1209.
113. Ahmad A. A., Askora A., Kawasaki T., Fujie M., Yamada T.. The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causative agent of citrus canker disease. // *Front. Microbiol.* 2014, **5**, 321.

114. Ahern S. J., Das M., Bhowmick T. S., Young R., Gonzalez C. F.. Characterization of novel virulent broad-host-range phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. // *J. Bacteriol.* 2014, **196**, 459-471.
115. Okabe N., Goto M.. Bacteriophages of plant pathogens. // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1963, **1**, 397-418.
116. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G. Jr.. Bacteriophage therapy. // *Antimicrob. Agent Chemother.* 2001, **45**, 649-659.
117. Chopin M.C., Chopin A., Bidnenko E.. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2005, **8**, 473-479.
118. Coffey A., Ross R. P.. Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. // *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002, **82**, 303-32.
119. Forde A., Daly C., Fitzgerald G. F.. Identification of four phage resistance plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, **65**, 1540-1547.
120. Ranjani P., Gowthami Y., Gnanamanickam S. S., Palani P.. Bacteriophages: a new weapon for the control of bacterial blight disease in rice caused by *Xanthomonas oryzae*. // *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 2018, **46**, 346-359.
121. Rezzonico F., Smits T. H., Duffy B.. Diversity, evolution, and functionality of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, **77**, 3819-3829.
122. Semenova E., Nagornykh M., Pyatnitskiy M., Artamonova I. I., Severinov K.. Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae*. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, **296**, 110-116.
123. Fujiwara A., Fujisawa M., Hamasaki R., Kawasaki T., Fujie M., Yamada T.. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, **77**, 4155-4162.
124. Dong Z., Xing S., Liu J., Tang X., Ruan L., Sun M., Tong Y., Peng D.. Isolation and characterization of a novel phage Xoo-sp2 that infects *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. // *J. Gen. Virol.* 2018, **99**, 1453-1462.

125. Schmerer M., Molineux I. J., Bull J. J.. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. // *PeerJ* 2014, **2**, e590.
126. Tewfike T. A., Desoky S. M.. Biocontrol of *Xanthomonas axonopodis* causing bacterial spot by application of formulated phage. // *Ann. Agric. Sci. Moshtohor*. 2015, **53**, 615-624.
127. Ramírez M., Neuman B., Ramírez C. A.. Bacteriophages as promising agents for the biological control of moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. // *Biol. Control*. 2020, **149**, 104238.
128. Ibrahim Y. E., Saleh A. A., Al-Saleh, M. A.. Management of asiatic citrus canker under field conditions in Saudi Arabia using bacteriophages and acibenzolar-S-methyl. // *Plant Dis*. 2017, **101**, 761-765.
129. Zaczek-Moczydłowska M. A., Young G. K., Trudgett J., Fleming C. C., Campbell K., O'Hanlon R.. Genomic characterization, formulation and efficacy in planta of a *Siphoviridae* and *Podoviridae* protection cocktail against the bacterial plant pathogens *Pectobacterium* spp. // *Viruses* 2020, **12**, 150.
130. Flaherty J. E., Jones J. B., Harbaugh B. K., Somodi G. C., Jackson L. E.. Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with H-mutant bacteriophages. // *HortScience*. 2000, **35**, 882-884.
131. Hernández A., Ruiz F. M., Romero A., Martínez J. L.. The binding of triclosan to SmeT, the repressor of the multidrug efflux pump SmeDEF, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. // *PLoS Pathog*. 2011, **7**, e1002103.
132. Bari S. M. N., Walker F. C., Cater K., Aslan B., Hatoum-Aslan A.. Strategies for editing virulent Staphylococcal phages using CRISPR-Cas10. // *ACS Synth. Biol*. 2017, **6**, 2316–2325.
133. Carlton R. M.. Phage therapy: past history and future prospects. // *Arch. Immunol. Ther. Exp*. 1999, **47**, 267–274.
134. Valério N., Oliveira C., Jesus V., Branco T., Pereira C., Moreirinha C., et al.. Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*. // *Virus. Res*. 2017, **240**, 8–17.

135. Oechslin F.. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. // *Viruses*. 2018, **10**, E351.
136. Jonczyk E., Kłak M., Miedzybrodzki R., Górski A.. The influence of external factors on bacteriophages. // *Folia Microbiol.* 2011, **56**, 191–200.
137. Ly-Chatain M. H.. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. // *Front. Microbiol.* 2014, **5**, 51.
138. Richards G. P.. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the biotechnology. // *Bacteriophage*. 2014, **4**, e975540.
139. Duarte J., Pereira C., Moreirinha C., Salvio R., Lopesa A., Wang D., et al.. New insights on phage efficacy to control *Aeromonas salmonicida* in aquaculture systems: an in vitro preliminary study. // *Aquaculture*. 2018, **495**, 970–982.
140. Gutiérrez D., Fernández L., Rodríguez A., García P.. Are phage lytic proteins the secret weapon to kill *Staphylococcus aureus*? // *MBio*. 2018, **9**, e01923–17.
141. Fan J., Zeng Z., Mai K., Yang Y., Feng J., Bai Y., et al.. Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1. // *Vet. Microbiol.* 2016, **191**, 65–71.
142. Swift S. M., Seal B. S., Garrish J. K., Oakley B. B., Hiett K., Yeh H. Y., et al.. A thermophilic phage endolysin fusion to a *Clostridium perfringens* specific cell wall binding domain creates an anti-*Clostridium* antimicrobial with improved thermostability. // *Viruses*. 2015, **7**, 3019–3034.
143. Rodríguez-Rubio L., Gerstmans H., Thorpe S., Mesnage S., Lavigne R., Briens Y.. DUF3380 domain from a *Salmonella* phage endolysin shows potent N-acetylmuramidase activity. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, **82**, 4975–4981.
144. Wang Y., Sun J. H., Lu C. P.. Purified recombinant phage lysin LySMP: an extensive spectrum of lytic activity for swine *Streptococci*. // *Curr. Microbiol.* 2009, **58**, 609–615.
145. Oliveira A., Leite M., Kluskens L. D., Santos S. B., Melo L. D., Azeredo J.. The first *Paenibacillus larvae* bacteriophage endolysin (PlyPl23) with high potential to control American foulbrood. // *PLoS ONE*. 2015, **10**, e0132095.

146. Bodner, K., Melkonian, A. L., Covert, M. W.. The enemy of my enemy: New insights regarding bacteriophage-mammalian cell interactions. // *Trends in Microbiology*. 2020, **4**, 55-67.
147. Torres-Barcelo C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. // *Emerg Microbes Infect*. 2018, **7**,168.
148. Petrovic Fabijan A, Lin RCY, Ho J et al. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. // *Nat Microbiol*. 2020, **5**, 465-72.
149. Cui Z, Guo X, Feng T et al. Exploring the whole standard operating procedure for phage therapy in clinical practice. // *J Transl Med*. 2019, **17**, 373.
150. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. // *Antimicrob Agents Chemother*. 2017, **61**, e02221-18.
151. Semin, Respir, Crit. The impact of resistant bacterial pathogens including *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia* on lung transplant outcomes. // *Care Med*. 2021, **42** (3), 436-448.
152. Kim, M., Jo, Y., Hwang, Y. J., Hong, H. W., Hong, S. S., Park, K., Myung, H.. Phage-antibiotic synergy via delayed lysis. // *Applied and Environmental Microbiology*. 2018, 02085- 18.
153. Corbellino, M., Kieffer, N., Kutateladze, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Askilashvili, L.. Eradication of a multidrug-resistant, carbapenemase-producing *klebsiella pneumoniae* isolate following oral and intra-rectal therapy with a custom made lytic bacteriophage preparation. // *Clinical Infectious Diseases*. 2020, **70**(9), 1998–2001.
154. Bao, J., Wu, N., Zeng, Y., Chen, L., Li, L., Yang, L., et al.. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. // *Emerging Microbes & Infections*. 2020, **9**(1), 771–774.
155. Grygorcewicz, B., Wojciuk, B., Roszak, M., Łubowska, N., Blstrokaejczak, P., Jursa-Kulesza, J., et al. Environmental phagebased cocktail and antibiotic combination

- effects on *Acinetobacter baumannii* biofilm in a human urine model. // *Microbial Drug Resistance*. 2021, **27**(1), 25–35.
156. Bao J, Wu N, Zeng Y et al.. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. // *Emerg Microb Infect*. 2020, **9**(1), 771–774.
157. Shlezinger M, Copenhagen-Glazer S, Gelman D, Beyth N, Hazan R. Eradication of vancomycin-resistant enterococci by combining phage and vancomycin // *Viruses*. 2019, **11**(10), 954.
158. Moradpour Z, Yousefi N, Sadeghi D, Ghasemian A. Synergistic bactericidal activity of a naturally isolated phage and ampicillin against urinary tract infecting *Escherichia coli* O157. // *Iran J Basic Med Sci*. 2020, **23**(2), 257–263.
159. Manohar P., Madurantakam R. M., Loh B., Bozdogan B., Nachimuthu R., Leptihn S.. Synergistic effects of phageantibiotic combinations against citrobacter amalonaticus. // *ACS Infect Dis*. 2022, **8**(1), 59–65.
160. Comeau A.M., Tetart F., Trojet S.N., Prere M.F., Krisch H.M.. Phage-antibiotic synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. // *PLoS ONE*. 2007, **2**(8), e799.
161. Wang X., Loh B., Gordillo A. F., Yu Y., Hua X., Leptihn S.. Colistin-phage combinations decrease antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* via changes in envelope architecture. // *Emerg Microb Infect*. 2021, **10**(1), 2205–2219.
162. Nir-Paz R., Gelman D., Khouri A. et al.. Successful Treatment of Antibiotic-resistant. Poly-microb Bone Infect Bacteriophages // *Antibiot Comb*. 2019, **69**(11), 2015–2018.
163. Rao S., Betancourt-Garcia M., Kare-Opaneye Y.O. et al. Critically Ill patient with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* respiratory infection successfully treated with intravenous and nebulized bacteriophage therapy. // *Antimicrob Agents and Chemother*. 2022, **66**(1), e0082421.
164. Ma Y., Wang C., Li Y., Li J., Wan Q., Chen J., et al.. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. // *Advanced Science*. 2020, **7**(1), 1901872.

165. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. // *The Lancet Infectious Diseases*. 2018, **18**(3), 318–327.
166. Wilson D.N., Hauryliuk V., Atkinson G.C., O’Neill A.J.. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2020, **18** (11), 637–648.
167. U.S. Centers for Disease Control and Prevention, Antibiotic/Antimicrobial Resistance. <https://www.cdc.gov/drugresistance/>.
168. Holt K., Kenyon J.J., Hamidian M., Schultz M.B., Pickard D.J., Dougan G., Hall R. Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. // *Microb. Genom.* 2016, **2**, e000052.
169. Schultz M.B., Pham Thanh D., Tran Do Hoan N., Wick R.R., Ingle D.J., Hawkey J., Edwards D.J., Kenyon J.J., Phu Huong Lan N., Campbell, J.I. et al. Repeated local emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single hospital ward. // *Microb. Genom.* 2016, **2**, e000050.
170. Wright M.S., Haft D.H., Harkins D.M., Perez F., Hujer K.M., Bajaksouzian S., Benard M.F., Jacobs M.R., Bonomo R.A., Adams M.D. New Insights into Dissemination and Variation of the Health Care-Associated Pathogen *Acinetobacter baumannii* from Genomic Analysis. // *mBio*. 2014, **5**, e00963-13.
171. Kenyon J.J., Hall R.M. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. // *PLoS ONE*. 2013, **8**, e62160.
172. Thomson J.M., Bonomo R.A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! // *Curr. Opin. Microbiol.* 2005, **8** (5), 518-524.
173. Li J., Nation R.L., Milne R.W., Turnidge J.D., Coulthard K., Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2005, **25** (1), 11-25.
174. Bonomo R.A., Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. // *Clin. Infect. Dis.* 2006, **43**, Suppl 2: S49-S56.

175. Li J., Nation R.L., Milne R.W., Turnidge J.D., Coulthard K., Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2005, **25** (1), 11-25.
176. Bou G., Martínez-Beltrán J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2000, **44** (2), 428-432.
177. Thomson J.M., Bonomo R.A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! // *Curr. Opin. Microbiol*. 2005, **8** (5), 518-524.
178. Årdal C., Balasegaram M., Laxminarayan R., McAdams D., Outtersson K., Rex J.H., Sumpradit N. Antibiotic development—Economic, regulatory and societal challenges. // *Nat. Rev. Microbiol*. 2020, **18**, 267–274.
179. Isler B., Doi Y., Bonomo R.A., Paterson D.L. New Treatment Options against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2018, **63**, e01110-18.
180. Schooley R.T., Biswas B., Gill J.J. et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. // *Antimicrob Agents Chemother*. 2017, **61**(10), e00954-17.
181. LaVergne S., Hamilton T., Biswas B., Kumaraswamy M., Schooley R.T., Wooten D. Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site infection. // *Open Forum Infect Dis*. 2018, **5**(4), ofy064.
182. Wu N., Dai J., Guo M. et al. Pre-optimized phage therapy on secondary *Acinetobacter baumannii* infection in four critical COVID-19 patients. // *Emerg Microb Infect*. 2021, **10**(1), 612–618.
183. Ghajavand H., Esfahani B.N., Havaei A., Fazeli H., Jafari R., Moghim S.. Isolation of bacteriophages against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. // *Res Pharm Sci*. 2017, **12**, 373–380.
184. Mishra R.R., Nath G.. Detection Of bacteriophages against Eskape group of nosocomial pathogens from Ganga River water during community bath at various rituals:

Since 2013–2019. // *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*. 2020, **5**, 7.

185. Perez F., Hujer A.M., Hujer K.M., Decker B.K., Rather P.N., Bonomo R.A. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. // *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, **51**, 3471–3484.

186. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G.. Bacteriophage therapy. // *Antimicrob Agents Chemother*. 2001, **45**, 649–659.

187. Mięczybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Szufnarowski K., Pawełczyk Z., Rogoź P., Kłak M., Wojtasik E., Goński A. Clinical aspects of phage therapy. // *Adv Virus Res*. 2012, **83**, 73–121.

188. Ghajavand H., Esfahani B.N., Havaei A., Fazeli H., Jafari R., Moghim S.. Isolation of bacteriophages against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. // *Res Pharm Sci*. 2017, **12**, 373–380.

189. Hernandez-Morales A.C., Lessor L.L., Wood T.L., Migl D., Mijalis E.M., Russell W.K., Young R.F., Gill J.J. Genomic and biochemical characterization of *Acinetobacter podophage* petty reveals a novel lysis mechanism and tail-associated depolymerase activity. // *J Virol*. 2018, **92**, e01064-17.

190. Merabishvili M., Vandenheuveld D., Kropinski A.M., Mast J., De Vos D., Verbeken G., Noben J.P., Lavigne R., Vanechoutte M., Pirnay J.P. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. // *PLoS ONE*. 2014, **9**, e104853.

191. Azam A. H., Tanji Y.. Bacteriophage-host arm race: An update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, **103**(5), 2121–2131.

192. Azam A.H., Tanji Y.. Bacteriophage-host arm race: An update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, **103**(5), 2121–2131.

193. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S.. Bacteriophage resistance mechanisms. // *Nature Reviews Microbiology*. 2010, **8**(5), 317– 327.

194. Mangalea M.R., Duerkop B.A.. Fitness trade-offs resulting from bacteriophage resistance potentiate synergistic antibacterial strategies. // *Infection and Immunity*. 2020, **88**(7), e00926-19.
195. Canfeld G.S., Chatterjee A., Espinosa J., Mangalea M.R., Sherif E. K., Keidan M. et al.. Lytic bacteriophages facilitate antibiotic sensitization of *Enterococcus faecium*. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2023, **65**(5), e00143-21.
196. Oechslin F.. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. // *Viruses*. 2018, **10**(7), 351.
197. Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., & Goodridge, L. D.. Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the enterobacteriaceae family. // *A Review. Front Microbiol*. 2017, **8**, 1108.
198. Chan B. K., Sistro M., Wertz J. E., Kortright K. E., Narayan D., Turner P. E.. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. // *Scientific Reports*. 2016, **6**(1), 26717.
199. Colom J., Batista D., Baig A., Tang, Y., Liu, S., Yuan, F., et al.. Sex pilus specific bacteriophage to drive bacterial population towards antibiotic sensitivity. // *Scientific Reports*. 2019, **9**(1), 12616.
200. Gabashvili E., Kobakhidze S., Koulouris S., Robinson T., Kotetishvili M.. Bi- and multi-directional gene transfer in the natural populations of polyvalent bacteriophages, and their host species spectrum representing foodborne versus other human and/ or animal pathogens. // *Food and Environmental Virology*. 2021, **13**(2), 179-202.
201. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopoly-saccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. // *Methods Carbohydr. Chem*. 1965, **5**, 83-91.
202. Gerwig G.J., Kamerling J.P., Vliegthart J.F.G. , Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary g.l.c., // *Carbohydr. Res*. 1979, **77** (1), 1-7.
203. Golstein I. J., Hay G. W., Lewis B.A., Smith F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. // *Meth. Carbohydr. Chem*. 1965, **5**, 361-370.

204. Battistel M. D., Pendrill R., Widmalm G., Freedberg D. I. Direct Evidence for Hydrogen Bonding in Glycans: A Combined NMR and Molecular Dynamics Study. // *J. Phys. Chem.* 2013, **117**, 4860–4869.
205. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. A computer-assisted structural analyses of regular polysaccharides on the basis of ^{13}C N.M.R. data // *Carbohydr. Res.* 1988, **175**, 59-75.
206. Bock K., Pedersen C. A study of ^{13}CH coupling constants in hexopyranoses // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* 1974, **2**, 293-297.
207. Woodward R., Yi W., Li L.. *In vitro* bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. // *Nat. Chem. Biol.* 2010, **6**, 418–423.
208. Hanisch F., Weidemann W., Großmann M., Joshi P.R., Holzhausen H. J., Stoltenburg G., Weis J., Zierz S., Horstkorte R., Sialylation and muscle performance: sialic acid is a marker of muscle ageing. // *PLoS One.* 2013, **8**, 80520.
209. Traving C., Schauer R.. Structure, function and metabolism of sialic acids *Cell. // Mol. Life Sci.* 1998, **54**, 1330-1349.
210. Tomás-Martínez S., Kleikamp, H.B., Neu, T.R. *et al.* Production of nonulosonic acids in the extracellular polymeric substances of “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*”. // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021, **105**, 3327–3338.
211. Kenyon J.J., Marzaioli A.M., Hall R.M., De Castro C.. Structure of the K12 capsule containing 5,7-di-N-acetylacinetaminic acid from *Acinetobacter baumannii* isolate D36. // *Glycobiology.* 2015, **25**(8), 881-7.
212. Shashkov A. S., Kasimova A. A., Arbatsky N. P., Senchenkova S. N., Perepelov A. V., Dmitrenok A. S., Chizhov A. O., Knirel Y. A., Shneider M. M., Popova A. V., Kenyon J. J., Complete chemical structure of the K135 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* RES-546 that contains 5,7-di-N-acetyl-8-epipseudaminic acid. // *Carbohydrate Research.* 2023, **523**, 108726.
213. Kasimova A.A., Dudnik A.G., Shashkov A.S., Shneider M.M., Christofferson A., Shelenkov A.A., Mikhailova Y.V., Kenyon J.J., Knirel Y.A.. The K218 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* isolate 52-249 includes 5,7-di-N-acetylpseudaminic acid linked by a KpsS3 glycosyltransferase. // *Int J Biol Macromol.*

2022, **218**, 310-316.

214. Knirel Y.A., Shashkov A.S., Tsvetkov Y.E., Jansson P.E., Zähringer U. 5,7-Diamino-3,5,7,9-tetraoxynon-2-ulosonic acids in bacterial glycopolymers: chemistry and biochemistry. // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 2003, **58**, 371-417.

215. Kenyon J.J., Arbatsky N.P., Shneider M.M., Popova A.V., Dmitrenok A.S., Kasimova A.A., Shashkov A.S., Hall R.M., Knirel Y.A.. 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**(6), e0218461.

216. Sullivan M.J., Petty N.K., Beatson S. A., Easyfig: a genome comparison visualizer. // *Bioinformatics*. 2011, **27** (7), 1009-10.

217. Kasimova A.A., Shneider M.M., Arbatsky N.P., Popova A.V., Shashkov A.S., Miroshnikov K.A., Balaji V., Biswas I., Knirel Y. A.. 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.

218. Timoshina O.Y., Kasimova A.A., Shneider M.M., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Shelenkov A.A., Mikhailova Y.V., Popova A.V., Hall R.M., Knirel Y.A., Kenyon J.J.. 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.

219. Kenyon J.J., Kasimova A.A., Notaro A., Arbatsky N.P., Speciale I., Shashkov A. S., De Castro C., Hall R.M., Knirel Y.A.. *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.

220. Arbatsky N.P., Kenyon J.J., Kasimova A.A., Shashkov A.S., Shneider M.M., Popova A.V., Knirel Y.A., Hall R.M.. 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.

221. Kasimova A.A., Sharar N.S., Ambrose S.J., Knirel Y.A., Shneider M.M., Timoshina O.Y., Popova A.V., Perepelov A.V., Dmitrenok A.S., Hsu L.Y., Hall R.M., Kenyon J.J.. 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.

222. Senchenkova S.N., Kenyon J.J., Jia T., Popova A.V., Shneider M.M., Kasimova A.A., Shashkov A.S., Liu B., Hall R.M., Knirel Y.A.. 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.

223. Arbatsky N.P., Shneider M.M., Dmitrenok A.S., Popova A.V., Shagin D.A., Shelenkov A.A., Mikhailova Y.V., Edelstein M.V., Knirel Y.A.. Structure and gene cluster of the K125 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* MAR13-1452. // *Int J Biol Macromol.* 2018, **117**, 1195-1199.

224. Kenyon J., Kasimova A., Shneider M., Shashkov A., Arbatsky N., Popova, A., Miroshnikov, K. Hall R., Knirel Y.. 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.

225. Hu D., Liu B., Dijkshoorn L., Wang L., Reeves P.R. Diversity in the Major Polysaccharide Antigen of *Acinetobacter Baumannii* Assessed by DNA Sequencing, and Development of a Molecular Serotyping Scheme. // *PLoS ONE.* 2013, **8**(7), e70329.

226. Kenyon J.J., Kasimova A.A., Shashkov A.S., Hall R.M., Knirel Y.A.. *Acinetobacter baumannii* isolate BAL_212 from Vietnam produces the K57 capsular polysaccharide containing a rarely occurring amino sugar N-acetylviosamine. // *Microbiology.* 2018, **164** (2), 217-220.

227. Kenyon J.J., Kasimova A.A., Sviridova A.N., Shpirt A.M., Shneider M.M., Mikhaylova Y.V., Shelenkov A.A., Popova A.V., Perepelov AV, Shashkov A.S.,

- Dmitrenok A.S., Chizov A.O., Knirel Y.A. 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.
228. Kasimova A.A., Arbatsky N.P., Timoshina O.Y., Shneider M.M., Shashkov A.S., Chizhov A.O., Popova A.V., Hall R.M., Kenyon J.J., Knirel Y.A. 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.
229. Kasimova A.A., Arbatsky N.P., Tickner J., Kenyon J.J., Hall R.M., Shneider M.M., Dzhaparova A.A., Shashkov A.S., Chizhov A.O., Popova A.V., Knirel Y.A.. *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.
230. Kasimova A.A., Kenyon J.J., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Popova A.V., Shneider M.M., Knirel Y.A., Hall R.M.. *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.
231. Garegg P., Jansson P.E., Lindberg B., Lindh F., Lönngren J., Kvarnström I., Nimmich W.. Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides. // *Carbohydr. Res.* 1980, **78** (1), 127-132.
232. Morrison M.J., Imperiali B. Biochemical analysis and structure determination of bacterial acetyltransferases responsible for the biosynthesis of UDP-N,N'-diacetylacillosamine. // *J. Biol. Chem.* 2013, **288**, 32248-32260.
233. Perepelov A.V., Liu B., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Guo D., Feng L., Knirel Y.A., Wang L.. Structures of the O-polysaccharides of *Salmonella enterica* O59 and *Escherichia coli* O15. // *Carbohydr Res.* 2011, **346**(2), 381-3.
234. Kasimova A.A., Shneider M.M., Edelstein M.V., Dzhaparova A.A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Kenyon J.J. 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.

235. Kasimova A.A., Cahill S.M., Shpirt A.M., Dudnik A.G., Shneider M.M., Popova A.V., Shelenkov A.A., Mikhailova Y.V., Chizhov A.O., Kenyon J.J., Knirel Y.A.. 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.
236. Kasimova A.A., Kenyon J.J., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Popova A.V., Knirel Y.A., Hall R.M. 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.
237. Arbatsky N.P., Kasimova A.A., Shashkov A.S., Shneider M.M., Popova A.V., Shagin D.A., Shelenkov A.A., Mikhailova Y.V., Yanushevich Y.G., Azizov I.S., Edelstein M.V., Hall R.M., Kenyon J.J., Knirel Y.A.. Structure of the K128 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* KZ-1093 from Kazakhstan. // *Carbohydr Res.* 2019, **485**, 107814.
238. Shashkov A.S., Cahill S.M., Arbatsky N.P., Westacott A.C., Kasimova A.A., Shneider M.M., Popova A.V., Shagin D.A., Shelenkov A.A., Mikhailova Y.V., Yanushevich Y.G., Edelstein M.V., Kenyon J.J., Knirel Y.A.. *Acinetobacter baumannii* K116 capsular polysaccharide structure is a hybrid of the K14 and revised K37 structures. // *Carbohydr Res.* 2019, **484**, 107774.
239. Arbatsky N.P., Kasimova A.A., Shashkov A.S., Shneider M.M., Popova A.V., Shagin D.A., Shelenkov A.A., Mikhailova Y.V., Yanushevich Y.G., Hall R.M., Knirel Y.A., Kenyon J.J.. 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.
240. Timoshina O.Y., Kasimova A.A., Shneider M.M., Matyuta I.O., Nikolaeva A.Y., Evseev P.V., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Chizhov A.O., Shelenkov A.A., Mikhaylova Y.V., Slukin P.V., Volozhantsev N.V., Boyko K.M., Knirel Y.A., Miroshnikov K.A., Popova A.V.. *Friunavirus* Phage-Encoded Depolymerases Specific to Different Capsular Types of *Acinetobacter baumannii*. // *Int J Mol Sci.* 2023, **24**(10), 9100.
241. Drobiazko A.Y., Kasimova A.A., Evseev P.V., Shneider M.M., Klimuk E.I.,

- Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Chizhov A.O., Slukin P.V., Skryabin Y.P., Volozhantsev N.V., Miroshnikov K.A., Knirel Y.A., Popova A.V. Capsule-Targeting Depolymerases Derived from *Acinetobacter baumannii* Prophage Regions. // *Int J Mol Sci.* 2022, **23**(9), 4971.
242. Popova A.V., Shneider M.M., Arbatsky N.P., Kasimova A.A., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Chizhov A.O., Mikhailova Y.V., Shagin D.A., Sokolova O.S., Timoshina O.Y., Kozlov R.S., Miroshnikov K.A., Knirel Y.A.. Specific Interaction of Novel *Friunavirus* Phages Encoding Tailspike Depolymerases with Corresponding *Acinetobacter baumannii* Capsular Types. // *J Virol.* 2021, **95**(5), e01714-20.
243. Timoshina O.Y., Shneider M.M., Evseev P.V., Shchurova A.S., Shelenkov A.A., Mikhaylova Y.V., Sokolova O.S., Kasimova A.A., Arbatsky N.P., Dmitrenok A.S., Knirel Y.A., Miroshnikov K.A., Popova A.V.. Novel *Acinetobacter baumannii* Bacteriophage Aristophanes Encoding Structural Polysaccharide Deacetylase. // *Viruses.* 2021, **13**(9), 1688.
244. Griggs L.J., Post A., White E.R., Finkelstein J.A., Moeckel W.E., Holden K.G., Zarembo J.E., Weisbach J.A.. Identification and quantitation of alditol acetates of neutral and amino sugars from mucins by automated gas-liquid chromatography. // *Anal Biochem.* 1971, **43**(2),369-81.
245. Kenyon J. J., Hall R. M.. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. // *PLoS One.* 2013, **3**, e62160.
246. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool. // *J. Mol. Biol.* 1990, **215**, 403-410.

Приложение

Таблица П1. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* 52-249 и модифицированного полисахарида (МПС).

Сахарный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9
			(акс,э кв)			(6a,6b)			
52-249									
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	103.9	52.2	76.7	65.2	75.9	62.1			
A	4.72	4.09	3.82	4.08	3.63	3.79, 3.79			
→6)-α-D-GlcpNAc-(1→	95.4	54.4	72.4	70.1	72.4	65.8			
B	5.07	3.98	3.67	3.73	3.73	3.62, 4.12			
→3)-α-D-Galp-(1→	99.7	68.4	80.5	70.1	72.4	65.8			
C	4.63	3.93	3.96	3.73	3.73	3.62, 4.12			
α-Psep5Ac7Ac-(2→	174.8	101.6	36.2	66.2	49.8	71.9	54.8	70.0	17.2
D			1.57, 2.08	4.16	4.20	3.85	4.15	4.28	1.14
МПС									
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	103.9	52.3	76.9	65.3	76.1	62.3			
A	4.72	4.10	3.65	4.10	3.65	3.77, 3.88			
→6)-α-D-GlcpNAc-(1→	95.5	54.5	72.4	70.5	72.5	66.1			
B	5.07	3.99	3.67	3.74	3.75	3.70, 4.13			
→3)-α-D-Galp-(1→	99.7	68.7	80.6	70.3	71.9	62.3			
C	5.01	3.93	3.98	4.25	3.98	3.75, 3.75			

Химические сдвиги N-ацильных групп КПС: δ_{H} 1.97- 2.07; δ_{C} 23.3, 23.4 (Me) и 175.4, 175.9 (CO);
МПС : δ_{H} 2.03, 2.05; δ_{C} 23.2, 23.6 (Me) и 175.7, 175.9 (CO).

Таблица П2. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* B11911 (K93).

Моносахаридный остаток	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
β -Psep5Ac7RNb-(2→			1.57, 2.50	3.87	4.18	3.96	4.00	4.07	1.22
A	174.1	102.6	37.1	68.1	49.9	74.7	54.9	70.9	19.2
→6)- α -D-Galp-(1→	4.97	3.83	3.80	3.95	4.05	3.56, 3.95			
B	100.1	69.7	70.7	70.7	70.8	65.1			
→3,6)- β -D-Galp-(1→	4.48	3.63	3.72	4.17	3.87	3.69, 3.69			
C	106.0	71.4	82.7	69.9	73.7	67.9			
→3)- β -D-GalpNAc-(1→	4.74	4.04	3.88	4.11	3.66	3.75, 3.75			
D	103.9	53.0	81.1	69.7	76.0	62.5			
RNhb		2.35	4.16	1.22					
	174.6	46.4	66.3	23.6					

Химические сдвиги N-ацетильных групп: δ_{H} 2.02 и 2.03, δ_{C} 23.6 и 23.8 (оба Me), 175.7 и 176.2 (оба CO).

Таблица ПЗ. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* К13, К73, ПС2 и ПС3.

Моносахаридный остаток	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6 (a, b)	C-7	C-8	C-9
(акс, экв)									
КПС К13									
$\rightarrow 3$)- α -D-FucpNAc-(1 \rightarrow	99.0	50.0	74.7	72.4	68.1	16.4			
A	4.85	4.38	3.99	3.85	4.61	1.19			
$\rightarrow 3$)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow	100.0	49.5	77.5	72.1	68.3	16.7			
B	5.03	4.34	4.03	4.00	4.16	1.28			
$\rightarrow 4,6$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	102.5	69.6	69.9	77.8	70.9	61.8			
C	5.11	3.85	3.97	4.05	4.12	3.37, 3.60			
α -Acip5Ac7Ac-(1 \rightarrow		100.9	40.9	68.7	55.0	74.8	54.8	67.5	19.9
D			1.66, 2.41	3.85	3.86	3.46	4.18	4.14	1.22
ПС2 (полученный из КПС К13)									
$\rightarrow 3$)- α -D-FucpNAc-(1 \rightarrow	99.6	50.0	74.9	72.5	68.3	16.4			
A'	4.78	4.38	3.98	3.84	4.52	1.20			
$\rightarrow 3$)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow	100.1	49.5	77.3	72.2	68.3	16.5			
B'	5.03	4.34	4.06	4.02	4.14	1.23			
$\rightarrow 4$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	102.1	69.7	70.0	78.5	73.4	61.7			
C'	5.15	3.84	3.97	4.01	4.09	3.68, 3.68			

К73 КПС

→3)-α-D-FucpNAc-(1→	99.1	49.8	74.6	72.3	68.2	16.4			
A	4.83	4.37	3.98	3.83	4.60	1.17			
→3)-α-L-FucpNAc-(1→	100.0	49.5	77.5	72.2	68.3	16.7			
B	5.02	4.32	4.04	3.99	4.16	1.26			
→4,6)-α-D-Galp-(1→	102.2	69.5	69.8	78.5	71.1	62.1			
C	5.10	3.83	3.98	3.99	4.14	3.39, 3.54			
α-8eAcip5Ac7Ac-(1→			40.6	67.8	54.2	76.7	53.5	66.3	20.2
D			1.70, 2.41	3.88	3.84	3.45	3.92	4.48	1.07

ПСЗ (полученный из КПС К73)

→3)-α-D-FucpNAc-(1→	99.6	49.8	74.6	72.3	68.2	16.4			
A'	4.77	4.35	3.98	3.83	4.54	1.18			
→3)-α-L-FucpNAc-(1→	100.0	49.5	77.5	72.2	68.3	16.4			
B'	5.02	4.32	4.04	4.02	4.13	1.21			
→4)-α-D-Galp-(1→	102.2	69.5	69.8	78.5	73.5	61.6			
C'	5.13	3.83	3.98	3.99	4.08	3.65, 3.69			

Химические сдвиги для N-ацетильных групп: δ_C 23.3-23.6 (CH₃), 174.6-175.8 (CO), δ_H 2.01-2.10.

Таблица П4. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* BAL097 (К8) и RCH52 (К54).

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9
			(Закс,3 экв)			(6a,6b)			
К8 КПС									
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	103.3	56.8	78.8	69.8	77.0	61.9			
A	4.52	3.83	3.71	3.54	3.42	3.74, 3.87			
$\rightarrow 3$)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow	98.5	49.5	72.9	72.8	68.0	16.6			
B	4.97	4.28	3.94	3.92	4.42	1.19			
$\rightarrow 3,6$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	100.0	49.4	77.4	70.1	71.9	65.6			
C	4.99	4.24	3.98	4.18	4.03	3.58, 3.93			
α -Legp5Ac7Hb-(2 \rightarrow	н.о.	н.о.	41.7	69.9	53.5	72.9	55.1	68.6	19.6
D			1.56, 2.69	3.58	3.62	3.93	3.87	3.95	1.15
МПС (полученный из К8)									
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	103.4	56.9	79.0	69.6	76.8	61.8			
A	4.53	3.84	3.68	3.52	3.42	3.76, 3.88			
$\rightarrow 3$)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow	98.6	49.8	73.9	72.2	68.0	16.7			
B	4.97	4.28	4.00	3.92	4.41	1.17			
$\rightarrow 3$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	99.6	49.5	77.2	70.1	72.3	62.8			
C	5.00	4.23	3.99	4.19	3.98	3.73			
ОС 1 (полученный из К8)									
$\rightarrow 3$)- α -L-FucfNAc-(1 \rightarrow	107.7	62.3	83.5	87.1	67.5	19.9			
B	5.06	4.24	4.12	4.04	4.02	1.27			
$\rightarrow 3$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	98.9	49.4	77.6	70.0	72.6	62.3			
C	5.03	4.31	3.93	4.22	3.98	3.74			
β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	103.7	56.9	74.7	71.0	76.9	61.7			
A	4.57	3.70	3.56	3.47	3.42				

3.78,
3.90

К54 КПС

→3)-β-D-GlcpNAc-(1→	102.8	56.9	78.9	70.4	77.2	62.7				
A	4.56	3.84	3.69	3.47	3.37	3.75,				
						3.91				
→3)-α-L-FucpNAc-(1→	98.5	49.3	77.0	71.9	67.8	16.8				
B	5.00	4.26	3.90	4.07	4.41	1.19				
→4,6)-α-D-GalpNAc-						66.7				
(1→	100.5	51.4	69.1	77.0	70.9	3.58,				
C	5.00	4.04	3.98	4.05	4.12	4.03				
α-Legp5Ac7Ac-(2→			41.9							
D	173.9	101.2	1.57,	69.8	53.6	73.0	55.2	68.6	19.9	
	н.о.	н.о.	2.69	3.60	3.63	3.95	3.86	4.01	1.20	

Химические сдвиги N-ацетильных групп: δ_H 1.91-2.03, δ_C 23.4-23.8 (Me) и 173.9-175.2 (CO);
 Для NHb группы δ_C 46.2 (CH₂), 66.3 (CHOH), 23.6 (Me), δ_H 2.40 (CH₂), 4.17 (CHOH), 1.25 (Me);
 для Me₂CHCH₂ δ_C 76.5 (CH₂), 29.0 (CH), 19.6 (два Me), δ_H 3.41, 3.56 (CH₂), 1.91 (CH), 0.92 (два Me). н.о. обозначает не обнаружен

Таблица П5. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* NIPH329 и модифицированного полисахарида (МПС).

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
	H-1	H-2	H-3 (Закс,3экв)	H-4	H-5	H-6 (6a,6b)	H-7	H-8	H-9
КПС									
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	103.9	52.4	77.0	65.4	76.1	62.4			
A	4.71	4.07	3.82	4.07	3.62	3.74, 3.79			
→6)-α-D-GlcpNAc-(1→	95.6	54.6	72.5	70.4	72.6	66.2			
B	5.05	3.96	3.65	3.74	3.73	3.64, 4.16			
→3,6)-α-D-Galp-(1→	99.7	68.7	80.6	70.5	70.5	65.2			
C	4.97	3.92	3.95	4.21	4.05	3.58, 3.95			
β-Psep4Ac5Ac7Ac-(2→	173.3	101.5	33.8	70.1	47.0	74.0	54.8	69.5	17.8
D			1.76, 2.50	4.90	4.30	4.00	4.07	4.13	1.19
МПС									
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	103.8	52.3	76.9	65.4	76.1	62.3			
A	4.71	4.07	3.81	4.07	3.62	3.73, 3.79			
→6)-α-D-GlcpNAc-(1→	95.5	54.6	72.5	70.4	72.6	66.2			
B	5.05	3.96	3.65	3.72	3.73	3.68, 4.09			
→3)-α-D-Galp-(1→	99.7	68.7	80.6	70.4	71.9	62.3			
C	4.98	3.91	3.95	4.21	3.95	3.73, 3.73			

Химические сдвиги для N-ацетильных групп: δ_{H} 1.92–2.05; δ_{C} 23.0–24.0 (Me) и 174.5–175.9 (CO);

O-ацетильная группа: δ_{H} 2.00; δ_{C} 21.7 (Me) и 174.1 (CO).

Таблица Пб. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* LUH5553 и модифицированного полисахарида (МПС).

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9
	(Закс,3экв)					(6а,6b)			
КПС									
→3)-β-D-GlcpNAc-(1→	101.7	55.8	79.9	69.6	76.8	61.7			
A	4.61	3.77	3.78	3.69	3.48	3.75, 3.90			
→3,6)-α-D-GlcpNAc-(1→	98.4	53.7	80.9	72.2	72.3	66.8			
B	5.36	4.08	3.76	3.68	3.75	3.69, 4.03			
→3)-α-D-Galp-(1→	99.7	68.5	74.0	69.1	72.0	62.3			
C	4.99	3.85	4.34	4.01	3.89	3.61, 3.65			
β-Psep5Ac7Ac-(2→	н. о.	н.о.	37.0	67.9	49.6	74.6	55.0	70.2	18.7
D			1.66, 2.53	3.86	4.19	3.87	3.98	4.11	1.21
МПС									
→3)-β-D-GlcpNAc-(1→	101.8	55.7	79.9	69.4	76.8	61.7			
A	4.60	3.78	3.78	3.70	3.47	3.75, 3.91			
→3,6)-α-D-GlcpNAc-(1→	98.4	53.7	80.7	72.1	72.4	66.7			
B	5.36	4.01	3.76	3.66	3.75	3.68, 4.04			
α-D-Galp-(1→	99.7	69.9	70.9	70.6	72.2	62.4			
C	4.99	3.84	3.90	4.01	3.95	3.74			

Химические сдвиги N-ацильных групп δ_{H} 1.92-2.05; δ_{C} 23.0-24.0 (Me) и 174.5-175.9 (CO). н.о. обозначает не обнаружено.

Таблица П7. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* RES546, МПС и ОС, полученных в результате распада по Смитсу.

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3 H-3	C-4	C-5	C-6 H-6	C-7	C-8	C-9
	H-1	H-2	(Закс, 3экв)	H-4	H-5	(6a,6b)	H-7	H-8	H-9
ОС									
β -8ePsep5Ac7Ac-(2→ D	174.9	102.0	37.1 1.64,2.53	67.9 3.88	49.2 4.18	72.5 3.84	54.3 3.90	66.9 4.39	18.0 1.07
→1)-Gro	66.6 3.49,3 .76	71.9 3.86	63.9 3.57, 3.64						
МПС									
→3)- α -GlcPNAc-(1→ B	98.2 5.38	53.6 3.99	80.5 3.77	69.5 3.70	73.3 3.49	61.7 3.83, 3.83			
→3)- β -GlcPNAc-(1→ A	101.8 4.61	55.6 3.80	79.5 3.79	72.2 3.70	76.8 3.49	61.6 3.77, 3.92			
КПС									
β -8ePsep5Ac7Ac-(2→ D	174.6	101.9	37.2 1.59,2.52	68.0 3.88	49.3 4.18	72.7 3.84	54.4 3.90	66.9 4.39	18.3 1.07
→6)- α -Galp-(1→ C	99.7 4.99	69.9 3.84	70.8 3.90	70.6 4.01	70.8 4.03	65.3 3.51,3. 97			
→3,6)- α -GlcPNAc- (1→ B	98.6 5.35	53.8 4.01	80.8 3.76	69.3 3.70	72.2 3.95	66.4 3.67,4. 05			
→3)- β -GlcPNAc-(1→ A	101.8 4.60	55.9 3.77	80.1 3.78	72.2 3.70	76.7 3.47	61.4 3.75,3. 91			

Химические сдвиги N-ацильных групп: δ_{H} 2.00-2.10, δ_{C} 23.0–23.8 (CH_3) и 175.5–175.8 (CO).

Таблица П8. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* K70 и модифицированного полисахарида (МПС).

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
КПС						
$\rightarrow 3$)- α -D-GalpNAcA-(1 \rightarrow	99.8	49.8	76.8	75.2	72.4	175.7
A	5.13	4.45	4.20	4.63	4.62	
$\rightarrow 3$)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow	100.1	49.8	74.6	72.3	68.2	16.5
B	4.88	4.30	4.10	3.68	3.99	1.28
$\rightarrow 3$)- β -D-FucpNAc-(1 \rightarrow	102.9	53.2	77.5	68.3	72.4	16.8
C	4.59	3.78	3.91	3.99	3.76	1.19
α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow	97.9	50.8	68.9	72.4	68.3	16.5
D						5.48
МПС						
$\rightarrow 3$)- α -D-GalpNAcA-(1 \rightarrow	100.0	49.3	77.0	70.9	72.1	Н.о.
A	5.07	4.27	4.04	4.54	4.44	
$\rightarrow 3$)- α -L-FucpNAc-(1 \rightarrow	100.0	49.9	74.9	71.9	68.4	16.6
B	4.92	4.29	4.05	3.72	4.07	1.19
$\rightarrow 3$)- β -D-FucpNAc-(1 \rightarrow	103.4	53.1	77.2	68.4	72.3	16.9
C	4.53	3.92	3.82	4.07	3.78	1.26

Химические сдвиги N-ацильных групп: δ_{H} 1.91-2.03 (Me); δ_{C} 23.6-23.8(Me) and 174.1-174.8 (CO); для МПС δ_{H} 1.91-2.08 (Me); δ_{C} 23.8-23.9(Me) and 174.7-175.1 (CO). Н.о.- не обнаружен.

Таблица П9. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР КПС РСН51 (К24) (δ , м.д.)

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	<i>H-1</i>	<i>H-2</i>	<i>H-3</i>	<i>H-4</i>	<i>H-5</i>	<i>H-6</i> (6a,6b)
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	103.6	55.8	80.3	72.2	76.9	61.8
A	4.76	3.83	3.78	3.68	3.45	3.75,3.90
$\rightarrow 4$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	98.8	51.3	68.4	78.3	72.9	61.0
B	5.44	4.28	3.94	4.07	3.95	3.70,3.75
$\rightarrow 3,6$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	99.7	54.0	81.7	69.8	72.2	66.6
C	4.98	4.15	3.96	3.75	4.34	3.64, 4.30
$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	99.6	68.9	80.6	70.3	71.8	62.3
D	4.94	3.89	3.93	4.19	3.96	3.72, 3.72
β -D-Fucp3NAc-(1 \rightarrow	104.9	69.7	56.1	71.1	73.3	16.7
E	4.54	3.54	3.93	3.65	3.90	1.25

Сигналы для N-ацетильных групп: δ_{H} 2.05, δ_{C} 23.3-23.7 (Me) и 175.5-175.9 (CO).

Таблица П10. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* K144.

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Моносахаридный остаток	H-1	H-2	H-3 (Закс,3экв)	H-4	H-5	H-6 (6a,6b)
КПС						
$\rightarrow 3$)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow	101.9	71.2	81.6	72.3	70.5	17.7
F	4.75	4.15	3.78	3.49	4.02	1.23
$\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	104.9	74.9	75.4	80.3	76.1	175.1
E	4.72	3.44	3.61	3.64	3.93	
$\rightarrow 3$)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow	103.2	71.0	81.7	72.4	70.5	18.0
D	4.96	4.28	3.91	3.60	3.75	1.27
$\rightarrow 2$)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow	102.1	79.2	71.4	73.5	70.5	17.8
C	5.15	4.05	3.91	3.47	3.75	1.31
$\rightarrow 3$)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow	102.5	71.9	78.7	73.0	70.5	17.7
B	4.85	3.85	3.79	3.54	4.02	1.23
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	103.6	56.9	82.9	69.7	77.1	62.0
A	4.71	3.86	3.63	3.56	3.47	3.77, 3.92

Сигналы N-ацетильных групп: δ_{C} 23.8 (Me) и 176.1 (CO), δ_{H} 2.05.

Таблица П11. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) дезацетилированного КПС (ДПС) *A. baumannii* *A. baumannii* KZ-1098 и олигосахаридов, полученных после распада по Смиту ДПС (ОС).

Моносахаридный остаток	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6
ДПС						
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	101.2	56.9	82.8	69.9	77.4	62.2
A	4.88	3.84	3.67	3.52	3.59	3.77, 3.95
$\rightarrow 3$)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow	103.0	71.3	75.3	71.3	68.8	16.8
B	5.06	3.93	4.03	3.93	4.30	1.24
$\rightarrow 4$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	102.7	74.2	75.4	81.3	75.7	61.6
C	4.69	3.46	3.79	3.66	3.64	3.78, 3.90
$\rightarrow 2,3$)- β -D-Manp-(1 \rightarrow	102.5	72.5	77.1	66.6	77.8	62.8
D	4.76	4.55	3.76	3.57	3.49	3.66, 3.98
$\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow	95.2	77.8	70.8	73.2	70.4	17.8
E	5.12	4.03	3.97	3.54	3.93	1.29
α -D-Glcp-(1 \rightarrow	99.0	72.7	74.1	70.9	73.3	61.9
F	5.00	3.57	3.79	3.45	4.05	3.80, 3.85
ОС						
α -L-6dTalp-(1 \rightarrow	103.1	71.6	68.7	70.1	68.9	16.9
B	5.00	3.71	3.87	3.88	4.28	1.24
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	101.3	56.9	82.3	69.9	77.1	62.0
A	4.94	3.82	3.66	3.51	3.45	3.77, 3.93
$\rightarrow 2$)- β -D-Manp-(1 \rightarrow	102.0	77.6	73.4	68.7	77.7	62.8
D	4.79	4.30	3.63	3.45	3.39	3.64, 3.93
$\rightarrow 2$)-эритриол	62.8	83.1	73.4	63.7		
C'	3.81	3.83	3.75	3.65		

Химические сдвиги N-ацильной группы: δ_{H} 2.09; δ_{C} 23.7 (Me) и 175.3 (CO).

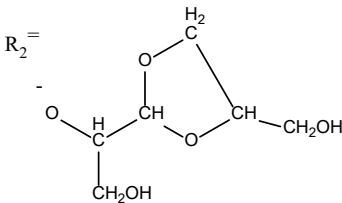
Таблица П12. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* 48-1789 и олигосахарид (ОС), полученного после распада по Смитту.

Моносахаридный остаток	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6 (6a,6b)
КПС						
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	102.1	56.6	83.3	69.7	77.3	61.9
A	4.65	3.85	3.65	3.49	3.51	3.78,3.93
$\rightarrow 3$)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow	103.3	70.9	76.4	71.6	69.0	16.7
B	4.98	3.88	3.86	3.66	4.23	1.22
$\rightarrow 2$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	103.8	77.2	75.9	70.6	77.3	61.8
C	4.73	3.51	3.57	3.48	3.51	3.78, 3.93
$\rightarrow 4$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	96.8	54.3	71.0	80.7	71.5	61.2
D	5.45	3.96	3.91	3.68	4.12	3.67, 3.81
ОС						
α -L-6dTalp-(1 \rightarrow	103.4	71.7	66.9	73.4	69.1	16.8
B	4.99	3.69	3.86	3.75	4.27	1.22
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	102.1	56.8	82.7	69.9	77.3	62.0
A	4.67	3.86	3.68	3.53	3.53	3.76, 3.94
$\rightarrow 4$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	98.1	54.6	70.8	81.0	78.1	61.4
D	5.21	3.93	3.93	3.67	4.28	3.69, 3.80
$\rightarrow 2$)-Gro-al	90.8	74.9	62.3			
C'	5.10	3.60	3.77			

Gro-al -глицероальдегид.

Химические сдвиги N-ацильных групп для КПС: δ_{H} 1.98-2.08, δ_{C} 23.3-23.5(Ме) и 175.3 (СО), для ОС: δ_{H} 2.05-2.09, δ_{C} 23.3-23.4 (Ме) и 175.3 (СО).

Таблица П13. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* K112 и олигосахаридов 1 и 2 (ОС), полученных после распада по Смитсу.

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (6a,6b)
КПС						
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	101.1	57.4	83.0	70.6	76.9	62.3
A	4.61	3.67	3.71	3.41	3.42	3.76, 3.97
$\rightarrow 3$)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow	103.1	70.9	76.3	71.7	69.0	16.7
B	5.00	3.88	3.83	3.64	4.22	1.22
$\rightarrow 2$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	103.6	77.3	75.9	70.5	76.9	61.9
C	4.73	3.52	3.57	3.48	3.44	3.83, 3.88
$\rightarrow 3,4$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	97.0	54.5	76.2	76.5	71.9	61.8
D	5.38	4.05	4.22	3.74	4.13	3.76, 3.85
β -L-Rhap-(1 \rightarrow	102.5	71.5	74.2	73.4	73.6	17.9
E	4.86	4.19	3.57	3.39	3.42	1.31
ОС						
$\rightarrow 3$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	99.3*					
D	98.4	53.9	80.5	69.7	73.0	61.8
	5.18*					
	5.08	4.01	3.95	3.58	3.91	3.84, 3.93
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	101.6	56.9	82.4	69.7	76.9	62.2
A	4.66	3.79	3.70	3.53	3.49	3.78, 3.82
α -L-6dTalp-(1 \rightarrow	103.2	71.6	66.7	73.4	68.9	16.7
B	4.98	3.68	3.86	3.74	4.27	1.19
R ₁ =	90.5	82.2	67.4			
CH ₂ OH-CH-CH(OH) ₂			3.84,			
	5.11	3.60	4.03			
			67.4			
	104.2	79.0	3.84,	62.8	77.9	61.7
	5.06	3.78	4.03	3.62, 3.72	4.28	Н.о.

Химические сдвиги N-ацетильных групп КПС: δ_{H} 2.00, 2.08; δ_{C} 23.6 (Me) и 174.2, 175.2 (CO); ОС: δ_{H} 2.01, 2.07; δ_{C} 23.5 (Me) и 169.9, 175.3 (CO). * сигналы для ОС2. Н.о. - не обнаружено.

Таблица П14. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* K20 и K21 и олигосахаридов 1 и 2 (ОС), полученных после распада по Смитсу.

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (6a,6b)
КПС <i>A. baumannii</i> A388 (K20)						
$\rightarrow 3$)- β -D-QuipNAc4NHb-(1 \rightarrow	102.5	57.3	80.0	56.7	72.2	18.4
Ань	4.78	3.85	3.85	3.63	3.58	1.23
$\rightarrow 3$)- β -D-QuipNAc4NAc-(1 \rightarrow	102.5	57.3	80.8	57.1	72.0	18.3
А_{Ac}	4.78	3.85	3.81	3.57	3.58	1.24
$\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow	104.7,					
В	105.0 ^a 4.42 ^a , 4.44	73.8 3.25, 3.27 ^a	75.1 3.61	81.6 3.77	75.5 3.88	172.2, 172.3
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	102.6	55.3	82.6	69.4	76.7	62.2
С	4.66	3.70	3.90	3.61	3.51	3.75, 3.93
$\rightarrow 2$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow						66.2
Д	100.1 4.54	79.5 3.70	73.6 3.72	72.6 4.12	67.2 3.51	3.87, 4.00
руг	175.0	101.2	26.3 1.51			
Нь	175.1	46.3 2.32	66.2 4.15	23.5 1.21		
ОС1 (полученный из КПС K20)						
$\rightarrow 3$)- β -D-QuipNAc4NHb-(1 \rightarrow	102.7	57.8	73.0	62.0	72.3	18.3
Ань	4.77	3.77	3.58	3.61	3.54	1.22
$\rightarrow 2$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	99.3	71.4	72.6	72.3	67.3	66.3
Д	4.61	3.61	3.68	4.17	3.61	3.93, 4.05
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	102.2	55.9a,54.7b	83.9	69.8	76.9	62.0
С	4.83	3.82a,3.75b	3.76	3.58	3.48	3.77, 3.91
$\rightarrow 3$)-треоновая кислота	104.6	71.8	82.3	62.0		
В'	4.34	4.33	4.06	3.77		
$\rightarrow 3$)-лактон кислоты	103.1	70.7	77.0	72.3		
В''	4.75	4.74	4.68	4.50		
Руг	175.4	101.4	26.4			

			1.48			
Нб	175.4	46.5	66.4	23.6		
		2.42	4.18	1.21		

^a - в случае, когда в структуре присутствует остаток **B'**, ^b - когда в структуре присутствует остаток **B''**

КПС *A. baumannii* G21 (K21)

→3)-β-D-QuiNAc4NHb-(1→	102.7	57.1	79.9	56.6	71.9 ^b	18.3
A нь	4.75	3.84	3.82	3.59	3.54	1.22 ^c
→3)-β-D-QuiNAc4NAc-(1→	102.7	57.1	80.7	57.0	71.8 ^b	18.3
A Ac	4.75	3.84	3.81	3.54	3.54	1.21 ^c
→4)-β-D-GlcpA-(1→	104.6,			78.0,		
B	104.9 ^c	74.2, 74.3	76.8	78.1	76.0	173.1, 173.3
	4.40 ^c , 4.41	3.23, 3.25 ^c	3.65	3.80	3.92	
→3)-α-D-GlcpNAc-(1→	98.6, 98.7	52.6	80.4	68.4	73.0	61.3
C	5.36	4.02	3.92	3.70	3.62	3.77, 3.82
→2)-β-D-Galp-(1→	99.6	79.1	73.5	72.6	67.0	66.2
D	4.63	3.70	3.74	4.12	3.55	3.88, 4.02
руг			26.2			
	175.5	100.9	1.52			
Нб		46.2	66.2	23.4		
	175.4	2.32, 2.37	4.17	1.22		

Химические сдвиги N-ацильных групп: δ_C 23.4-24.1 (Me) и 174.6-176.0 (CO), δ_H 1.92-1.94 (NAc-4 остаток **A**Ac) и 2.02-2.07 (NAc-2 для других остатков).

^a В случае присоединения к остатку **A**Ac.

^{b,c} Отнесение может быть не точным.

Таблица П15. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* REV-1184, модифицированного полисахарида (МПС) и олигосахарида (ОС), полученных в результате периодатного окисления.

Моносахаридный остаток	C-1 H-1 (1a,1b)	C-2 H-2	C-3 H-3 (3a,3b)	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6 (6a,6b)
КПС						
→3)-β-D-QuipNAc-(1→	103.5	55.7	81.6	77.6	72.7	17.9
A	4.58	3.82	3.68	3.39	3.40	1.28
→3)-β-D-QuipNAc-(1→	102.6	56.1	77.0	77.5	72.2	17.8
A'	4.61	3.77	3.86	3.39	3.50	1.16
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	98.9	49.4	77.5	71.6	69.8	61.8
B	4.90	4.28	3.97	4.26	4.22	3.65, 3.65
→3)-4,6-Pyr-β-D-GalpNAc-(1→	98.9	49.4	75.5	78.8	73.1	66.4
B'	4.89	4.36	4.01	4.40	4.45	3.92, 3.92
→6)-α-D-GlcpNAc-(1→	100.1	55.0	72.3	71.1	72.2	66.6
C	4.93	3.90	3.78	3.56	4.21	3.99, 3.58
→4)-α-D-GalpNAcA-(1→	99.7	50.8	68.0	79.8	72.0	173.7
D			4.01			
(<i>R</i>)-Pyr-(2→	5.36	4.22	26.3	4.36	4.31	
	174.9	100.6	1.54			
МПС						
→3)-β-D-QuipNAc-(1→	103.1	55.8	81.6	77.6	72.9	18.0
A	4.59	3.77	3.67	3.39	3.46	1.28
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	98.6	49.7	77.8	69.8	71.9	62.5
B	4.90	4.27	3.95	4.18	3.97	3.73
→6)-α-D-GlcpNAc-(1→	100.1	55.1	72.2	71.1	72.5	66.5
C	4.92	3.91	3.79	3.60	4.22	3.99, 3.58
→4)-α-D-GalpNAcA-(1→	99.7	50.8	68.0	79.6	71.9	173.6
D	5.36	4.24	3.99	4.38	4.31	
ОС						
α-D-GalpNAcA-(1→	99.4	50.7	69.0	71.4	73.4	Не найден
D	5.36	4.20	3.87	4.28	4.12	

→3)-β-D-QuipNAc-(1→	103.2	55.7	80.6	77.7	72.9	17.9
A	4.59	3.77	3.67	3.38	3.45	1.29
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	98.7	49.6	77.7	69.8	71.9	61.9
B	4.85	4.29	3.96	4.18	3.97	3.74
→1)-Gro	69.9	72.1	63.9			
C'	3.53,	3.97	3.63,			
	3.79		3.73			

Химические сдвиги N-ацильных групп КПС: δ_{H} 1.94, 2.04; δ_{C} 23.4-23.8 (Me) и 174.8-175.9 (CO); для МПС: δ_{H} 1.93, 2.07; δ_{C} 23.4-23.9 (Me) и 175.2-176.1 (CO); для ОС: δ_{H} 1.93, 2.05; δ_{C} 23.4-23.6 (Me).

Таблица П16. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* LUH55534 (K82).

Моносахаридный остаток	C1	C2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H1	H2	H-3	H-4	H-5	H-6 (6a,6b)
КПС						
$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	103.4	52.6	82.0	69.5	76.1	61.7
A	4.76	4.03	3.82	4.14	3.65	3.82
$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	106.0	70.5	78.7	66.4	76.1	62.4
B	4.47	3.63	3.66	4.04	3.59	3.71, 3.76
$\rightarrow 3$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	95.7	53.0	80.3	68.8	72.8	62.5
C	5.01	4.13	4.06	3.70	4.01	3.75, 3.83
$\rightarrow 2,4,6$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	100.5	79.2	73.6	72.7	67.1	66.2
D	4.64	3.75	3.75	4.13	3.55	3.90, 4.02
Pyr	175.2	101.2	26.3			
			1.50			
МПС						
$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	103.1	52.6	82.2	69.6	76.1	61.6
A	4.77	4.03	3.82	4.15	3.64	3.82
$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	106.1	70.4	78.6	66.3	76.1	62.3
B	4.47	3.62	3.67	4.06	3.60	3.75
$\rightarrow 3$)- α -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow	95.5	53.6	80.1	69.2	69.9	62.4
C	5.02	4.11	4.08	3.66	4.00	3.73, 3.82
$\rightarrow 2$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow	101.8	79.5	75.0	70.1	76.4	62.4
D	4.59	3.66	3.69	3.86	3.69	3.73

Химические сдвиги для N-ацетильных групп: δ_{C} 23.4-23.6 (Me) и 175.2-176.0 (CO), δ_{H} 2.01-2.13.

Таблица П17. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС *A. baumannii* KZ1093 (K128), 36-1454 (K127) и MAR303 (K116).

Моносахаридный остаток	C1 H1	C2 H2	C3 H3	C4 H4	C5 H5	C6 H6 (a,b)
КПС KZ1093						
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	103.5	53.8	81.5	69.4	76.1	62.7
A	4.69	3.99	3.87	4.15	3.63	3.78,3.78
→6)-β-D-Galp-(1→	106.2	72.3	74.1	70.1	73.8	67.8
B	4.49	3.55	3.64	3.98	3.83	3.70,3.84
→4,6)-α-D-Galp-(1→	100.1	69.5	71.2	78.5	71.3	72.2
C	4.34	3.72	3.90	4.09	4.00	3.82, 4.07
→6)-β-D-GalpNAc-(1→	103.9	53.2	75.1	70.1	73.8	70.4
D	4.49	3.92	3.86	3.99	3.72	3.93, 4.07
β-D-Glcp-(1→	104.3	74.7	77.4	71.3	73.6	62.5
E	4.50	3.32	3.51	3.41	3.47	3.75, 3.92
Химические сдвиги для N-ацетильных групп: δ_{H} 2.04; δ_{C} 24.0 (оба Me), 175.8 и 176.3 (обе CO).						
КПС 36-1454						
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	104.1	52.7	81.4	69.1	75.8	62.2
A	4.71	4.06	3.89	4.15	3.69	3.77, 3.80
→6)-β-D-Glcp-(1→	105.8	74.2	76.9	70.2	75.5	66.0
B	4.56	3.32	3.52	3.61	3.61	3.69, 4.00
→3,6)-α-D-Galp-(1→	99.5	68.7	80.4	70.4	70.4	70.9
C	4.96	3.90	3.91	4.19	4.04	3.72, 4.05
→6)-β-D-GalpNAc-(1→	103.2	53.6	72.2	69.2	75.0	70.3
D	4.50	3.89	3.73	3.97	3.87	3.94, 4.07
β-D-Glcp-(1→	104.0	74.3	76.9	70.9	77.2	62.0
E	4.53	3.31	3.50	3.39	3.47	3.73, 3.93
Химические сдвиги для N-ацетильных групп: δ_{H} 2.03 и 2.05; δ_{C} 23.6, 23.7 (оба Me), 175.7 и 176.3 (обе CO).						
OC						
β-D-GalpNAc-(1→	104.2	53.7	71.9	68.9	76.0	62.1
A	4.65	3.94	3.76	3.95	3.68	3.71,3.78
→3)-α-D-Galp-(1→	99.7	68.5	80.2	70.2	71.6	62.2
C	4.94	3.89	3.96	4.21	3.96	3.73,3.74

→1)-глицерол	69.6	69.5	71.2			
В'	3.58, 3.76	3.95	3.65, 3.68			
КПС MAR303						
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	104.5	52.9	81.6	69.4	76.0	62.7
А	4.66	4.11	3.85	4.16	3.70	3.78, 3.78
→6)-β-D-Galp-(1→	106.0	72.0	73.8	69.7	76.0	68.0
В	4.48	3.56	3.63	4.02	3.70	3.83, 3.83
→3,4)-α-D-Galp-(1→	100.4	68.7	80.9	77.6	71.9	62.4
С	4.96	3.74	3.91	4.37	3.94	3.74, 3.81
→6)-α-D-GalpNAc-(1→	103.1	53.6	72.1	69.2	74.8	70.4
Д	4.92	3.93	3.78	3.97	3.85	3.92, 4.08
β-D-Glcp-(1→	104.1	74.4	77.0	71.1	77.2	62.1
Е	4.51	3.30	3.50	3.40	3.49	3.75, 3.93

Химические сдвиги для N-ацетильных групп: δ_{H} 2.05 и 2.03; δ_{C} 23.7 и 23.8 (оба Me), 176.1 и 176.0 (оба CO).

Таблица П18. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС АВ5001 и МПС, полученного после распада по Смитту.

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	H1	H2	H3	H4	H5	H6 (a, b)
КПС						
$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	99.7	66.8	81.6	77.0	71.4	61.7
A	4.94	3.73	3.92	4.40	3.64	3.65, 3.79
$\rightarrow 6$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	106.0	74.4	77.1	70.3	77.6	66.6
B	4.56	3.32	3.48	3.60	3.59	3.73, 4.01
$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	105.0	52.9	82.0	71.4	76.0	62.5
C	4.65	4.14	3.87	3.93	3.71	3.82, 3.82
β -D-GlcpNAc3NAcA-(1 \rightarrow	102.6	54.8	56.2	71.4	75.0	174.1
D	5.08	3.84	4.03	3.64	4.03	
β -D-GlcpNAc3NAc4AcA-(1 \rightarrow	102.4	54.4	54.2	72.1	77.1	174.1
D'	5.08	3.96	4.23	4.96	3.90	
МПС						
$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	100.0	69.1	81.8	77.4	71.8	62.1
A	4.93	3.73	3.92	3.40	3.93	3.65, 3.77
$\rightarrow 6$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	106.2	74.7	77.5	70.7	75.9	67.1
B	4.54	3.31	3.48	3.59	3.59	3.75, 4.00
$\rightarrow 3$)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	105.3	53.2	82.2	69.5	76.3	62.8
C	4.66	4.13	3.88	4.16	3.71	3.82, 3.82
β -D-GlcpNAcA-(1 \rightarrow	102.9	55.1	56.5	71.6	77.1	175.2
D	5.10	3.85	4.03	3.67	3.97	

Химические сдвиги N-ацильных групп КПС: δ_{H} 1.90-2.07; δ_{C} 22.2-23.8 (Me) и 175.8-176.0 (CO); МПС: δ_{H} 1.99-2.01; δ_{C} 23.7-24.1 (Me) и 176.1-176.3 (CO).

Таблица П19. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C ЯМР (δ , м.д.) КПС К139 и олигосахарида (ОС), полученного после распада по Смитту КПС.

Моносахаридный остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
	H1	H2	H3	H4	H5	H6 (a, b)
КПС						
$\rightarrow 3$)- α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	99.9	50.1	78.8	69.5	71.7	61.9
A	5.02	4.42	4.15	4.30	4.41	3.72, 3.72
$\rightarrow 6$)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow	105.5	74.3	77.1	70.3	75.5	66.7
B	4.64	3.34	3.52	3.64	3.64	3.76, 4.05
$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	99.6	68.9	80.7	70.6	71.9	62.3
C	4.98	3.92	3.94	4.21	3.96	3.74, 3.74
$\rightarrow 4,6$)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	104.6	53.9	71.6	77.3	75.2	69.6
D	4.72	4.03	3.89	4.07	3.93	3.86, 4.03
β -D-Glcp-(1 \rightarrow	104.4	74.3	77.0	70.8	77.2	61.9
E	4.42	3.29	3.47	3.46	3.41	3.89, 3.72
ОС						
α -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	100.0	51.4	68.5	69.6	72.1	61.8
A	4.96	4.24	4.06	4.08	4.39	3.72, 3.72
$\rightarrow 4$)- β -D-GalpNAc-(1 \rightarrow	104.6	54.0	71.7	77.7	76.6	61.6
D	4.73	4.02	3.83	4.02	3.74	3.77, 3.79
$\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	99.9	68.9	80.3	70.5	71.8	62.3
C	4.94	3.92	3.99	4.20	3.96	3.76, 3.76
$\rightarrow 1$)-Gro	69.9	71.9	63.8			
B'	3.59,		3.66,			
	3.77	3.82	3.70			

Химические сдвиги N-ацильных групп: δ_{H} 2.03-2.09, δ_{C} 23.5-24.1 (CH_3) и 175.6-176.5 (CO).