

УДК 577.114.5;577.21;579.841

## УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА K32 И ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕННОГО КЛАСТЕРА KL32 *Acinetobacter baumannii* LUN5549<sup>\*,\*\*</sup>

© 2020 С.М. Кахилл<sup>1#</sup>, Н.П. Арбатский<sup>2#</sup>, А.С. Шашков<sup>2</sup>, М.М. Шнейдер<sup>3</sup>,  
А.В. Попова<sup>4,5</sup>, Р.М. Хэлл<sup>6#</sup>, Дж.Дж. Кенион<sup>1#</sup>, Ю.А. Книрель<sup>2\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Health and Biomedical Innovation, School of Biomedical Sciences,  
Faculty of Health, Queensland University of Technology, Brisbane, Australia

<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: uknirel@gmail.com

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 Москва, Россия

<sup>4</sup> Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный Московской обл., Россия

<sup>5</sup> ГИЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279 Оболенск Московской обл., Россия

<sup>6</sup> School of Life and Environmental Sciences, The University of Sydney, Sydney, Australia

Поступила в редакцию 29.10.2019

После доработки 25.11.2019

Принята к публикации 26.11.2019

Капсульный полисахарид (КПС), относящийся к типу K32, выделен из штамма *Acinetobacter baumannii* LUN5549, содержащего генный кластер биосинтеза КПС типа KL32. Структура КПС установлена с помощью углеводного анализа, деградации по Смигу, одно- и двумерной спектроскопии <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР. Найдено, что КПС типа K32 построен из разветвленных повторяющихся пентасахаридных единиц (К-звеньев), включающих два остатка β-D-GalpNAc и один остаток β-D-глюкуроновой кислоты (β-D-GlcA) в основной цепи и по одному остатку β-D-Glcp и α-D-GlcpNAc в боковой дисахаридной цепи. В соответствии со структурой КПС генный кластер KL32 включает гены UDP-D-Glc-6-дегидрогеназы (Ugd3), ответственной за синтез D-GlcA и четырех гликозилтрансфераз, образующих специфические гликозидные связи. Присутствующие в кластере гены, кодирующие ацетилтрансферазу и белок с неизвестной функцией, не участвуют в биосинтезе КПС. Ранее присутствие генного кластера KL32 обнаружено в штаммах, принадлежащих к глобальной клональной линии 2 (GC2), тогда как штамм LUN5549 принадлежит к сиквенс-типу ST354, что свидетельствует о горизонтальном генетическом переносе между этими линиями.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Acinetobacter baumannii*, капсула, К-локус, структура полисахарида, глюкуроновая кислота.

DOI: 10.31857/S0320972520020116

Капсульный полисахарид (КПС) присутствует на клеточной поверхности многих патогенных бактерий, и в том числе нозокомиальных видов *Acinetobacter baumannii*. Образуя поверхностный слой, защищающий бактерию от иммунного ответа хозяина, высыхания и выживания в других

неблагоприятных условиях внешней среды, КПС является одним из основных факторов патогенности микроорганизмов [1–4]. Он представляет собой длинную полисахаридную цепь из повторяющихся олигосахаридных единиц (К-звеньев), включающих от 2 до 6 моносахаридных остатков, соединенных различными гликозидными связями. Биосинтез и экспорт КПС *A. baumannii* контролируется соответствующими генами в К-локусе (KL) хромосомы, состав и расположение которых изменчивы [5].

К-локус включает оперон генов *wza-wzb-wzc*, ответственных за экспорт КПС, и область с генами синтеза специфического К-звена, содержащую разнонаправленные единицы транскрипции. В К-локусе находятся гены синтеза простых сахаров, инициации синтеза К-звена (*itr*), переноса углеводных остатков (*gtr*), транс-

Принятые сокращения: КПС – капсульный полисахарид; GlcA – глюкуроновая кислота; KL – К-локус.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-307, 30.12.2019.

\*\* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 2, 2020.

\*\*\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

локации ( $wzx$ ) и полимеризации ( $wzy$ ) К-звена, а также присоединения ацетильной или пируватной групп ( $atr/ptr$ ) в случае их присутствия.

Ранее была исследована организация генных кластеров KL изолятов из коллекции Трауба, которая была использована для разработки оригинальной схемы серотипирования *A. baumannii* [6, 7]. Однако эти генные кластеры изначально были описаны как кодирующие биосинтез полисахаридов (PSgc) с использованием традиционной систематической номенклатуры. В настоящее время структура многих КПС из различных изолятов установлена и показано, что их состав и конфигурация сахаров коррелирует с составом генного кластера KL [8–12]. В связи с этим аннотация генных кластеров PSgc была пересмотрена [8–14] и приведена в соответствие с более удобной и уже широко распространенной системой номенклатуры генных кластеров биосинтеза КПС *A. baumannii* [5]. В данной работе мы установили структуру КПС еще одного штамма (LUN5549) из коллекции Трауба, генный кластер которого ранее обозначался как PSgc21.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Культивирование бактерий.** Штамм *A. baumannii* LUN5549 из коллекции W.H. Traub (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität des Saarlandes, Саарленд, Германия) был любезно предоставлен профессором Peter Reeves. Бактерии культивировали в среде 2TY в течение ночи, клетки отделяли центрифугированием (10 000 g, 20 мин), промывали Na-фосфатным буфером pH 7,4, суспендировали в смеси ацетон-вода (7 : 3 v/v), осаждали и высушивали.

**Выделение капсульного полисахарида.** КПС выделяли из бактериальных клеток (1,1 г) водно-фенольной экстракцией [15]. Экстракт диализовали без разделения слоев, нерастворимые примеси отделяли центрифугированием, раствор обрабатывали 50%-ным раствором  $CCl_3COOH$  при 4 °C, осадок (белки и нуклеиновые кислоты) удаляли центрифугированием, раствор диализовали против дистиллированной воды, лиофилизовали и получили неочищенный КПС (370 мг). Очистку КПС (120 мг) проводили нагреванием в 2% AcOH (100 °C, 2 ч) с последующим отделением примесей центрифугированием и фракционированием с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке (60 × 2,5 см) с гелем Sephadex G-50 в 0,1% AcOH, используя для детектирования дифференциальный рефрактометр («Кнауер», Германия). Высокомолекулярную фракцию лиофилизовали и получали очищенный КПС (27 мг).

**Анализ моносахаридов.** Образец КПС (0,5 мг) гидролизовали 2M  $CF_3CO_2H$  (120 °C, 2 ч), моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов [16] методом ГЖХ на хроматографе Maestro (Agilent 7820, Москва, Россия) на колонке 0,32 мм × 20 м с фазой HP-5 в температурном режиме от 160 °C (1 мин) до 290 °C с градиентом 7 °C мин<sup>-1</sup>. Глюкуроновую кислоту идентифицировали с помощью углеводного анализатора Biotronik LC 2000 (Германия), используя колонку (7 × 0,4 см) с анионитом DA×8 (Durgum, США), 5 mM К-фосфатный буфер pH 3 и К-бизинхонинат для детекции.

**Деградация по Смитю.** Образец КПС (12 мг) окисляли  $NaIO_4$  (29 мг в 1,5 мл воды, 20 °C, 72 ч) в темноте, восстанавливали  $NaBH_4$  (30 мг, 24 ч, 16 °C), раствор упаривали, борную кислоту удаляли трехкратным упариванием с 10% AcOH в MeOH и продукты разделяли на колонке (108 × 1,2 см) с гелем Sephadex G-25 в воде с детектированием с помощью дифференциального рефрактометра. Полимерную фракцию гидролизовали 2% AcOH (100 °C, 2 ч), продукты фракционировали на той же колонке и получали модифицированный КПС (2,6 мг).

**Спектроскопия ЯМР.** Перед съемкой спектров ЯМР образцы дважды лиофилизовали из 99,9%  $D_2O$  и исследовали в виде раствора в 99,95%  $D_2O$  при 65 град. C. В качестве внутреннего стандарта для калибровки использовали Na-3-триметилсилилпропаноат-2,2,3,3- $d_4$  ( $\delta_H$  0,0,  $\delta_C$  -1,6). Спектр  $^{13}C$  ЯМР регистрировали на приборе Bruker DRX-500, двумерные эксперименты ЯМР были проведены на спектрометре Bruker Avance II 600 MHz (Германия) с использованием стандартного программного обеспечения компании «Bruker». В эксперименте  $^{13}C$  ЯМР релаксационная задержка составляла 3 с. Время спиновой стабилизации и время смешивания в экспериментах TOCSY и ROESY составляло 60 и 150 мсек, соответственно. Для оптимизации эксперимента  $^1H$ ,  $^{13}C$  HMBSC использовали задержку 60 мсек для развития многосвязных корреляций. Другие параметры ЯМР были установлены, как описано ранее [8]. Для получения и обработки данных ЯМР использовали программу BrukerTopSpin 2.1.

**Биоинформатика.** Данные коротких ридов геномной последовательности штамма LUN5549 получены из архива коротких ридов (SRA, номер доступа DRS005644) и собраны в контиги с использованием программы SPAdes [17]. Генный кластер KL32 идентифицирован между генами *fkpA* и *lldP* и повторно аннотирован в соответствии с ранее описанной номенклатурой [5]. Базы данных CAZy (<http://www.cazy.org/>) [18] и Pfam (<https://pfam.xfam.org/>) [19] исполь-

зованы для соотнесения кодируемых белков с их биосинтетическими функциями. Собранная последовательность и обновленная аннотация доступны в базе данных GenBank под номером доступа KC526897.2. Полная геномная последовательность использована для установления сиквенс-типа в соответствии со схемой MLST Института Пастера для *A. baumannii* ([https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst\\_abaumannii\\_pasteur\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_abaumannii_pasteur_seqdef)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

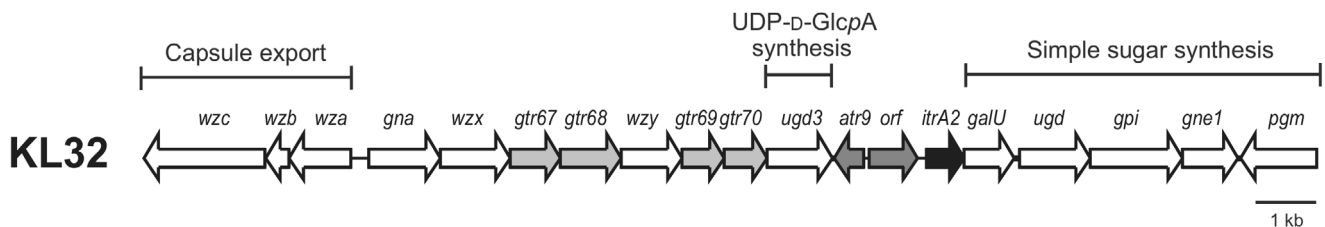
Последовательность генов в геномном кластере PSgc21 КПС *A. baumannii* LUN5549, доступная в базе данных GenBank под номером доступа KC526897.1, является неполной ввиду отсутствия генов экспорта КПС (*wza-wzb-wzc*), что свидетельствует о потенциальной проблеме качества сборки генома. Поскольку последовательность изначально была собрана в контиги из коротких ридов с использованием программы Velvet 2.0 [7], короткие риды (SRA, номер доступа DRS005644) были вновь собраны в контиги, используя программу SPAdes. Полная последовательность фрагмента геномного кластера между консервативными генами *fkpA* и *lldP*, фланкирующими К-локус, оказалась на 99,56% идентичной установленной ранее последовательности геномного кластера KL32 штамма *A. baumannii* BAL\_058 (GenBank, номер доступа KT359615.1), выделенного во Вьетнаме [20]. Соответственно, генный кластер LUN5549 переименован в KL32, и его гены обозначены в соответствии с принятой системой номенклатуры [5]. Обновленная последовательность и аннотация доступны в базе данных GenBank (номер доступа KC526897.2).

Генный кластер KL32 (рис. 1) включает гены *wz* и *wx*, ответственные за процессинг К-звена, модуль генов *galU*, *ugd*, *gpi*, *gne1*, *pgm*, отвечающих за синтез UDP-производных сахаров, включая UDP-D-Glc<sub>p</sub>, UDP-D-Glc<sub>p</sub>NAc и

UDP-D-Gal<sub>p</sub>NAc. Рядом с геном *galU* находится ген *itrA2*, который отвечает за инициацию синтеза К-звена путем присоединения первого остатка К-звена (D-Gal<sub>p</sub>NAc) к липиду-переносчику на внутренней мембране бактерии [21]. Центральная область KL32 включает четыре предсказанных гена гликозилтрансфераз (*gtr67*, *gtr68*, *gtr69*, *gtr70*), необходимых для образования гликозидных связей в К-звене, ген ацетилтрансферазы (*atr9*) и ген, кодирующий белок с неустановленной функцией (Orf).

В центральной области кластера присутствует также ген типа *udg* (*udg3*), который по данным базы данных GenPept (номер доступа AHB32286.1) только на 20% идентичен (74% покрытия) продукту гена *ugd* (GenPept, номер доступа AHB32291.1), расположенного в геномном модуле синтеза сахаров и предположительно отвечающего за превращение UDP-D-Glc<sub>p</sub> в UDP-D-GlcA [5]. Хотя ген *ugd* является общим для всех генных кластеров *A. baumannii*, его роль в синтезе КПС пока не установлена. Белок Ugd3 также на 27% идентичен (на 71% гомологичен) другому белку типу Ugd (Ugd2), найденному в центральной области генных кластеров KL20 и KL21. В соответствии с наличием Ugd2 (GenPept, номера доступа AUG44319.1 и AIT56461.1), КПС K20 и K21 содержат D-Glc<sub>p</sub>A [22]. Присутствие гена *ugd3* в центральной области KL32 предполагает, что КПС K32 также содержит D-GlcA.

КПС выделяли из клеток бактерии *A. baumannii* LUN5549 водно-фенольной экстракцией с последующей очисткой нагреванием в 2% HOAc для расщепления липополисахаридов с короткими углеводными цепями и гель-проникающей хроматографией на геле Sephadex G-50. Анализ углеводов, содержащихся в КПС, в виде ацетатов альдитолов методом ГЖХ показал наличие Glc, GlcNAc и GalNAc в соотношении 1 : 1,6 : 1,8. Кроме того, с помощью жидкостной анионообменной хроматографии идентифицирована GlcA. Абсолютная конфигурация сахаров не определялась химическим методом, но следовала из генетических данных (см. ниже).



**Рис. 1.** Генный кластер биосинтеза КПС *Acinetobacter baumannii* KL32. Стрелки показывают направление транскрипции по данным базы данных GenBank (номер доступа KC526879.2). Гены гликозилтрансфераз (*gtr*) окрашены в светло-серый цвет, ген иницирующей трансферазы (*itrA2*) – в черный цвет. Роль генов, окрашенных в темно-серый цвет, в биосинтезе КПС K32 не установлена

Химические сдвиги  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР (м.д.)

Моносахаридные остатки		C-1 <i>H-1</i>	C-2 <i>H-2</i>	C-3 <i>H-3</i>	C-4 <i>H-4</i>	C-5 <i>H-5</i>	C-6 <i>H-6</i>
КПС							
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	<b>A</b>	104,1 <i>4,54</i>	52,5 <i>3,83</i>	81,3 <i>3,89</i>	69,2 <i>4,06</i>	75,9 <i>3,59</i>	62,6 <i>3,74; 3,82</i>
→4)-β-D-GlcpA-(1→	<b>B</b>	105,3 <i>4,58</i>	73,5 <i>3,40</i>	75,2 <i>3,64</i>	81,2 <i>3,84</i>	74,8 <i>4,01</i>	172,1
→3,4)-β-D-GalpNAc-(1→	<b>C</b>	102,9 <i>4,53</i>	52,8 <i>4,06</i>	79,0 <i>3,84</i>	74,9 <i>4,22</i>	77,0 <i>3,73</i>	61,6 <i>3,64; 3,68</i>
→6)-α-D-GlcpNAc-(1→	<b>D</b>	98,3 <i>4,86</i>	55,3 <i>3,90</i>	71,9 <i>3,87</i>	70,9 <i>3,71</i>	72,0 <i>4,34</i>	69,3 <i>4,06; 4,32</i>
β-D-Glcp-(1→	<b>E</b>	104,0 <i>4,47</i>	74,5 <i>3,35</i>	77,2 <i>3,49</i>	71,2 <i>3,40</i>	77,2 <i>3,43</i>	62,4 <i>3,72; 3,91</i>
МПС							
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	<b>A</b>	103,7 <i>4,58</i>	52,4 <i>3,97</i>	81,1 <i>3,85</i>	69,1 <i>4,12</i>	76,0 <i>3,64</i>	62,3 <i>3,76; 3,78</i>
→4)-β-D-GlcpA-(1→	<b>B</b>	105,4 <i>4,50</i>	73,9 <i>3,36</i>	75,1 <i>3,57</i>	81,1 <i>3,76</i>	77,9 <i>3,68</i>	
→3)-β-D-GalpNAc-(1→	<b>C</b>	102,3 <i>4,51</i>	52,4 <i>3,95</i>	80,7 <i>3,80</i>	69,3 <i>4,16</i>	76,0 <i>3,70</i>	62,3 <i>3,77; 3,81</i>

Примечание. Химические сдвиги  $^1\text{H}$  ЯМР выделены курсивом; химические сдвиги *N*-ацетильных групп:  $\delta_{\text{H}}$  1,96–2,06,  $\delta_{\text{C}}$  23.3–24.0 (Me) и 175.3–175.5 (CO).

Спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  (рис. 2) ЯМР КПС включали сигналы пяти моносахаридных остатков и трех *N*-ацетильных групп. Интерпретация спектров с помощью двумерных экспериментов  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  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 выявила спиновые системы остатков β-Glc (**E**), β-GlcA (**B**), α-GlcNAc (**D**) и двух остатков β-GalNAc (**A** и **C**), находящихся в пиранозной форме (таблица 1). Из величин констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\text{H,H}}$  кольцевых протонов в одно- и двумерных спектрах следовала α-глюкоконфигурация остатка **D**, β-глюкоконфигурация остатков **B** и **E** и β-галактоконфигурация остатков **A** и **C**. Конфигурация остатков **A**, **B**, **C** и **E** подтверждена корреляциями H-1/H-5 в спектре ROESY (рис. 3). Сравнение положений низкопольных сигналов атомов C-3 остатков **C** и **A** ( $\delta$  79,0 и 81,3), атомов C-4 остатков **C** и **B** ( $\delta$  74,9 и 81,2), а также атома C-6 остатка **D** ( $\delta$  69,3) (таблица 1) с таковыми в соответствующих незамещенных моносахаридах [23, 24] указывало на места замещения моносахаридных остатков в К-звене. Химические сдвиги атомов C-2,3,4,5,6 в остатке **E** и незамещенной β-глюкопиранозы [23] близки, что указывало на терминальное положение этого остатка.

В спектре  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC имелись корреляции между аномерными протонами и атомами углерода в местах замещения при  $\delta$  4,47/69,3;  $\delta$  4,53/81,2;  $\delta$  4,54/79,0;  $\delta$  4,58/81,3 и  $\delta$  4,86/74,9, что указывало на корреляции **E** H1/**D** C-6, **C** H1/**B** C-4, **A** H-1/**C** C-3, **B** H-1/**A** C-3 и **D** H-1/**C** C-4, соответственно (рис. S1 Приложения). Эти данные, а также данные о корреляции аномерных протонов с протонами при атомах углерода гликозилируемых остатков в спектре  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY (рис. S2 Приложения) позволили установить типы гликозидных связей и последовательность моносахаридов в К-звене.

Таким образом, КПС К32 *A. baumannii* LUN5549 имеет структуру, представленную на рис. 3, которая, по нашим данным, отличается от известных структур бактериальных полисахаридов, депонированных в базе данных Bacterial Carbohydrate Structure Database (BCSDB; <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial/>) [25]. Дополнительное доказательство структуры КПС получено в результате деградации КПС по Смитту, приведшей к образованию модифицированного полисахарида (МПС). Структура МПС, представленная на рис. 3, установлена теми же методами, что и структура КПС, включая одно- и двумерную спектроскопию ЯМР (таблица).



ет эту связь. Гликозилтрансфераза Gtr67<sub>K32</sub> (GenPept, номер доступа AНВ32281.1) на 27% идентична Gtr75<sub>K37</sub>, кодируемой в геномном кластере *A. baumannii* KL37 (GenBank, номер доступа KX712115.1). В соответствии со структурой КПС K37 [26], Gtr75<sub>K37</sub> катализирует образование связи β-D-Glcp-(1→6)-D-GalpNAc. Таким образом, Gtr67<sub>K32</sub> предположительно отвечает за образование похожей связи β-D-Glcp-(1→6)-D-GlcpNAc в КПС K32. Наконец, для Gtr69<sub>K32</sub> (GenPept, номер доступа AНВ32284.1), входящей в семейство белков glycos\_transf\_2 (Pfam – PF00535), не было найдено соответствий в базе данных BLASTp. Так как в К-звене оставалась только одна связь – β-D-GalpNAc-(1→4)-D-GlcpA, к которой могла быть отнесена эта гликозилтрансфераза, был сделан вывод, что Gtr69<sub>K32</sub> отвечает за образование этой связи (рис. 3).

Функции белков Atr9 (GenPept, номер доступа AНВ32287.2) и Orf (GenPept, номер доступа AНВ32288.2) не могли быть установлены, поскольку КПС не содержит ацетильных или других ацильных групп, и все особенности его структуры обусловлены наличием остальных генов в геномном кластере KL32.

Ранее генный кластер KL32 был обнаружен в штаммах, принадлежащих к широко распространенной глобальной клональной линии 2 (GC2, эквивалент сиквенс-типа ST2 в схеме MLST института Пастера [20]). В настоящей работе исследован штамм *A. baumannii* LUH5549 с геномным кластером KL32, принадлежащий к сиквенс-типу ST354, что свидетельствует о распространении этого геномного кластера среди различных клональных линий вследствие горизонтального генетического переноса между ними.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект 19-14-00273) для Ю.А.К. и гранта Australian Research Council (ARC) DECRA Fellowship 180101563 для Дж.Дж.К.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов изучения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Russo, T., Luke N., Beanan J., Olson R., Sauberman S., MacDonald U., Schultz L., Umland T., and Campagnari A. (2010) The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor, *Infect. Immun.*, **78**, 3993–4000, doi: 10.1128/IAI.00366-10.
- Singh, J.K., Adams, F.G., and Brown, M.H. (2018) Diversity and function of capsular polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*, *Front. Microbiol.*, **9**, 3301, doi: 10.3389/fmicb.2018.03301.
- Tipton, K.A., Chin, C.Y., Farokhyfar, M., Weiss, D.S., and Rather, P.N. (2018) Role of capsule in resistance to disinfectants, host antimicrobials, and desiccation in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **62**, doi: 10.1128/aac.01188-18.
- Geisinger, E., Huo, W., Hernandez-Bird, J., and Isberg, R.R. (2019) *Acinetobacter baumannii*: envelope determinants that control drug resistance, virulence, and surface variability, *Ann. Rev. Microbiol.*, **73**, 481–506, doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115714.
- Kenyon, J.J., and Hall, R.M. (2013) Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes, *PLoS One*, **8**, e62160, doi: 10.1371/journal.pone.0062160.
- Traub, W.H. (1989) *Acinetobacter baumannii* serotyping for delineation of outbreaks of nosocomial cross-infection, *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 2713–2716.
- Hu, D., Liu, B., Dijkshoorn, L., Wang, L., and Reeves, P.R. (2013) Diversity in the major polysaccharide antigen of *Acinetobacter baumannii* assessed by DNA sequencing, and development of a molecular serotyping scheme, *PLoS One*, **8**, e70329, doi: 10.1371/journal.pone.0070329.
- 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., and Knirel, Y.A. (2019) The K90 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* LUH5553 contains di-*N*-acetylpsudaminic acid and is structurally related to the K7 polysaccharide from *A. baumannii* LUH5533, *Carbohydr. Res.*, **479**, 1–5, doi: 10.1016/j.carres.2019.04.008.
- Shashkov, A.S., Senchenkova, S.N., Popova, A.V., Mei, Z., Shneider, M.M., Liu, B., Miroshnikov, K.A., Volozhantsev, N.V., and Knirel, Y.A. (2015) Revised structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* LUH5533 (serogroup O1) containing di-*N*-acetyllegionaminic acid, *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.*, **64**, 1196–1199, doi: 10.1007/s11172-015-1000-9.
- Senchenkova, S.N., Popova, A.V., Shashkov, A.S., Shneider, M.M., Mei, Z., Arbatsky, N.P., Liu, B., Miroshnikov, K.A., Volozhantsev, N.V., and Knirel, Y.A. (2015) Structure of a new pseudaminic acid-containing capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* LUH5550 having the KL42 capsule biosynthesis locus, *Carbohydr. Res.*, **407**, 154–157, doi: 10.1016/j.carres.2015.02.006.
- Kasimova, A.A., Kenyon, J.J., Arbatsky, N.P., Shashkov, A.S., Popova, A.V., Knirel, Y.A., and Hall, R.M. (2018) Structure of the K82 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* LUH5534 containing a D-galactose 4,6-pyruvic acid acetal, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 831–835, doi: 10.1134/S0006297918070064.
- Shashkov, A.S., Liu, B., Kenyon, J.J., Popova, A.V., Shneider, M.M., Senchenkova, S.N., Arbatsky, N.P., Miroshnikov, K.A., Wang, L., and Knirel, Y.A. (2017) Structures of the K35 and K15 capsular polysaccharides of *Acinetobacter baumannii* LUH5535 and LUH5554 containing amino and diamino uronic acids, *Carbohydr. Res.*, **448**, 28–34, doi: 10.1016/j.carres.2017.05.017.
- Kenyon, J.J., Shashkov, A.S., Senchenkova, S.N., Shneider, M.M., Liu, B., Popova, A.V., Arbatsky, N.P., Miroshnikov, K.A., Wang, L., Knirel, Y.A., and Hall, R.M. (2017) *Acinetobacter baumannii* K11 and K83 capsular polysaccharides have the same 6-deoxy-1-talose-containing pentasaccharide K units but different linkages between the K units, *Int. J. Biol. Macromol.*, **103**, 648–655, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.082.

14. Shashkov, A.S., Kenyon, J.J., Arbatsky, N.P., Shneider, M.M., Popova, A.V., Miroshnikov, K.A., Hall, R.M., and Knirel, Y.A. (2016) Related structures of neutral capsular polysaccharides of *Acinetobacter baumannii* isolates that carry related capsule gene clusters KL43, KL47, and KL88, *Carbohydr. Res.*, **435**, 173–179, doi: 10.1016/j.carres.2016.10.007.
15. Westphal, O., and Jann, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure, in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Whistler, R. ed.) Academic press, New York, pp. 83–91.
16. Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H., and Jeanes, A. (1965) Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **37**, 1602–1604, doi: 10.1021/ac60231a048.
17. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., and Pevzner, P.A. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing, *J. Comput. Biol.*, **19**, 455–477, doi: 10.1089/cmb.2012.0021.
18. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 490–495, doi: 10.1093/nar/gkt1178.
19. Finn, R.D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., and Bateman, A. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 279–285, doi: 10.1093/nar/gkv1344.
20. Schultz, M.B., Thanh, D.P., Hoan, N.T.D., Wick, R.R., Ingle, D.J., Hawkey, J., Edwards, D.J., Kenyon, J.J., Lan, N.P.H., Campbell, J.I., Thwaites, G., Nhu, N.T.K., Hall, R.M., Fournier-Level, A., Baker, S., and Holt, K.E. (2016) Repeated local emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single hospital ward, *Microb. Genom.*, **2**, e000050, doi: 10.1099/mgen.0.000050.
21. Kenyon, J.J., Marzaioli, A.M., Hall, R.M., and De Castro, C. (2014) Structure of the K2 capsule associated with the *KL2* gene cluster of *Acinetobacter baumannii*, *Glycobiology*, **24**, 554–563, doi: 10.1093/glycob/cwu024.
22. Kasimova, A.A., Kenyon, J.J., Arbatsky, N.P., Shashkov, A.S., Popova, A.V., Shneider, M.M., Knirel, Y.A., and Hall, R.M. (2018) *Acinetobacter baumannii* K20 and K21 capsular polysaccharide structures establish roles for UDP-glucose dehydrogenase Ugd2, pyruvyl transferase Ptr2 and two glycosyltransferases, *Glycobiology*, **28**, 876–884, doi: 10.1093/glycob/cwy074.
23. Lipkind, G.M., Shashkov, A.S., Knirel, Y.A., Vinogradov, E.V., and Kochetkov, N.K. (1988) A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of <sup>13</sup>C-n.m.r. data, *Carbohydr. Res.*, **175**, 59–75, doi: 10.1016/0008-6215(88)80156-3.
24. Jansson, P.E., Kenne, L., and Schweda, E. (1987) Nuclear magnetic resonance and conformational studies on monoacetylated methyl D-gluc- and D-galacto-pyranosides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 377–383, doi: 10.1039/P19870000377.
25. Toukach, P. (2011) Bacterial Carbohydrate Structure Database 3: principles and realization, *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 159–170, doi: 10.1021/ci100150d.
26. 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., and Knirel, Y.A. (2019) *Acinetobacter baumannii* K116 capsular polysaccharide structure is a hybrid of the K14 and revised K37 structures, *Carbohydr. Res.*, **484**, 107774, doi: 10.1016/j.carres.2019.107774.
27. Landersjö, C., Weintraub, A., and Widmalm, G. (1996) Structure determination of the O-antigen polysaccharide from the enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) O143 by component analysis and NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, **291**, 209–216, doi: 10.1016/s0008-6215(96)00168-1.

## ELUCIDATION OF THE K32 CAPSULAR POLYSACCHARIDE STRUCTURE AND CHARACTERIZATION OF THE KL32 GENE CLUSTER OF *Acinetobacter baumannii* LUH5549<sup>\*,\*\*</sup>

S. M. Cahill<sup>1#</sup>, N. P. Arbatsky<sup>2#</sup>, A. S. Shashkov<sup>2</sup>, M. M. Shneider<sup>3</sup>,  
A. V. Popova<sup>4,5</sup>, R. M. Hall<sup>6#</sup>, J. J. Kenyon<sup>1#</sup>, Yu. A. Knirel<sup>2\*\*\*\*#</sup>

<sup>1</sup> Institute of Health and Biomedical Innovation, School of Biomedical Sciences, Faculty of Health,  
Queensland University of Technology, QLD 4001 Brisbane, Australia

<sup>2</sup> Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: yknirel@gmail.com

<sup>3</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

<sup>5</sup> State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279 Obolensk, Moscow Region, Russia

<sup>6</sup> School of Life and Environmental Sciences, The University of Sydney, Sydney, Australia

Received October 29, 2019

Revised November 25, 2019

Accepted November 26, 2019

Capsular polysaccharide (CPS) isolated from *Acinetobacter baumannii* LUH5549 carrying the KL32 capsule biosynthesis gene cluster, was studied by sugar analysis, Smith degradation, and one- and two-dimensional <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. The K32 CPS was found to be composed of branched pentasaccharide repeats (K units) containing two residues of β-D-GalpNAc and one residue of β-D-GlcpA (β-D-glucuronic acid) in the main chain and one residue of each of β-D-Glcp and α-D-GlcpNAc in the side disaccharide chain. Consistent with the established CPS structure, the KL32 gene cluster includes genes for UDP-D-glucose 6-dehydrogenase (Ugd3) responsible for D-glucuronic acid (D-GlcA) synthesis and four glycosyltransferases that were assigned to specific linkages. Genes encoding acetyltransferase and unknown protein product were not involved in the CPS biosynthesis. Whilst the KL32 gene cluster has previously been found in the global clone 2 (GC2) lineage, LUH5549 belongs to the sequence type ST354, thus demonstrating horizontal gene transfer between these lineages.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, capsule, K locus, polysaccharide structure, glucuronic acid