

**Филатов Андрей Викторович**

«Установление строения О-специфических полисахаридов энтеробактерий *Enterobacter cloacae* и *Escherichia coli*. Сольволиз трифторуксусной кислотой как удобный метод избирательного расщепления гликозидных связей»

Шифр специальности 02.00.10

Химические науки

Шифр диссертационного совета Д 002 222 01

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук

119991, Москва, Ленинский проспект, 47

Тел.:(499) 137-13-79

E-mail: [sci-secr@ioc.ac.ru](mailto:sci-secr@ioc.ac.ru)

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

22 июня 2017 года

Дата приема к защите

27 июня 2017 года

Дата размещения автореферата на сайте ВАК [vak3.ed.gov.ru](http://vak3.ed.gov.ru)

6 июля 2017 года

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

---

На правах рукописи



**Филатов Андрей Викторович**

**УСТАНОВЛЕНИЕ СТРОЕНИЯ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ  
ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ *ENTEROBACTER CLOACAE* И *ESCHERICHIA COLI*.  
СОЛВОЛИЗ ТРИФТОРУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ КАК УДОБНЫЙ МЕТОД  
ИЗБИРАТЕЛЬНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ГЛИКОЗИДНЫХ СВЯЗЕЙ**

02.00.10 – биоорганическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории химии углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии имени Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН)

#### НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ

##### **Перепелов Андрей Вячеславович**

кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии углеводов № 21 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии имени Н. Д. Зелинского Российской академии наук

#### НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ

##### **Книрель Юрий Александрович**

доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией химии углеводов № 21 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии имени Н. Д. Зелинского Российской академии наук

#### ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ

##### **Орецкая Татьяна Семеновна**

доктор химических наук, профессор химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

##### **Бурьгин Геннадий Леонидович**

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (г. Саратов)

#### ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (г. Казань)

Защита состоится 10 октября 2017 г. в 12 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 002.222.01 при ИОХ РАН по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН и на официальном сайте ИОХ РАН: <http://zioc.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 002.222.01

доктор химических наук, профессор РАН



Дильман А.Д.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** О-антигены или О-специфические полисахариды (ОПС) – это полисахаридные цепи липополисахаридов, расположенных на наружной поверхности внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Они участвуют в специфических взаимодействиях бактерий с другими биологическими системами, в том числе с иммунной системой животных и человека. В частности, тонкая структура ОПС определяет иммуноспецифичность бактерий и лежит в основе серотипирования бактериальных штаммов. Широкая вариабельность структур ОПС, возникшая в ходе эволюции бактерий, рассматривается как фактор вирулентности патогенных микробов, так как иммунная память, сформировавшаяся в результате контакта с одним бактериальным клоном, неэффективна против клона с ОПС, имеющим другую структуру.

Молекулярной основой структурного разнообразия ОПС является полиморфизм генных кластеров, в которых находятся гены, кодирующие ферменты биосинтеза О-антигенов. Интерес к изучению строения и генетических основ биосинтеза О-антигенов связан не только с решением фундаментальных задач наук о жизни, но и с такими практическими задачами, как, например, классификация бактерий, необходимая для эпидемиологического мониторинга. Данные о строении ОПС востребованы для разработки методов молекулярного типирования бактерий и экспресс-диагностики инфекций на основе специфических генов биосинтеза О-антигенов, а также средств вакцинопрофилактики.

Систематические исследования строения ОПС грамотрицательных бактерий проводятся в лаборатории химии углеводов ИОХ РАН. Одним из основных объектов изучения является кишечная палочка (*Escherichia coli*) – распространенный компонент нормальной микрофлоры кишечника. Однако некоторые штаммы этого вида могут вызывать диарею, гастроэнтерит, инфекции мочевыводящих путей и неонатальный менингит, а также такие особо опасные заболевания, как гемолитико-уремический синдром и геморрагический колит. Недавно в лаборатории начато изучение бактерий другого вида – энтеробактера клоаки (*Enterobacter cloacae*), которые отличаются высокой устойчивостью к антибиотикам и вызывают инфекционные заболевания мочеполовых путей, остеомиелиты, холециститы и менингиты у новорожденных. Оба эти вида, наряду с *Klebsiella pneumoniae*, возглавляют список наиболее важных энтеробактериальных возбудителей внутрибольничных инфекций. Установление строения и определение функций генов биосинтеза их О-антигенов, которому посвящена настоящая работа, является актуальной задачей современной науки.

**Цель работы.** Основная цель настоящей работы заключалась в получении новой информации о строении и генетике биосинтеза О-антигенов *E. cloacae* и *E. coli*, которая

послужит молекулярной основой для классификации штаммов этих двух видов энтеробактерий. Для достижения поставленной цели необходимо было установить строение и определить функции генов биосинтеза ОПС ранее неисследованных штаммов *E. cloacae* и *E. coli*. Другой целью исследования была разработка улучшенного метода избирательного расщепления гликозидных связей, который позволял бы решать задачи структурного анализа таких сложных объектов, какими являлись исследуемые ОПС. Планировалось также выяснить применимость этого метода для получения олигосахаридных фрагментов ОПС энтеробактерий *Shigella flexneri* как потенциальных компонентов противодизентерийных конъюгатных вакцин.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** В работе установлены новые структуры 12 ОПС бактерий *E. cloacae* и 7 ОПС *E. coli*. Полученные данные представляют собой химическую основу для классификации этих бактерий, необходимой для типирования штаммов и эпидемиологического мониторинга. Они позволяют также определять функции генов биосинтеза О-антигенов, в том числе выявлять специфические гены, которые могут быть использованы в качестве мишеней для молекулярного типирования штаммов исследуемых бактерий. Для установления строения ОПС предложен сольволиз безводной трифторуксусной кислотой, показавшей себя как новый эффективный и удобный в работе реагент для избирательного расщепления гликозидных связей. Кроме того, сольволиз  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  был впервые использован для получения олигосахаридных фрагментов ОПС энтеробактерий *Shigella flexneri* – возбудителей шигеллёза (бациллярной дизентерии), которые являются потенциальными компонентами конъюгатных вакцин для профилактики этого заболевания.

**Публикации и апробация работы.** Основное содержание диссертации опубликовано в 13 статьях в рецензируемых научных журналах *Carbohydrate Research* и *Mendeleev Communications* и 9 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

Результаты работы были представлены на четырех российских и трех международных конференциях: VI Молодежная конференция ИОХ РАН, Москва, 2014 г.; *Molecular Complexity in Modern Chemistry*, Moscow, 2014; 6th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Gdansk, Poland, 2014; 18th European Carbohydrate Symposium, Moscow, 2015; V Съезд биохимиков России, Сочи-Дагомыс, 2016 г.; III Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология», Владивосток, 2016 г.; Научная конференция грантодержателей РНФ «Фундаментальные научные исследования XXI-го века», Москва, 2016 г.

Диссертация обсуждена и одобрена на объединенном коллоквиуме лаборатории химии углеводов и лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН 29 марта 2017 г.

**Личный вклад соискателя.** Соискатель самостоятельно проводил все химические эксперименты, включая анализ состава, модификацию и избирательное расщепление ОПС,

интерпретировал данные ЯМР-спектроскопического и масс-спектрометрического анализа и участвовал в обсуждении результатов. Все статьи и тезисы докладов, опубликованные по результатам работы, подготовлены при непосредственном участии соискателя.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, литературного обзора, посвященного структурному разнообразию ОПС бактерий, обсуждения результатов, экспериментальной части и выводов, а также включает список литературы и приложение (табулированные данные ЯМР спектров). Работа изложена на 139 страницах, содержит 11 рисунков, 35 таблиц и 140 литературных ссылок.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

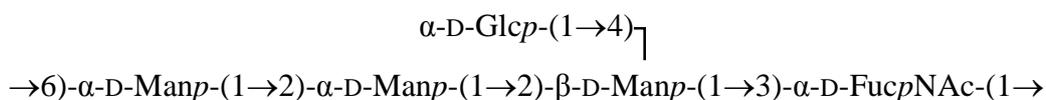
Содержание работы представлено в трех частях. В первой части приведены установленные структуры ОПС бактерий *E. cloacae* и *E. coli*, обсуждаются особенности их состава и строения. Во второй части рассматриваются основные методы, применявшиеся для структурного анализа полисахаридов, в том числе метод, предложенный в данной работе. В третьей части описано получение олигосахаридных фрагментов ОПС бактерий *S. flexneri* как потенциальных компонентов противодизентерийных конъюгатных вакцин.

### 1. Строение О-специфических полисахаридов

#### 1.1. Полисахариды бактерий *Enterobacter cloacae*

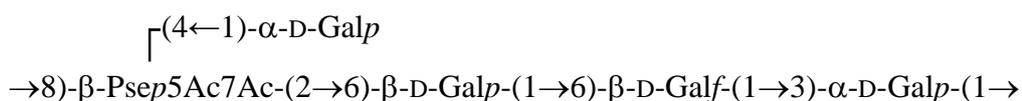
На основании результатов серологического исследования О-антигенов штаммы *E. cloacae* разделены на 28 О-серогрупп. Ранее строение ОПС было установлено только для одной серогруппы O10 (Moule A.L. et al. // *Carbohydr. Res.* 1989, 186, 287-293).

##### *E. cloacae* O10 (NCTC 11579)

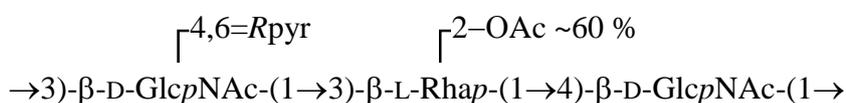


Нами установлено строение ОПС еще 12 О-серогрупп. Все они построены из повторяющихся олигосахаридных единиц (О-звеньев) размером от три- до гексасахарида.

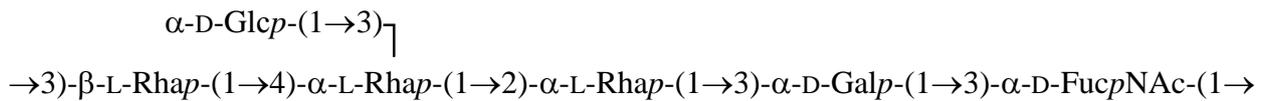
##### *E. cloacae* O1 (G3054)



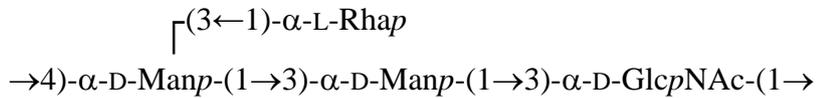
##### *E. cloacae* O2 (G3420)



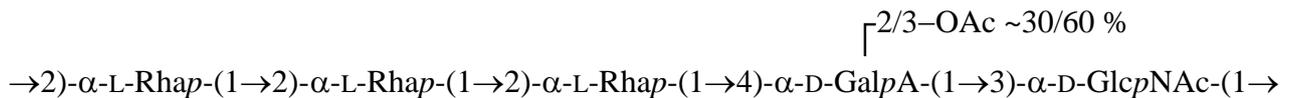
***E. cloacae* O3 (G3421)**



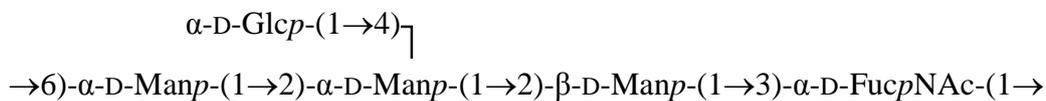
***E. cloacae* O6 (G3422)**



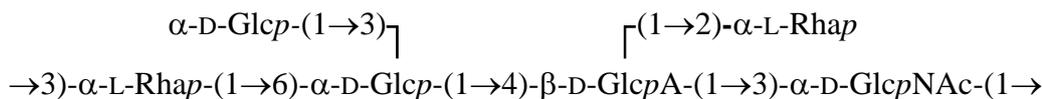
***E. cloacae* O7 (G2277)**



***E. cloacae* O11 (C2559)**



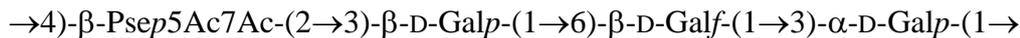
***E. cloacae* O12 (C3969)**



***E. cloacae* O13 (C4115)**



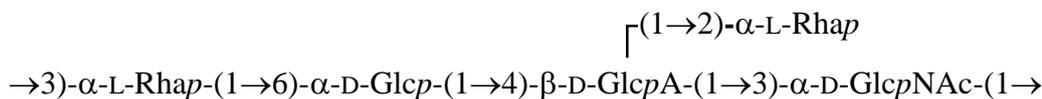
***E. cloacae* O14 (C5529)**



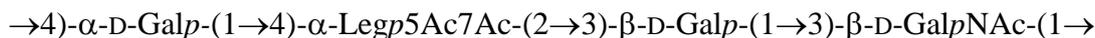
***E. cloacae* O15 (C4233)**



***E. cloacae* O16 (C2649)**

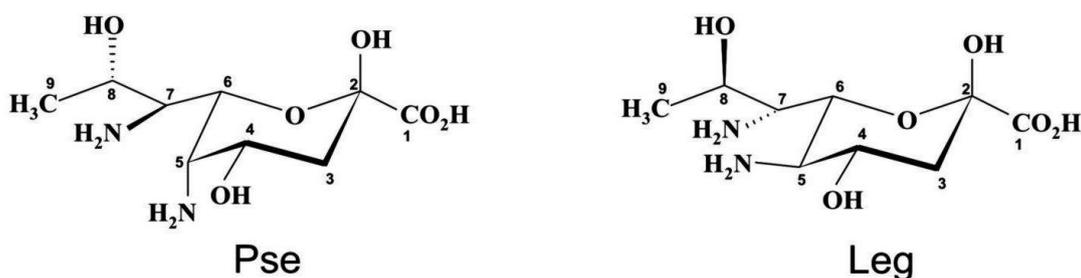


***E. cloacae* O19 (C6285)**



Типичными компонентами изученных ОПС бактерий *E. cloacae* являются широко распространенные в природе моносахариды: D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, L-рамноза (L-Rha), D-глюкуроновая кислота (D-GlcA), D-галактуриновая кислота (D-GalA), N-ацетил-D-глюкозамин (D-GlcNAc) и N-ацетил-D-галактозамин (D-GalNAc). Были

обнаружены также 2-ацетиламино-2-дезоксид-фукоза (D-FucNAc) и изомеры 5,7-диацетиламино-3,5,7,9-тетрадезоксинон-2-улозоновых кислот, имеющие *L*-глицеро-*L*-манно-конфигурацию (псевдааминовая кислота, Pse5Ac7Ac) и *D*-глицеро-*D*-галакто-конфигурацию (легионаминовая кислота, Leg5Ac7Ac). Остаток GalA в ОПС серогруппы O7 несет *O*-ацетильную группу в положении 2 (~30 %) или 3 (~60 %), а в ОПС серогруппы O2 остаток рамнозы 2-*O*-ацетилирован на ~60 %. Последний ОПС содержит также такой неуглеводный компонент, как пировиноградную кислоту, образующую с остатком GlcNAc циклический ацеталь с (*R*)-конфигурацией ацетального атома углерода (*R*pur).



Большинство ОПС *E. cloacae* имеют уникальное строение, но для некоторых наблюдается структурное сходство с ОПС других *O*-серогрупп *E. cloacae* или других бактерий. Так, ОПС серогрупп O1 и O14 имеют одинаковые по составу основные цепи и отличаются положением замещения остатков галактозы и Pse5Ac7Ac и присутствием бокового остатка галактозы в ОПС серогруппы O1. ОПС серогрупп O10 и O11, O12 и O16 попарно имеют одинаковые основные цепи и отличаются только местом присоединения (в первой паре) или наличием или отсутствием (во второй паре) бокового остатка глюкозы. На основании столь близкого структурного сходства ОПС и перекрестных серологических реакций, наблюдаемых для этих бактерий, мы предлагаем включить каждую из этих пар штаммов в одну *O*-серогруппу в качестве подгрупп.

Кроме того, ОПС *E. cloacae* O13 имеет одинаковую по составу основную цепь с *E. cloacae* O3 и общий фрагмент из трех остатков *L*-Rha с *E. cloacae* O7. В ОПС *E. cloacae* O2 и *Shigella boydii* типа 18 присутствует общий трисахаридный фрагмент  $\beta$ -*L*-Rhap-(1→4)- $\alpha$ -*L*-Rhap-(1→2)- $\alpha$ -*L*-Rhap. *E. cloacae* O7 и *Plesiomonas shigelloides* 22074 имеют одинаковые *O*-звенья, но они соединены различными связями между остатками *D*-GlcNAc и *L*-Rha.

## 1.2. Полисахариды бактерий *Escherichia coli*

Вид *E. coli* является одним из наиболее гетерогенных в отношении *O*-антигенов – в настоящее время его штаммы разделяют на 184 *O*-серогруппы. Строение ОПС известно для большинства *O*-серогрупп (<http://nevyn.organ.su.se/ECODAB/>). В настоящей работе нами установлено строение ОПС семи ранее неисследованных *O*-серогрупп.



в одну O-серогруппу в качестве двух подгрупп. Отметим, что ОПС *E. coli* O169 имеет сходное строение с ОПС *E. coli* O183 и *Shigella boydii* типов 6 и 10, которые отличаются от него отсутствием бокового остатка D-глюкозы, а идентичные друг другу по структуре ОПС *E. coli* O183 и *S. boydii* типа 10 также присутствием остатка D-рибозы (см. рис. 2 на стр. 8).

## 2. Характеристика генных кластеров O-антигенов *Enterobacter cloacae* и *Escherichia coli*

Эта часть работы выполнена совместно с китайскими партнерами – генетиками из Нанькайского университета (Тяньцзинь, КНР).

Биоинформатический анализ проводили путем сравнения аминокислотных последовательностей, кодируемых в секвенированных генных кластерах O-антигенов *E. cloacae* и *E. coli*, которые находятся на хромосоме между консервативными генами *galF* и *gnd*, с последовательностями в доступных базах данных, в том числе с белками с известными функциями, с учетом полученных данных о строении ОПС. В результате показано соответствие установленных структур ОПС составу генных кластеров O-антигенов изученных бактерий и определены функции генов биосинтеза ОПС каждого штамма, включая:

а) гены биосинтеза нуклеотид-активированных предшественников специфических моносахаридных компонентов ОПС (маннозы, 6-дезоксигексоз, производных 6-дезоксигексозаминов, нонулозоновых кислот);

б) гены гликозилтрансфераз для последовательного переноса моносахаридов на стадии сборки O-звена на липидном носителе на цитоплазматической стороне внутренней мембраны;

в) гены процессинга O-антигена: флиппазы *wzx* для переноса O-звена через внутреннюю мембрану и O-антиген-полимеразы *wzy* для его полимеризации на периплазматической стороне мембраны (например, рис. 1).

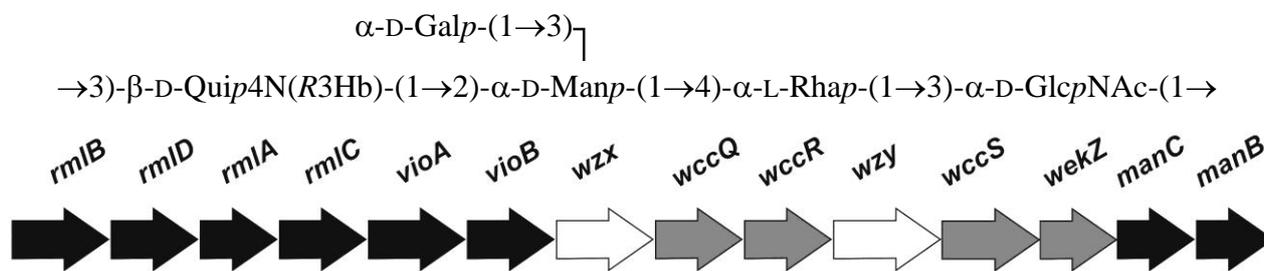


Рис. 1. Структура ОПС и генный состав и организация генного кластера O-антигена *E. coli* O39. Гены, кодирующие ферменты биосинтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов (показаны черным): L-Rha – *rmlB,D,A,C*, D-Quip4N(R3Hb) – *vioA,B*, D-Man – *manB,C*; гены гликозилтрансфераз для сборки пентасахаридного O-звена (показаны серым): *wccQ,R,S* и *wekZ*; гены процессинга: ген флиппазы *wzx* и ген O-антиген-полимеразы *wzy* (показаны белым).



### 3. Структурный анализ полисахаридов

Для установления строения ОПС применялись химические методы анализа, включая определение состава методом ГЖХ и избирательное расщепление гликозидных связей, в сочетании с одномерной и двумерной спектроскопией ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ .

#### 3.1. Выделение и деградация липополисахаридов

Липополисахариды выделяли из бактериальных клеток экстракцией горячим водным фенолом по модифицированному методу Вестфаля, после диализа сопутствующие белки и нуклеиновые кислоты отделяли осаждением трихлоруксусной кислотой.

Для структурного анализа ОПС липополисахариды расщепляли на углеводную и липидную компоненты мягким кислотным гидролизом 2% уксусной кислотой при 100 °С до выпадения осадка липида (1,5-3 ч), который отделяли центрифугированием. ОПС выделяли из супернатанта гель-хроматографией на носителе Sephadex G-50 Superfine. Ацеталь пировиноградной кислоты частично (100 °С, 3 ч) или полностью (105 °С, 6 ч) расщеплялся при деградации 2% уксусной кислотой. Присутствие нонулозоновых кислот Pse и Leg не позволяло выделять ОПС, так как их гликозидные связи расщеплялись в этих условиях, и из содержащих их липополисахаридов были получены олигосахаридные фрагменты ОПС (см. ниже). Для получения полисахаридов с кислотолабильными компонентами липополисахариды О-деацилировали в мягких щелочных условиях (12%  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 37 °С, 16 ч).

#### 3.2. Анализ состава и положений замещения моносахаридных остатков

Компонентный анализ ОПС заключался в установлении качественного и количественного моносахаридного состава и, в случае их присутствия, идентификации неуглеводных заместителей, таких как треонин, 3-гидроксимасляная кислота и ацеталь пировиноградной кислоты. Он также включал определение абсолютных конфигураций моносахаридов и хиральных неуглеводных компонентов.

Для выделения и последующей идентификации гексоз, 6-дезоксигексоз и аминоксахаров полисахариды гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (120 °С, 2-4 ч). Продукты гидролиза превращали в полностью ацелированные полиолы, которые идентифицировали методом ГЖХ, используя в качестве стандартных соединений производные соответствующих моносахаридов. Кислотолабильные моносахариды (Qui4N и нонулозоновые кислоты Pse и Leg) идентифицировали бездеструктивным методом с помощью спектроскопии ЯМР путем сравнения химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  ЯМР и констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\text{H,H}}$  с литературными данными.

Определение абсолютных конфигураций моносахаридов проводили методом ГЖХ в виде ацелированных гликозидов с (*S*)-2-октанолом, полученных после полного гидролиза исследуемого ОПС. В качестве стандартных соединений использовали диастереомеры ацелированных гликозидов соответствующих моносахаридов с (*S*)- и (*R*)-октанолом. Абсолютные конфигурации кислотолабильных моносахаридов устанавливали бездеструктивным путем на основании известных закономерностей, описывающих влияние соседних моносахаридов с известной конфигурацией на химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  ЯМР. Абсолютную конфигурацию хиральных неуглеводных компонентов определяли с помощью ГЖХ ацелированного эфира треонина и трифторацелированного эфира 3-гидроксимасляной кислоты с (*S*)-2-октанолом. Для циклического ацетала пировиноградной кислоты использовали известную зависимость химического сдвига сигнала ЯМР  $^{13}\text{C}$  ее метильной группы от абсолютной конфигурации этого компонента.

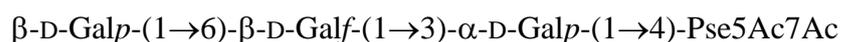
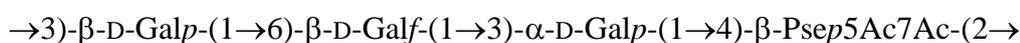
Для определения положений замещения моносахаридных остатков в ОПС *E. coli* O39 использовался метод метилирования. Он включал идентификацию с помощью ГЖХ/масс-спектрометрии частично метилированных ацетатов полиолов, полученных после кислотного гидролиза метилированного ОПС.

### 3.3. Избирательное расщепление

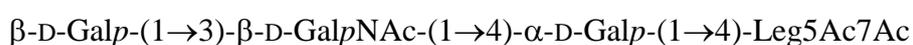
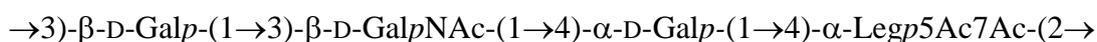
#### 3.3.1. Мягкий кислотный гидролиз

Как уже отмечалось, при деградации липополисахаридов 2% уксусной кислотой ОПС, содержащие нонулозоновые кислоты – производные Pse и Leg, расщеплялись по высоколабильным кетозидным связям этих моносахаридов, давая олигосахариды с нонулозоновыми кислотами на восстанавливающем конце, которые соответствовали O-звеньям ОПС.

#### *E. cloacae* O14



#### *E. cloacae* O19



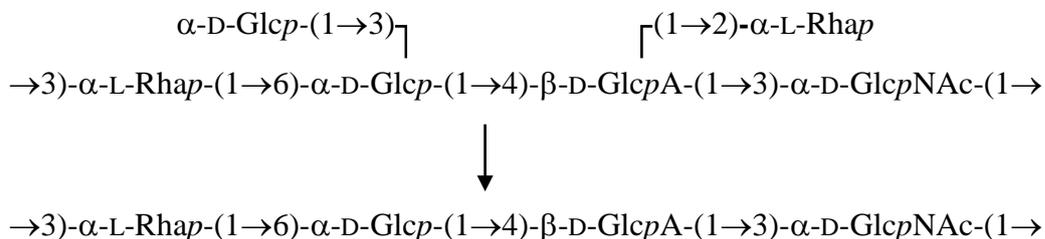
\* \* \*

В работе использовались еще два метода избирательного расщепления гликозидных связей: распад по Смитсу и сольволиз трифторуксусной кислотой – реагентом, предложенным для этой цели в настоящей работе. Оба метода применялись для упрощения структуры ОПС путем отщепления боковых моносахаридных остатков или для получения олигосахаридных фрагментов ОПС. Олигосахариды с выходами 16-37% выделяли с помощью гель-хроматографии и анализировали с помощью спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии.

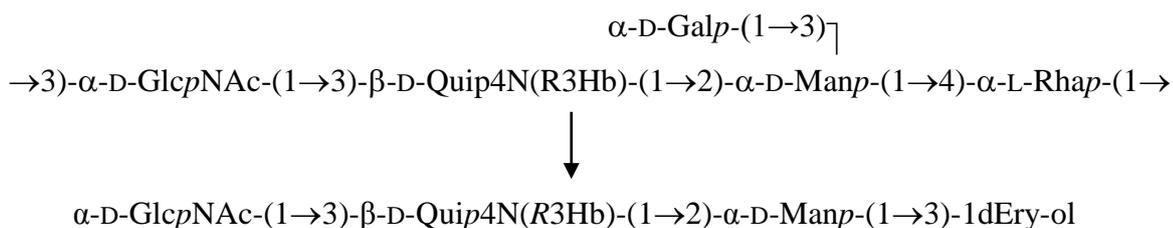
### 3.3.2. Распад по Смитсу

Этот специфический метод избирательного расщепления включает периодатное окисление ОПС по свободным vicинальным гидроксильным группам моносахаридов с последующим боргидридным восстановлением образующихся альдегидных групп и мягким кислотным гидролизом по местам расщепившихся моносахаридов.

Распад по Смитсу ОПС *E. cloacae* O12 с разветвленным гексасахаридным O-звеном привел к отщеплению терминальных остатков двух боковых цепей и образованию модифицированного полисахарида с линейным тетрасахаридным повторяющимся звеном. При этом резервный глюкан, экстрагировавшийся вместе с ОПС, полностью расщепился, что также существенно облегчило последующий анализ с помощью спектроскопии ЯМР.



Аналогичным образом при исследовании ОПС *E. coli* O39 удалось освободиться от сопутствующего резервного маннана. В ОПС деградации подверглись моносахаридный остаток, находящийся в боковой цепи, и один из остатков в основной цепи. В результате был получен олигосахарид с 1-дезоксиритритом (1dEry-ol) в качестве агликона, который образовался из окисленного остатка рамнозы.

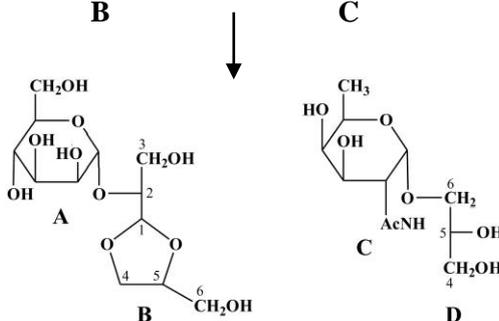


При распаде по Смитту ОПС *E. cloacae* O11 образовались два олигосахарида из фрагментов **A**→**B** и **C**→**D** основной цепи. При этом если второй имеет ожидаемый агликон – глицерин, образовавшийся из 6-замещенного остатка маннозы **D**, то в первом агликон является продуктом переацеталирования в расщепившемся 2-замещенном остатке маннозы **B**.

**E**  $\alpha$ -D-Glcp-(1→4)┘

→2)- $\alpha$ -D-Manp-(1→2)- $\beta$ -D-Manp-(1→3)- $\alpha$ -D-FucpNAc-(1→6)- $\alpha$ -D-Manp-(1→

**A** **B** **C** **D**



Распад по Смитту разветвленного ОПС *E. coli* O43 привел к линейному полисахариду в результате окисления и последующего отщепления бокового остатка фукозы.

$\alpha$ -L-Fucp-(1→3)┘

→4)- $\beta$ -D-Manp2Ac-(1→3)- $\alpha$ -D-Manp-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→3)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1→



→4)- $\beta$ -D-Manp-(1→3)- $\alpha$ -D-Manp-(1→3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1→3)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1→

В ОПС *E. coli* O80 расщепились оба боковых остатка фукозы и остаток глюкозы в основной цепи с образованием олигосахарида с глицерином в качестве агликона.

$\alpha$ -L-Fucp-(1→4)┘     $\alpha$ -L-Fucp-(1→2)┘

→3)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1→4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1→3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→6)- $\beta$ -D-Glcp-(1→



$\beta$ -D-GalpNAc-(1→4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1→3)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)-Gro

В ОПС *E. coli* O169 расщепилось большинство гликозидных связей, и образовался олигосахарид, включающий только остатки, которые были замещены в ОПС в положение 3.

$\beta$ -D-Glcp-(1→6)┘

→3)- $\beta$ -D-GalpNAc-(1→3)- $\alpha$ -D-Galp-(1→6)- $\alpha$ -D-Manp-(1→2)- $\alpha$ -D-Manp-(1→

$\beta$ -D-GlcpA-(1→4)┘



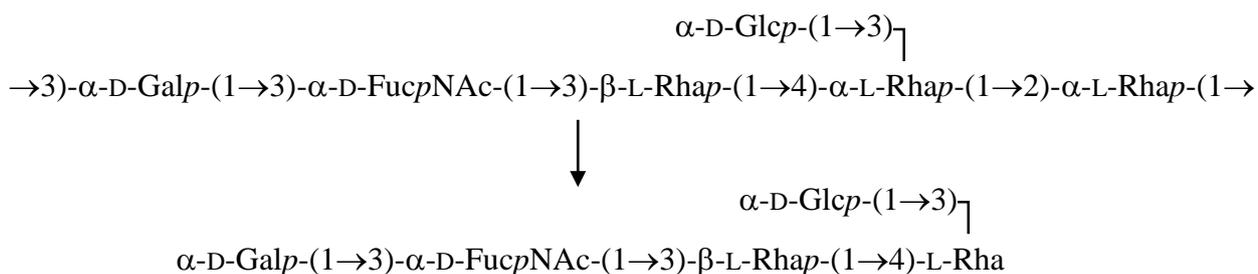
$\beta$ -D-GalpNAc-(1→3)- $\alpha$ -D-Galp-(1→2)-Ery-ol

### 3.3.3. Селективный сольволиз трифторуксусной кислотой

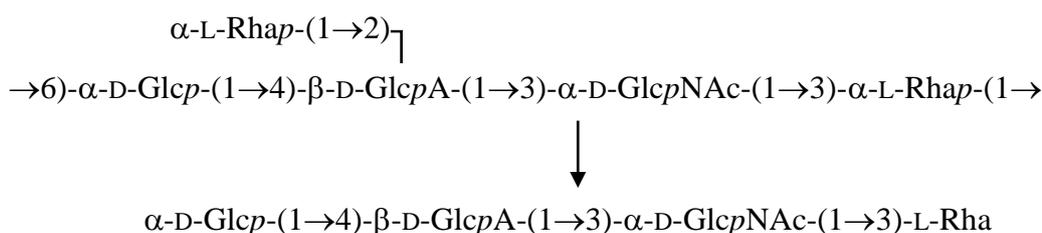
Избирательность сольволитического расщепления гетерополисахаридов основана на том, что гликозидные связи различных моносахаридов отличаются по своей устойчивости. В настоящей работе удовлетворительная избирательность достигалась, когда сольволиз безводной  $CF_3CO_2H$  проводился при 40 или 50 °С в течение 4-7 часов. Водная обработка продуктов после удаления кислоты в токе воздуха приводила к свободным олигосахаридам, которые в некоторых случаях для удобства последующего ЯМР-спектроскопического анализа превращали боргидридным восстановлением в соответствующие олигозилполиолы.

Было найдено, что наиболее легко расщепляются  $\alpha$ -рамнопиранозидные связи, образуя олигосахариды с остатком рамнозы на восстанавливающем конце (из ОПС *E. cloacae* O3, *E. cloacae* O16 и *E. coli* O39) или модифицированный полисахарид, лишенный боковых остатков рамнозы (из ОПС *E. coli* O68). Примечательно, что  $\beta$ -рамнозидные связи в ОПС *E. cloacae* O3 в этих условиях не расщеплялись.

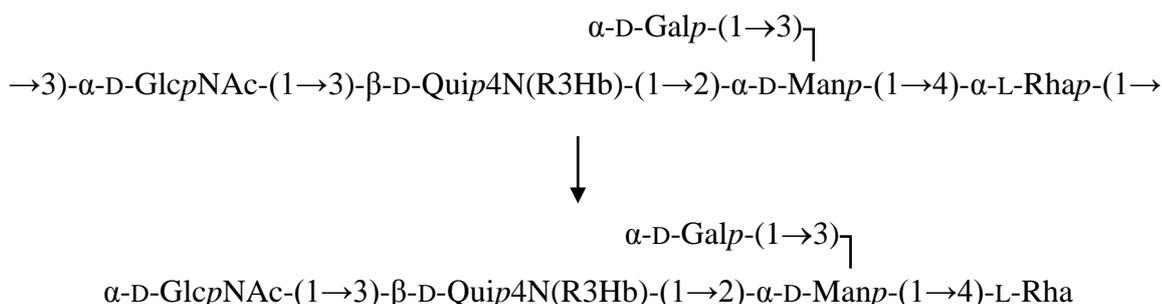
#### *E. cloacae* O3



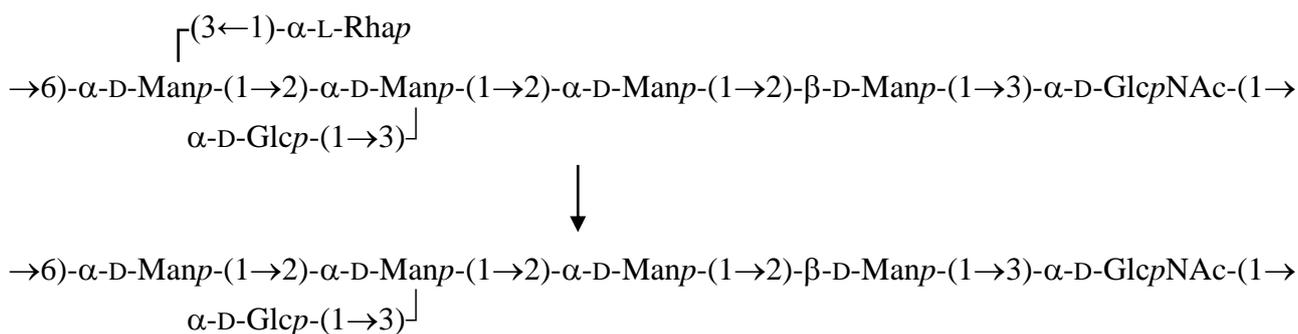
#### *E. cloacae* O16



#### *E. coli* O39

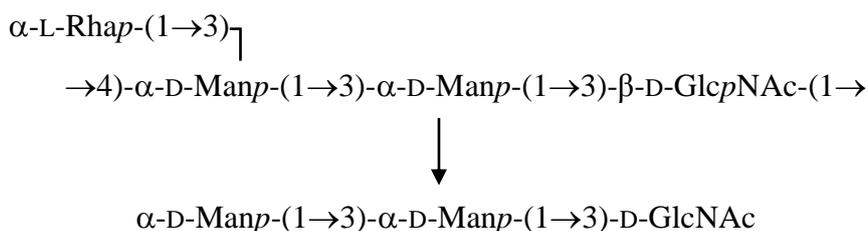


### *E. coli* O68

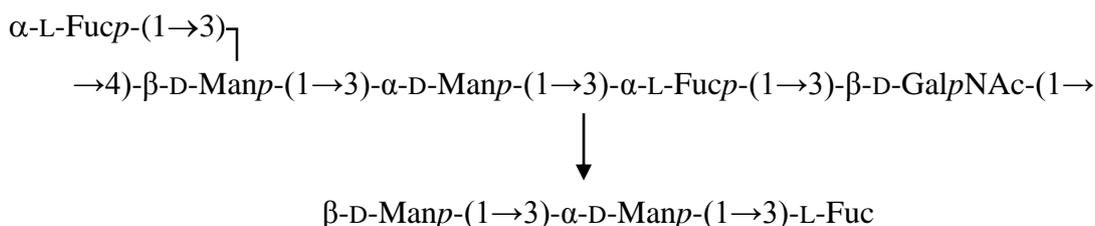


В ОПС *E. cloacae* O6, *E. coli* O43 и *E. coli* O80, кроме  $\alpha$ -рамнозидных и  $\alpha$ -фукозидных связей, расщеплялись также гликозные связи остатков  $\beta$ -D-GlcpNAc и  $\beta$ -D-GalpNAc, в результате чего были получены олигосахариды с N-ацетилгексозаминами на восстанавливающем конце (из ОПС *E. coli* O43 образовался олигосахарид с остатком фукозы на восстанавливающем конце). Интересно, что ОПС *E. coli* O80 расщеплялся легче других полисахаридов, и его дисахаридные фрагменты были получены уже за 1 час при 40 °С.

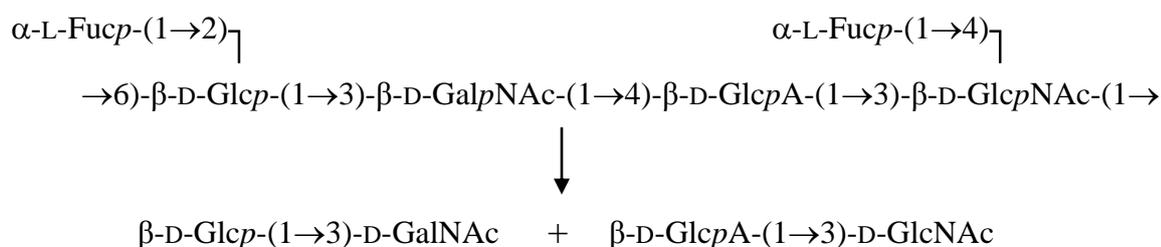
### *E. cloacae* O6



### *E. coli* O43



### *E. coli* O80



Таким образом,  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  является высокоселективным реагентом для сольволитического расщепления гликозидных связей. Наименее устойчивыми к

расщеплению являются 6-дезоксид- $\alpha$ -гексопиранозидные ( $\alpha$ -Rhap,  $\alpha$ -Fucp) и 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\beta$ -гексопиранозидные ( $\beta$ -Glc<sub>p</sub>NAc,  $\beta$ -Gal<sub>p</sub>NAc) связи, в то время как гликозидные связи гексопираноз, 2-ацетамидо-2-дезоксид- и 2-ацетамидо-2,6-дидезоксид- $\alpha$ -гексопираноз и гексуриновых кислот сохраняются при температуре 50 °C и ниже.

### 3.4. Спектроскопия ЯМР

ЯМР-спектроскопический анализ для получения структурной информации об ОПС и полученных олигосахаридных фрагментах ОПС проводился на спектрометре с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Он включал следующие этапы:

а) получение информации о регулярности ОПС, размере О-звена, природе моносахаридов и неуглеводных заместителей на основании числа и положения сигналов  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  при первичном анализе спектров ЯМР. В случае замаскированной регулярности присутствующие в нестехиометрических количествах О-ацетильные группы удаляли мягкой щелочной обработкой и проводили сравнение спектров ЯМР исходного и О-деацетилированного полисахаридов (рис. 3);

б) отнесение сигналов в спектрах ЯМР с использованием двумерных экспериментов, коррелирующих химические сдвиги протонов с протонами (COSY – COrrelation SpectroscopY, TOCSY – TOtal Correlation SpectroscopY) и протонов с атомами углерода (HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Coherence, рис. 4);

в) установление стереохимии, размеров циклов моносахаридов и конфигураций гликозидных связей на основании констант спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов и характерных химических сдвигов  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР;

г) определение положения гликозилирования моносахаридов и мест присоединения О-заместителей (О-ацетильных групп, ацетата пировиноградной кислоты) по характерным смещениям сигналов  $^{13}\text{C}$  ЯМР (эффектам замещения, рис. 3);

д) определение положения N-заместителей аминсахаров по корреляциям NH-протонов с CH-протонами в двумерных экспериментах TOCSY и ROESY (рис. 5) при съемке спектров в смеси  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), что позволяет детектировать NH-протоны;

е) установление последовательности моносахаридов в О-звене на основании корреляций в двумерном эксперименте ROESY между пространственно сближенными протонами соседних моносахаридных остатков;

ж) независимое установление положений замещения моносахаридных остатков и их последовательности на основании корреляций в двумерном спектре  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC аномерных протонов и аномерных атомов углерода с атомами соседних моносахаридов (рис. 6).

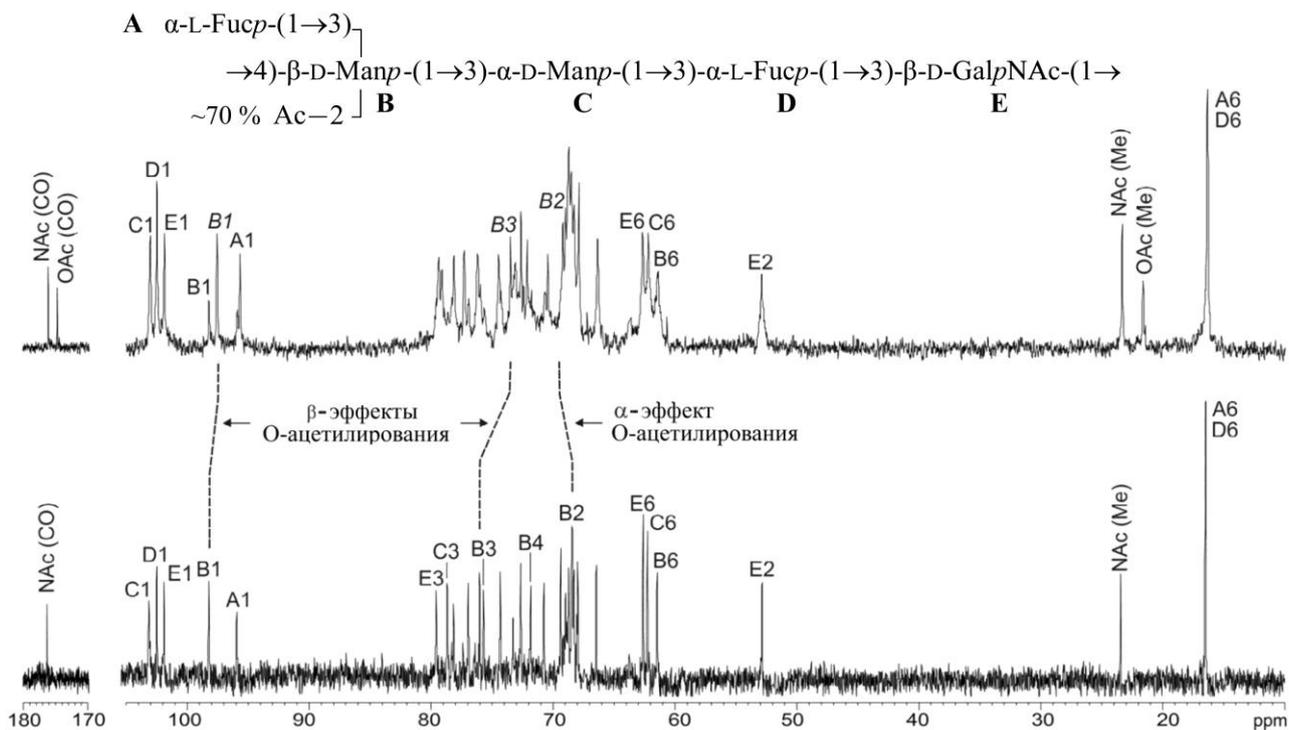


Рис. 3. Структура и спектры  $^{13}\text{C}$  ЯМР исходного (вверху) и O-деацетилированного (внизу) полисахаридов из *E. coli* O43.

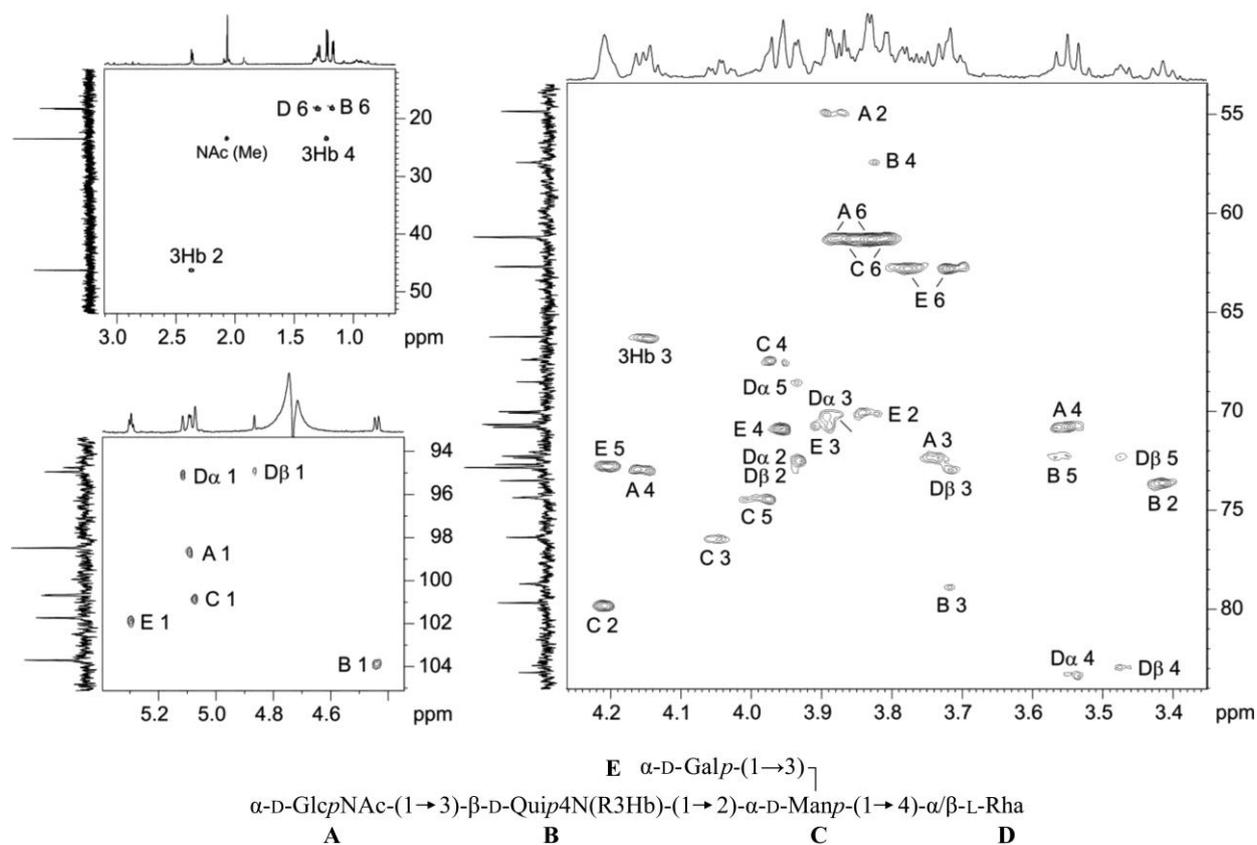


Рис. 4. Фрагменты двумерного спектра  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC и структура олигосахарида из ОПС *E. coli* O39. Соответствующие части спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей, соответственно.

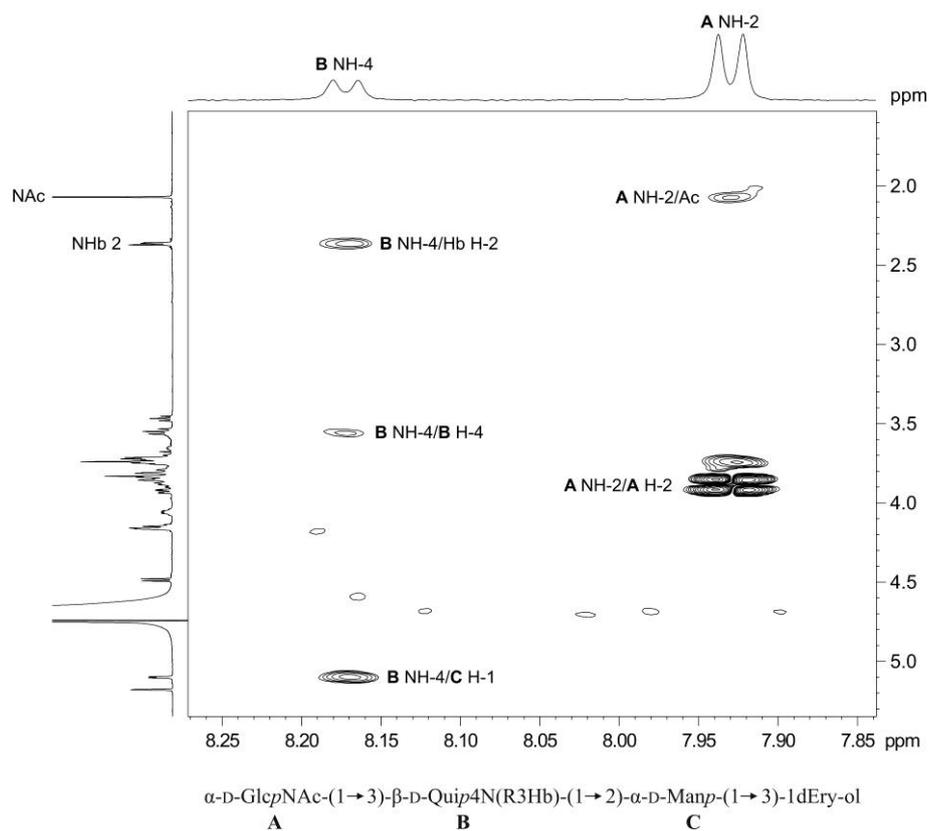


Рис. 5. Фрагмент двумерного спектра  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY и структура олигосахарида из ОПС *E. coli* O39. Соответствующие части спектра  $^1\text{H}$  ЯМР показаны вдоль осей. Наблюдаются корреляции NH-протонов моносахаридов с CH-протонами соответствующих N-ацильных заместителей: NH-2 GlcN с N-ацетильной группой (Ac) и NH-4 Qui4N с H-2 3-гидроксибутаноильной группы (Hb).

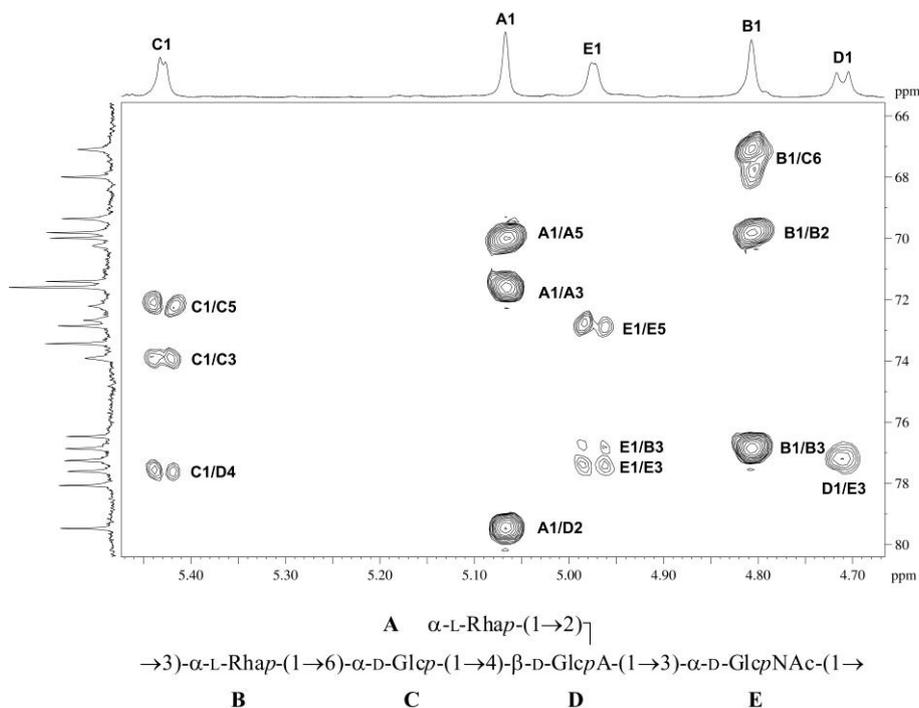


Рис. 6. Фрагмент двумерного спектра  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMQC и структура ОПС *E. cloacae* O16. Соответствующие части спектров  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей, соответственно.

### 3.5. Масс-спектрометрия

Для подтверждения строения олигосахаридов, полученных избирательным расщеплением ОПС, проводили определение их молекулярной массы с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением. Для олигосахаридов, содержащих кислотные компоненты (гексурановые и нонулозоновые кислоты), регистрировали отрицательные ионы, для нейтральных олигосахаридов – отрицательные или положительные ионы (например, рис. 7).

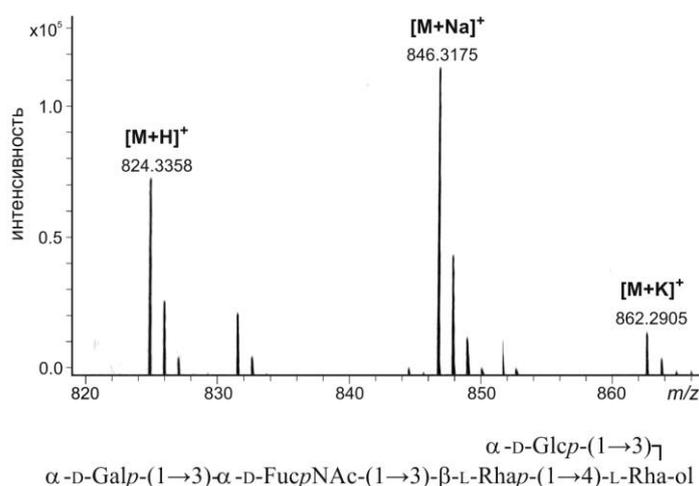


Рис. 7. Масс-спектр высокого разрешения с ионизацией электрораспылением при регистрации положительных ионов и структура олигосахида из ОПС *E. cloacae* O3. Рассчитанная молекулярная масса  $M = 823,3321$  Да.

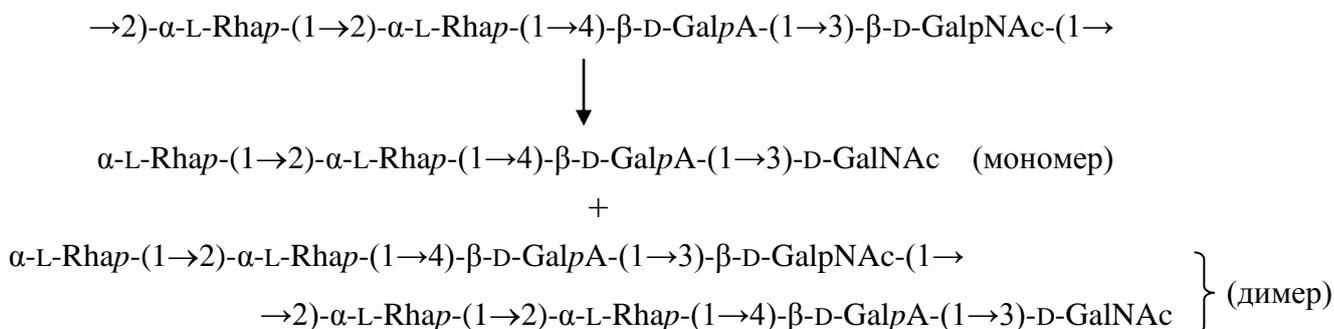
### 4. Применение сольволиза трифторуксусной кислотой для получения олигосахаридных фрагментов ОПС *Shigella flexneri*

Сольволиз  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  был использован для получения олигосахаридных фрагментов ОПС *S. flexneri* типов Y, 2a, 3a и 6 как потенциальных компонентов антидизентерийных конъюгатных вакцин. Из них типы 2a, 3a и 6 являются наиболее широко распространенными возбудителями шигеллеза (бациллярной дизентерии). Структуры ОПС всех четырех типов были установлены ранее. ОПС типов Y, 2a и 3a содержат остатки  $\alpha$ -L-Rhap и  $\beta$ -D-GlcpNAc, а ОПС *S. flexneri* типа 6 построен из остатков  $\alpha$ -L-Rhap,  $\beta$ -D-GalpNAc и  $\beta$ -D-GalpA.

ОПС подвергали сольволизу  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  в течение 1 часа при 40 °C, продукты разделяли с помощью гель-хроматографии и изучали методами спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением и регистрацией отрицательных ионов. Установление строения продуктов из ОПС *S. flexneri* типа 2a затруднялось нестехиометрическим O-ацетилированием, характерным для этого ОПС, и поэтому для упрощения анализа O-ацетильные группы были предварительно удалены.

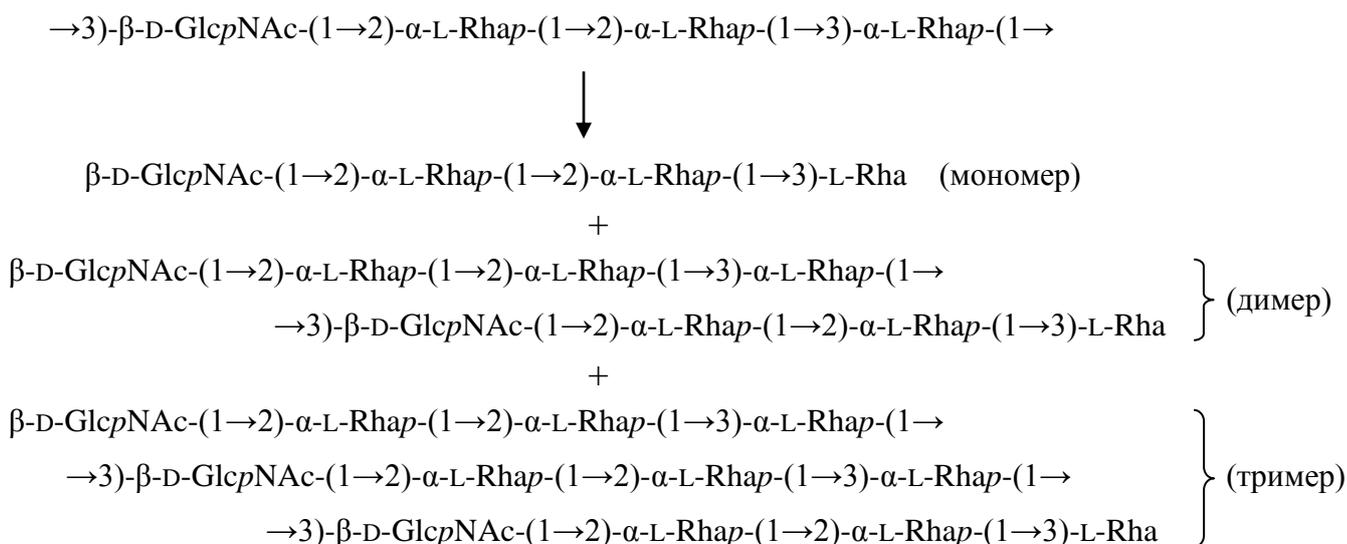
В кислом ОПС *S. flexneri* типа 6 наименее стабильной оказалась связь  $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 2)-L-Rhap, которая избирательно (~80%) расщепилась с образованием приблизительно равных количеств тетрасахарида и октасахаридов, соответствующих мономеру и димеру О-звена, а также небольшого количества (~15%) тримера.

### *S. flexneri* 6

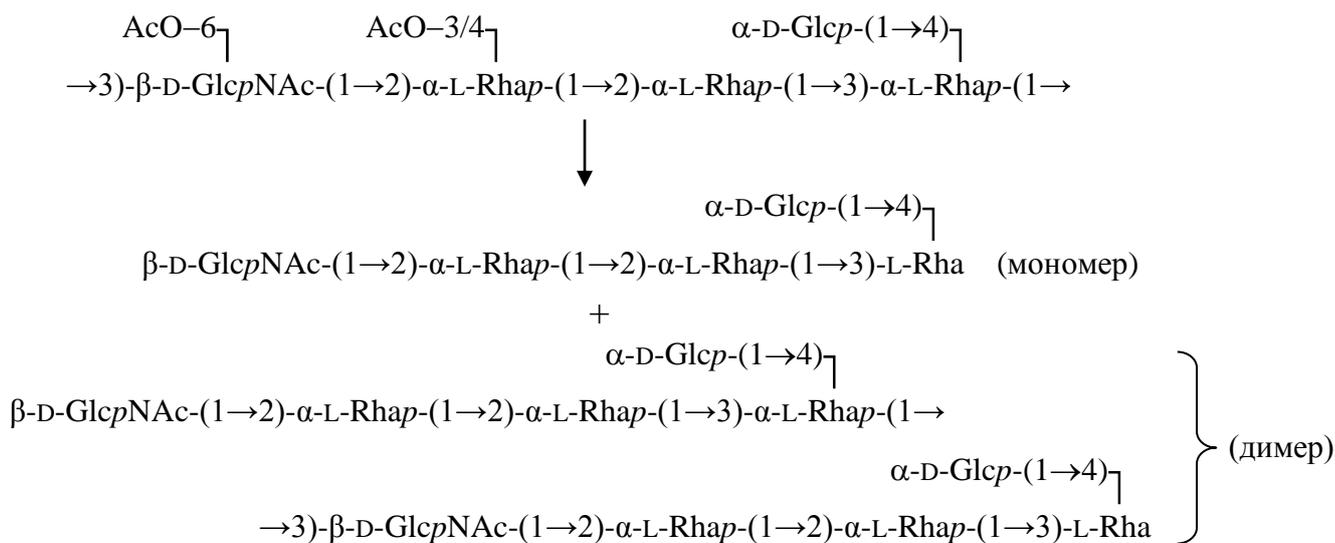


Напротив, в нейтральных ОПС *S. flexneri* типов Y и 2a гликозидная связь  $\beta$ -D-GlcpNAc оказалась более устойчивой, чем  $\alpha$ -рамнозидная, и расщеплению подверглась связь  $\alpha$ -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcpNAc с селективностью 75-80%. В результате были получены три фракции: мономер, димер и тример О-звена (тетрасахарид, октасахарид и додекасахарид в соотношении ~1:1:2 из типа Y, пентасахарид, декасахарид и пентадекасахарид в соотношении ~3:1,5:1 из типа 2a, соответственно). То, что основным продуктом из ОПС типа 2a оказался мономер, а из ОПС типа Y – тример, очевидно связано с гликозилированием остатка Rha с наиболее лабильной гликозидной связью в ОПС типа 2a.

### *S. flexneri* Y

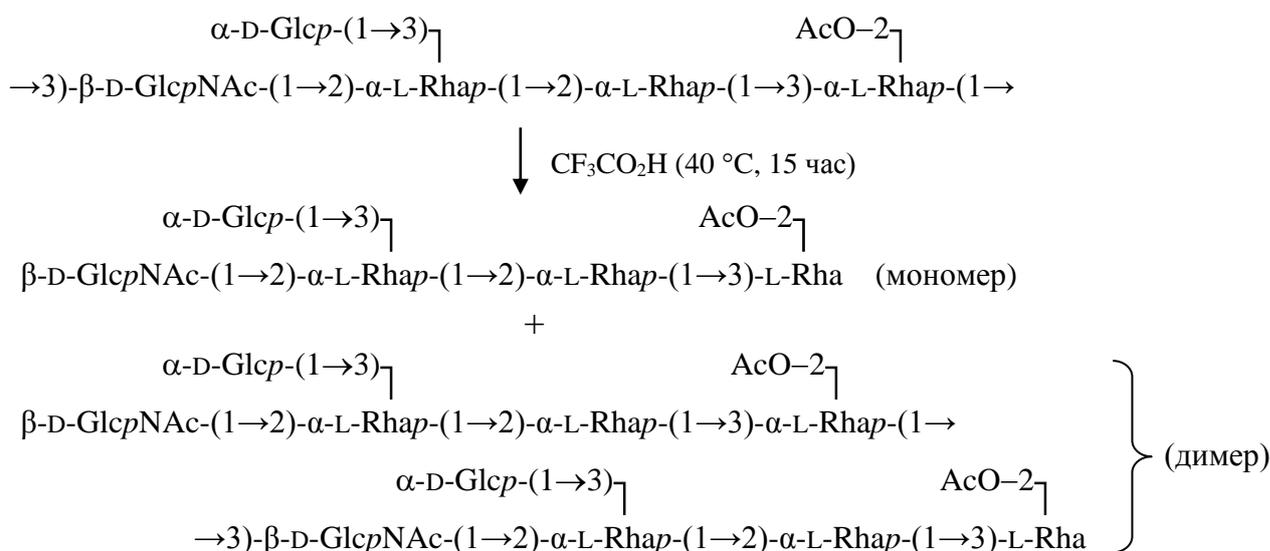


### *S. flexneri* 2a



ОПС *S. flexneri* типа 3a оказался более устойчивым к сольволизу. Так, через 3 часа образовалась смесь высших олигосахаридов, наименьшим из которых был тример О-звена. Смесь мономера и димера в соотношении ~1:3 удалось получить только при более продолжительной обработке (15 часов при 40 °С), однако селективность была низкой (~30%), и произошло частичное дезацетилирование (~30%). Более высокая стабильность ОПС типа 3a, по-видимому, объясняется О-ацетилированием того же остатка Rha в положение 2, стабилизирующим гликозидную связь этого моносахарида.

### *S. flexneri* 3a



Таким образом, сольволиз  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  является удобным высокоселективным способом получения димеров и тримеров из ОПС *S. flexneri* типов Y, 2a и 6 или тримера и более высоких олигосахаридов из типа 3a. При необходимости в более мягких условиях (20 или 30 °С) могут быть получены олигосахариды и больших размеров. Существенным является

то, что сольволиз в течение короткого времени не затрагивает О-ацетильные группы, с которыми часто связаны специфические иммунодетерминанты О-антигенов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа является частью структурно-генетического исследования О-специфических полисахаридов (О-антигенов) энтеробактерий: *Enterobacter cloacae* и *Escherichia coli*, проводимого совместно химиками ИОХ РАН и китайскими генетиками. Его основная цель – создание химической и генетической основы для классификации этих микроорганизмов. В работе установлено строение ОПС представителей ранее неизученных О-серогрупп, включая 12 штаммов *E. cloacae* и 7 штаммов *E. coli*, и проведена аннотация генов в генных кластерах биосинтеза их О-антигенов.

Полученные данные подтвердили обоснованность включения большинства исследованных штаммов в отдельные О-серогруппы. В то же время они показали, что положение в классификационной схеме штаммов ряда О-серогрупп *E. cloacae* и *E. coli* должно быть пересмотрено на основании выявленного сходства структур ОПС в сочетании с данными нового серологического исследования, проведенного китайскими партнерами. Это а) *E. cloacae* O1 и O14, ОПС которых отличаются наличием бокового остатка галактозы и положениями замещений двух моносахаридных остатков в основной цепи, б) *E. cloacae* O10 и O11 с ОПС, отличающимися только положением бокового остатка глюкозы, в) *E. cloacae* O12 и O16, ОПС которых отличаются только наличием или отсутствием бокового остатка глюкозы, соответственно, и г) *E. coli* O46 и O134 с единственным отличием между ОПС, заключающимся в нестехиометрическом О-ацетилировании L-треонина и остатка GalNAc у *E. coli* O46. Каждую из этих четырех пар бактерий предложено объединить в одну О-серогруппу в качестве подгрупп.

Проведенное структурное исследование ОПС позволило определить функции генов биосинтеза О-антигенов путем сравнения с предсказанными аминокислотными последовательностями, представленными в доступной базе данных GenBank, с использованием онлайн программы BLAST и с учетом полученных данных о строении ОПС. Анализ, проведенный совместно с китайскими партнерами, выявил присутствие в кластерах всех генов, необходимых для биосинтеза изученных ОПС, в том числе генов, кодирующих ферменты путей синтеза специфических компонентов ОПС (нонулозоновых кислот, б-дезоксигексоз, их ациламинопроизводных и других) и необходимого числа трансфераз для сборки О-звеньев и присоединения неуглеводных заместителей. В то же время у некоторых бактерий гены трансфераз, ответственных за присоединение боковых моносахаридных остатков и за О-ацетилирование ОПС, в ГКО отсутствуют и, очевидно, находятся в другом

месте генома, вероятнее всего в профагах. Полученные данные могут быть использованы для разработки методов молекулярного типирования клинических и природных изолятов энтеробактерий и экспресс-диагностики вызываемых ими инфекционных заболеваний с использованием в качестве мишеней специфических генов биосинтеза O-антигенов.

Важную роль в структурном анализе ОПС в данном исследовании играла одномерная и двумерная спектроскопия ЯМР на протонах и ядрах  $^{13}\text{C}$ . Однако в некоторых случаях бездеструктивный анализ этим методом осложнялся недостаточной разрешенностью спектров полисахаридов и/или множественными совпадениями сигналов, что не позволяло надежно установить строение ОПС. Для преодоления этой трудности проводилось избирательное расщепление полисахаридов с последующей идентификацией образующихся олигосахаридных фрагментов. Их спектры ЯМР были существенно лучше разрешены, чем спектры ОПС, и для их анализа могла быть использована масс-спектрометрия.

Для избирательного расщепления ОПС в настоящей работе применялся как традиционный метод – распад по Смитсу, так и предложенный нами сольволиз трифторуксусной кислотой. Как и реагенты, использовавшиеся для сольволиза ранее – безводный фтористый водород и трифторметансульфокислота,  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  не вызывает деструкции сахаров и не затрагивает амидные связи, что делает ее пригодной для выделения олигосахаридов, содержащих N-ацелированные аminosахара и амиды уроновых кислот. Кроме того, она лишена недостатков, затрудняющих работу с другими реагентами. Так,  $\text{HF}$  отличается высокой летучестью (т. кип.  $\sim 20^\circ\text{C}$ ),  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$  имеет высокую стоимость, и оба являются очень ядовитыми соединениями. За исключением случаев присутствия нонулозоновых кислот с кислотолabileными гликозидными связями, сольволиз  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  обладает большей селективностью, чем частичный кислотный гидролиз.

Применение сольволиза к различным ОПС выявило определенные закономерности в устойчивости гликозидных связей различных моносахаридов к расщеплению. Наиболее лабильными оказались связи б-дезоксид- $\alpha$ -гексопираноз и 2-ацетамидо-2,6-дидезоксид- $\beta$ -гексопираноз, в то время как связи гексопираноз, гексуриновых кислот, 2-ацетамидо-2-дезоксид- и 2-ацетамидо-2,6-дидезоксид- $\alpha$ -гексопираноз в выбранных условиях реакции стабильны. Таким образом,  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  является значительно более мягким реагентом, чем  $\text{HF}$  и  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ , которые расщепляют также  $\alpha$ - и  $\beta$ -гексопиранозидные и 2-ацетамидо-2,6-дидезоксид- $\alpha$ -гексопиранозидные связи, а в некоторых случаях также связи гексуриновых кислот и 2-ацетамидо-2-дезоксид- $\alpha$ -гексопираноз даже при более низких температурах. Сольволиз  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ , возможно в сочетании с сольволизом  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ , дает широкие возможности для избирательного расщепления гликозидных связей и может быть

использован в структурном анализе различных сложных природных углеводов.

Кроме целей структурного анализа полисахаридов, сольволиз  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$  был использован для получения олигосахаридных фрагментов (мономеров и олигомеров О-звеньев) ОПС энтеробактерий *Shigella flexneri*. При этом выяснилось, что направление и легкость протекания реакции могут зависеть от химического окружения, в частности от присутствия или отсутствия гексуроновой кислоты в составе ОПС и от наличия боковых гликозильных заместителей и О-ацетильных групп. Бактерии *S. flexneri* являются возбудителями шигеллеза (бациллярной дизентерии), и полученные олигосахариды могут быть использованы для получения конъюгатных вакцин, необходимых для эффективной профилактики этого заболевания. Аналогичный подход может быть использован для выделения олигосахаридных фрагментов полисахаридных антигенов других патогенных бактерий в качестве потенциальных компонентов средств вакцинопрофилактики.

## ВЫВОДЫ

1. Установлены новые структуры О-специфических полисахаридов важных в медицинском отношении бактерий: 12 О-серогрупп энтеробактера клоаки (*Enterobacter cloacae*) и 7 О-серогрупп кишечной палочки (*Escherichia coli*). Полученные данные вносят существенный вклад в создание химической основы для классификации штаммов этих энтеробактерий, необходимой для серодиагностики и эпидемиологического мониторинга.

2. Для большинства исследованных штаммов подтверждена обоснованность их включения в отдельные О-серогруппы. В то же время на основании выявленного близкого структурного родства О-специфических полисахаридов и серологических данных предложено объединить каждую из пар бактерий *E. cloacae* O1 и O14, O10 и O11, O12 и O16 и *E. coli* O46 и O134 в одну О-серогруппу в качестве подгрупп.

3. С помощью биоинформатического анализа показано соответствие установленных структур О-специфических полисахаридов генному составу генных кластеров О-антигенов и предсказаны функции генов биосинтеза О-специфического полисахарида каждого штамма.

4. Расширен арсенал методов избирательного расщепления углеводов: для получения олигосахаридных фрагментов полисахаридов предложен сольволиз трифторуксусной кислотой, позволяющий с высокой избирательностью расщеплять гликозидные связи 6-дезоксид- $\alpha$ -гексопираноз и N-ацетил- $\beta$ -гексозаминов.

5. С помощью сольволиза трифторуксусной кислотой получены олигосахаридные фрагменты О-специфических полисахаридов *Shigella flexneri* типов Y, 2a, 3a и 6, которые могут быть использованы как компоненты противодизентерийных конъюгатных вакцин.

## Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

### Статьи

1. Perepelov A.V., Wang M., **Filatov A.V.**, Guo X., Shashkov A.S., Wang L., Knirel Y.A. Structural and genetic studies of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* G2277 // *Carbohydr. Res.* 2014, 387, 10-13.
2. Perepelov A.V., **Filatov A.V.**, Wang Q., Lvov V.L., Qian Y., Shashkov A.S., Wang L., Knirel Y.A. Structure elucidation and gene cluster annotation of the O-antigen of *Escherichia coli* O39; application of anhydrous trifluoroacetic acid for selective cleavage of glycosidic linkages // *Carbohydr. Res.* 2014, 388, 30-36.
3. **Filatov A.V.**, Wang M., Wang W., Perepelov A.V., Shashkov A.S., Wang L., Knirel Y.A. Structure and genetics of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* C6285 containing di-N-acetyllegionaminic acid // *Carbohydr. Res.* 2014, 392, 21-24.
4. Jiang L., Perepelov A.V., **Filatov A.V.**, Liu B., Shashkov A.S., Senchenkova N.S., Wang L., Knirel Y.A. Structure and gene cluster of the O-antigen of *Escherichia coli* O68 // *Carbohydr. Res.* 2014, 397, 27-30.
5. Perepelov A.V., Wang M., **Filatov A.V.**, Guo X., Shashkov A.S., Wang L., Knirel Y.A. Structure and genetics of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* G3054 containing di-N-acetylpsudaminic acid // *Carbohydr. Res.* 2015, 407, 59-62.
6. Perepelov A.V., Wang Q., **Filatov A.V.**, Xia X., Shashkov A.S., Weintraub A., Widmalm G., Wang L., Knirel Y.A. Structures and gene clusters of the closely related O-antigens of *Escherichia coli* O46 and O134, both containing D-glucuronoyl-D-allothreonine // *Carbohydr. Res.* 2015, 409, 20-24. Corrigendum // *Carbohydr. Res.* 2016, 436, 54.
7. Perepelov A.V., Shashkov A.S., Guo X., **Filatov A.V.**, Weintraub A., Widmalm G., Knirel Y.A. Structure and genetics of the O-antigen of *Escherichia coli* O169 related to the O-antigen of *Shigella boydii* type 6 // *Carbohydr. Res.* 2015, 414, 46-50.
8. Perepelov A.V., Guo X., **Filatov A.V.**, Liu B., Knirel Y.A. Structure and gene cluster of the O-antigen of *Escherichia coli* O43 // *Carbohydr. Res.* 2015, 416, 32-36.
9. Perepelov A.V., **Filatov A.V.**, Wang M., Shashkov A.S., Wang L., Knirel Y.A. Structure and gene cluster of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* G3421 // *Carbohydr. Res.* 2016, 427, 55-59.
10. Senchenkova S.N., Guo X., **Filatov A.V.**, Perepelov A.V., Liu B., Shashkov A.S., Knirel Y.A. Structure elucidation and gene cluster characterization of the O-antigen of *Escherichia coli* O80 // *Carbohydr. Res.* 2016, 432, 83-87.
11. Lvov V.L., **Filatov A.V.**, Perepelov A.V., Shpirt A.M., Shashkov A.S., Chizhov A.O., Knirel Y.A. Solvolysis with trifluoroacetic acid: an efficient method for selective cleavage of polysaccharides // *Mendeleev Commun.* 2016, 26, 279-281.
12. Han R., Perepelov A.V., Wang Y., **Filatov A.V.**, Wang M., Shashkov A.S., Wang L., Knirel Y.A. Structural and genetic characterization of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* C5529 related to the O-antigen of *Enterobacter cloacae* G3054 // *Carbohydr. Res.* 2017, 443-444, 49-52.

13. Perepelov A.V., Xu G., **Filatov A.V.**, Zhang X., Shashkov A.S., Wang M., Knirel Y.A. Structural and gene cluster of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* C4115 // *Carbohydr. Res.* 2017, 448, 110-114.

#### Тезисы докладов на научных конференциях

1. **Филатов А.В.**, Перепелов А.В., Шашков А.С., Книрель Ю.А. Избирательное сольволитическое расщепление трифторуксусной кислотой полисахаридных О-антигенов бактерий по гликозидным связям рамнозы // *VI Молодежная конференция ИОХ РАН*, Москва, 16–17 апреля 2014 г, с. 306-307.
2. Senchenkova S.N., Perepelov A.V., **Filatov A.V.**, Shashkov A.S., Knirel Y.A. Selective cleavage of glycosidic linkages using solvolysis with anhydrous trifluoroacetic acid // *Molecular Complexity in Modern Chemistry*, Moscow, 13-19 September 2014, p. 235.
3. Senchenkova S.N., Perepelov A.V., **Filatov A.V.**, Shashkov A.S., Knirel Y.A. Selective cleavage of glycosidic linkages using solvolysis with anhydrous trifluoroacetic acid // *6<sup>th</sup> Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates*, Gdansk, Poland, 7-10 September 2014, p. 68.
4. **Filatov A.V.**, Perepelov A.V., Shashkov A.S., Wang M., Wang L., Knirel Y.A. Structures and genetics of the O-antigens of *Enterobacter cloacae* // *18<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium*, Moscow, 2-6 August 2015, P-038.
5. Perepelov A.V., **Filatov A.V.**, Shashkov A.S., Knirel Y.A. Anhydrous trifluoroacetic acid as a novel solvolytic reagent for selective cleavage of glycosidic linkages // *18th European Carbohydrate Symposium*, Moscow, 2-6 August 2015, P-040.
6. Шашков А.С., Перепелов А.В., **Филатов А.В.**, Книрель Ю.А., Ван М., Ван Л. Структурное исследование О-специфических полисахаридов *Enterobacter cloacae* // *III Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология»*, Владивосток, 7-12 сентября 2016 г., с. 118.
7. **Филатов А.В.**, Шашков А.С., Перепелов А.В., Книрель Ю.А., Ван М., Го С., Ван Л. Строение и генетика биосинтеза О-антигенов *Enterobacter cloacae* // *V Съезд биохимиков России*, Сочи-Дагомыс, 4-9 октября 2016 г., т. 1, с. 226.
8. Книрель Ю.А., Перепелов А.В., Сенченкова С.Н., Здоровенко Э.Л., Арбатский Н.П., Шпирт А.М., Овчинникова О.Г., **Филатов А.В.**, Науменко О.И., Шашков А.С., Го С., Лю Б., Ван Л. Структурно-генетическое исследование О-антигенов *Escherichia coli* и *Shigella flexneri* // *Научная конференция грантодержателей РФ «Фундаментальные научные исследования XXI-го века»*, Москва, 20-24 ноября 2016 г, с. 136.
9. **Филатов А.В.**, Шашков А.С., Чижов О.С., Перепелов А.В., Книрель Ю.А., Львов В.Л. Избирательное сольволитическое расщепление гликозидных связей трифторуксусной кислотой для установления строения полисахаридов и получения углеводных компонентов конъюгатных вакцин // *Научная конференция грантодержателей РФ «Фундаментальные научные исследования XXI-го века»*, Москва, 20-24 ноября 2016 г, с. 566.