

УДК 577.114.5;577.21;579.841

## РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО РАЗЛИЧНЫМ МЕХАНИЗМАМ КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Acinetobacter baumannii* ФАГОВЫМИ ДЕПОЛИМЕРАЗАМИ\*

© 2020 Ю.А. Книрель<sup>1\*\*</sup>, М.М. Шнейдер<sup>2,3</sup>, А.В. Попова<sup>3,4,5</sup>,  
А.А. Касимова<sup>1,6</sup>, С.Н. Сенченкова<sup>1</sup>, А.С. Шашков<sup>1</sup>, А.О. Чижов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: uknirel@gmail.com

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт антимикробной химиотерапии, Смоленский государственный  
медицинский университет, 214019 Смоленск, Россия

<sup>4</sup> Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),  
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

<sup>5</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии  
и биотехнологии, 142279 Оболensk, Московская обл., Россия

<sup>6</sup> Высший химический колледж РАН, Российский химико-технологический  
университет им. Д.И. Менделеева, 125047 Москва, Россия

Поступила в редакцию 11.03.2020

После доработки 30.03.2020

Принята к публикации 31.03.2020

Аэробные грамотрицательные бактерии *Acinetobacter baumannii* являются одним из наиболее важных клинических патогенов – возбудителей внутрибольничных инфекций во всем мире. Бактериальную клетку *A. baumannii* окружает капсула, которая состоит из толстого вязкого слоя структурно варибельного капсульного полисахарида (КПС). Капсула защищает бактерии от неблагоприятных условий окружающей среды и биологических систем, включая механизмы иммунной защиты хозяина и бактериофаги. Многие фаги *A. baumannii* имеют структурные деполимеразы (хвостовые шипы), которые специфически распознают и ферментативно расщепляют бактериальные КПС. В данной работе мы изучили специфическое взаимодействие белков хвостовых шипов четырех литических бактериофагов с КПС *A. baumannii*. Деполимеразы трех бактериофагов Fri1, AS12 и BS46 идентифицированы как специфические гликозидазы, которые расщепляют КПС *A. baumannii* 28, 1432 и B05 соответственно, по гидролитическому механизму. Деполимераза gp54 бактериофага AP22 охарактеризована как полисахарид-лиаза, расщепляющая КПС *A. baumannii* 1053 по механизму β-элиминирования в остатках гексуроновой кислоты (ManNAcA).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Acinetobacter baumannii*, бактериофаг, хвостовой шип, капсульный полисахарид, гексуроновая кислота, деполимераза, гликозидаза, полисахарид-лиаза, рецептор-связывающий белок, ЯМР-спектроскопия.

DOI: 10.31857/S032097252005005X

### ВВЕДЕНИЕ

Инфицирование бактерий специфическими бактериофагами инициируется распознаванием и прикреплением фаговых частиц к поверхнос-

ти клеток-хозяев. Эта функция выполняется рецептор-связывающими белками. Обычно фаги несут множество вариантов таких белков, которые образуют хвостовые фибриллы или хвостовые шипы. Оба типа представляют собой боль-

Принятые сокращения: КПС – капсульный полисахарид; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; FucNAc – 2-ацетамидо-2-дезоксифукоза; GalNAcA – 2-ацетамидо-2-дезоксигалактуронозная кислота; HR ESI MS – масс-спектрометрия высокого разрешения с ионизацией электрораспылением; Hb – 3-гидроксибутаноил; HMBC – гетероядерная многосвязевая корреляция; KL – K локус; Leg – 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-глицеро-D-галакто-нон-2-улонозная (легиоаминовая) кислота; ManNAcA – 2-ацетамидо-2-дезоксиманнуронозная кислота; QuiNAc4NAc – 2,4-диацетамидо-2,4,6-тридезоксиглюкоза (2,4-диацетамидо-2,4-дидезоксигинозоза); ROESY – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; TOCSY – полная корреляционная спектроскопия.

\* 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. 5, 2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

шие трехмерные белки, которые присоединены к базальной пластине фага своими N-концами, тогда как удаленные C-концы взаимодействуют с окружающей средой и отвечают за распознавание и связывание с рецептором. Они специфически распознают рецепторы, экспонированные на бактериальной оболочке, которые необходимы для инфицирования клетки бактериофагом. Это экзополисахариды, в том числе капсульные полисахариды (КПС), и белки наружной мембраны. В отличие от хвостовых фибрилл, хвостовые шипы обладают ферментативной активностью и способны не только связывать, но и деполимеризовать защитный полисахаридный слой на поверхности бактерий. Это обеспечивает доступ к вторичным фаговым рецепторам на внешней мембране, так что они могут быть распознаны другими фаговыми белками.

Одним из факторов вирулентности *Acinetobacter baumannii* является защитный слой КПС, который способствует патогенезу и исключительной способности выживания бактерии [1, 2]. Значительное структурное разнообразие КПС обусловлено вариабильностью генетического локуса, ответственного за биосинтез капсулы (K-локус, KL) [3–5]. К настоящему времени у штаммов *A. baumannii* выявлено более 128 типов капсульных локусов (KL-типов), и их число постоянно увеличивается [5]. Установлены структуры КПС более 30 KL-типов *A. baumannii* (см. Базу данных структур бактериальных углеводов на сайте <http://csdb.glycoscience.ru/bacterial>). КПС является первичным рецептором для большого числа бактериофагов *A. baumannii*, имеющих хвостовые шипы [6].

Для определения специфичности взаимодействия белков хвостовых шипов с КПС мы изучили расщепление КПС *A. baumannii* деполимеразами бактериофагов. Были выбраны деполимеразы четырех литических бактериофагов AP22 [7], Fri1 и AS12 [6] и BS46 [8], которые специфичны к штаммам *A. baumannii* 1053 (K91) [9], 28 (K19) [10], 1432 (K27) [11] и AC54 (K9) [12, 13] соответственно, структуры КПС которых установлены ранее. Эти штаммы распространены среди клинических изолятов в России, а штаммы, имеющие КПС типа K9, остаются среди наиболее широко распространенных и опасных в клинической практике. Продукты расщепления бактериальных КПС выделяли с помощью гель-проникающей хроматографии и анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (HR ESI MS) и ЯМР-спектроскопии, которые позволили идентифицировать место расщепления в КПС и определить меха-

низм деполимеризации (гидролиз или  $\beta$ -элиминирование).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы.** В качестве источников КПС использованы штаммы *A. baumannii* 1053, 28, 1432, AC54 и B05. Штаммы 1053, B05 и 1432 получены из «ГКПМ-Оболенск» (инвентарные номера В-7129, В-7705 и В-7134 соответственно). Штамм 28 был выделен в 2002 году в Санкт-Петербурге, Россия [8]. Штамм AC54 был предоставлен Ryland F. Young (Texas University A AND M, College Station, Texas, США).

**Белки.** Клонирование, экспрессию деполимеразы BS46 и очистку рекомбинантного белка проводили следующим образом. Фрагмент генома фага BS46, содержащий делеционный мутант гена 47, кодирующего деполимеразу, в которой отсутствует N-концевой домен белка, амплифицировали с помощью ПЦР, используя праймеры BS46\_gp47-for: 5'-ataGGATCCagtgcatcaggtgctcacc-3' и BS46\_gp47-rev: 5'-ataCTCGAG-tttgatgatgatg-3', а затем клонировали в экспрессионный вектор pTSL (GenBank KU314761) [14]. Вектор трансформировали в химически компетентные клетки *Escherichia coli* B834 (DE3). Белок экспрессировали в среде LB с добавлением 200 мкг/мл ампициллина. Трансформированные клетки выращивали на среде LB при 37 °С до поглощения 0,6 при 600 нм. Среду охлаждали до 18 °С и индуцировали экспрессию белка добавлением изопропил-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозид до конечной концентрации 0,5–1,0 мМ. После дальнейшей инкубации 16 ч при 18 °С клетки осаждали центрифугированием («Beckman», США) при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Клеточные осадки ресуспендировали в 1/50 от первоначального объема клеток в буфере А (20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 300 мМ NaCl), замораживали, оттаивали и затем лизировали ультразвуком («Branson Ultrasonic» США). Клеточные остатки осаждали центрифугированием при 15 000 g в течение 20 мин при 4 °С. Белок извлекали металло-хелатной хроматографией на заряженной Ni<sup>2+</sup> колонке (5 мл) GE HisTrap («GE Healthcare Life Sciences», США), предварительно уравновешенной буфером А. Белок элюировали линейным градиентом 50–200 мМ имидазола в буфере А. Фракции, содержащие целевой белок, собирали и объединяли. Белок-лидер SlyD отщепляли TEV-протеазой при соотношении протеаза/продукт гена 47 = 1/100 (w/w) 16 ч при 20 °С. Реакционную смесь одновременно диализовали против буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl pH 8,0 и 1,0 мМ 2-меркаптоэтанола.

Расщепленный белок отделяли фильтрованием и очищали ионообменной хроматографией, используя колонку MonoQ 10/100 GL («GE Healthcare», США) и градиент NaCl 0–650 мМ в 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Фракции, содержащие белок, объединяли и концентрировали до объема ~5 мл с использованием ультрафильтрационных устройств Sartorius с порогом отсека по молекулярной массе 50 000 Да («Sartorius AG», Германия).

Препараты деполимераз AP22, Fri1 и AS12 (концентрация 1 мг/мл) получены в лаборатории Леймана (Sealy Center for Structural Biology and Molecular Biophysics, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, США).

**Спектроскопия ЯМР.** Образцы лиофилизовали из 99,9% D<sub>2</sub>O для замещения протонов дейтерием. ЯМР-спектры снимали для растворов в 99,95% D<sub>2</sub>O на спектрометре Bruker Avance II («Bruker», Германия) 600 МГц при 20 °С. В качестве внутреннего стандарта для калибровки использовали натрий-3-триметилсилилпропаноат-2,2,3,3-d<sub>4</sub> ( $\delta_H$  0,  $\delta_C$  -1,6). Одномерную спектроскопию <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР и двумерную <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-корреляционную спектроскопию (COSY), полную <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-корреляционную спектроскопию (TOCSY), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-спектроскопию ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (ROESY), гетероядерную одноквантовую <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C корреляционную спектроскопию (HSQC) и гетероядерную многосвязную <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C корреляционную спектроскопию (HMBC) проводили с использованием стандартного программного обеспечения («Bruker», Германия). Отнесение химических сдвигов <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР проводили с помощью двумерных спектров ЯМР. Для сбора и обработки данных ЯМР использовали программу Bruker TopSpin 2.1 («Bruker», Германия). Время спиновой стабилизации MLEV-17 и время смешивания в экспериментах TOCSY и ROESY составляло 60 и 200 мс соответственно. Для оптимизации экспериментов <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HMBC использовали задержку 60 мс, соответствующую константе спин-спиновой взаимодействия  $J_{H,C}$  8 Гц.

**Масс-спектрометрия.** Масс-спектрометрию высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (HR ESI MS) с регистрацией отрицательных ионов [15] проводили на приборе micrOTOF II («Bruker», Германия). Образцы олигосахаридов (~50 нг/литр) растворяли в смеси вода-ацетонитрил 1 : 1 (v/v) и вводили шприцем со скоростью потока 3 мкл/мин. Напряжение на входе 3200 В, температура интерфейса – 180 °С, газ-осушитель – азот, диапазон регистрируемых масс  $m/z$  50–3500. Для внутренней калибровки использовали калибровочный раствор ESI («Agilent Technologies», США).

**Гель-проникающая хроматография.** Гель-проникающую хроматографию образцов КПС проводили на колонке ХК 26/70 (700 × 26 мм, слой геля 560 мм) («GE Healthcare», Германия) с гелем Sephadex G-50 Superfine («Amersham PLC, GE Healthcare», Германия) 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», Германия), заполненную гелем Fractogel TSK HW-40 (S) («Tosoh Corporation», 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.

**Выделение и очистка КПС.** Капсульные полисахариды *A. baumannii* 1053, 28, 4190, AC54, и B05 выделяли экстракцией бактериальных клеток 90%-ным водным раствором фенола в течение 30 мин при 65–68 °С [16]. Экстракт охлаждали и диализовали против водопроводной воды без разделения слоев. Нерастворимые компоненты удаляли центрифугированием (12 000 г, 20 мин). Для дополнительной очистки [9] образцы КПС обрабатывали 50%-ным водным раствором ТХУ при 4 °С, осадок отделяли центрифугированием («Eppendorf», Австрия), супернатант диализовали против дистиллированной воды и лиофилизовали. Для расщепления сопутствующего липополисахарида с короткой цепью препараты КПС нагревали с 2%-ной уксусной кислотой (100 °С, 3 ч) и КПС выделяли из супернатанта с помощью гель-проникающей хроматографии на геле Sephadex G-50 Superfine («Amersham PLC, GE Healthcare», Германия).

**Расщепление КПС.** Очищенный образец КПС растворяли в 20 мМ буфере Tris-HCl pH 7,5 и добавляли к раствору соответствующий белок при соотношении белок/КПС = 1/100 (w/w). 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. Для облегчения идентификации олигосахаридных продуктов КПС из штамма 28 перед расщеплением О-деацетилировали, как описано ранее [10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структуры КПС исследованных штаммов *A. baumannii* показаны на рис. 1–4. Структуры КПС штаммов 1053 [7], 28 [8] и 1432 [9] установ-



мидо-2-дезоксид-Д-фукозы (D-FucNAc), 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-маннуриновой кислоты (D-ManNAcA) на восстанавливаемом конце и 4,5-ненасыщенной 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-гексуроновой кислоты (ΔHexNAcA) на невозстанавливаемом конце (рис. 1). Последний моносахарид был идентифицирован по: 1) слабому положению сигналов C4 и C5 в спектре ЯМР <sup>13</sup>C при δ<sub>C</sub> 108,9 и 145,6 соответственно (рис. 1, б; табл. S3 в Приложении), 2) отсутствию протона H5 и 3) корреляциям H1/C5, H4/C5 и H4/C6 в спектре <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C НМВС при δ<sub>H</sub>/δ<sub>C</sub> 5,39/145,6, 6,05/145,6 и 6,05/170,4 соответственно.

Структура олигосахарида **1** была подтверждена масс-спектром HR ESI в котором присутствовал пик иона [M-H]<sup>-</sup> при m/z 620.1951 (расчетное значение m/z 620.1945). Аналогичные ЯМР-спектроскопическое (табл. S3 в Приложении) и масс-спектрометрическое (данные не приведены) исследования показали, что олигосахарид **2** представлял собой гексасахарид, состоящий из трисахарида, соответствующего интактному повторяющемуся звену КПС и расположенного между остатками ManNAcA и FucNAc трисахарида **1**, как показано на рис. 1, а.

Таким образом, олигосахариды **1** и **2** образовались из КПС путем специфического расщепления β1→4-гликозидной связи между двумя остатками ManNAcA в повторяющемся звене КПС.

Расщепление КПС *A. baumannii* 28 деполимеразой gp49 фага Fri1 привело к двум олигосахаридным фракциям I и II, представляющим собой олигомеры повторяющегося звена КПС, содержащего по одному остатку 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-галактозы (D-GalNAc), 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-галактуроновой кислоты (D-GalNAcA)

и 2,4-диацетамидо-2,4,6-тридезоксид-Д-глюкозы (D-QuiNAc4NAc). Данные масс-спектра HR ESI (табл. S1 в Приложении) показали, что фракция II представляет собой смесь гексасахарида **3**, нонасахарида **4** и додекасахарида **5** в примерном соотношении 1 : 3 : 1 (рис. 2), соответствующих димеру, тримеру (главный продукт) и тетрамеру, повторяющегося звена КПС соответственно. Фракция I включала олигомеры **4–7** от тримера до гексамера повторяющегося звена в примерном соотношении 1,2 : 5,0 : 1,4 : 1 (рис. 2), из которых тетрамер **5** являлся основным продуктом. На восстанавливаемом конце всех олигосахаридов находился остаток QuiNAc4NAc (табл. S4 в Приложении).

Следовательно, деполимераза gp49 фага Fri1 расщепляет КПС *A. baumannii* 28 по β1→4-гликозидной связи между остатками QuiNAc4NAc и GalNAcA соседних повторяющихся звеньев.

При расщеплении КПС *A. baumannii* 1432 деполимеразой gp42 фага AS12 образовались смеси пентасахаридов **8a,b** и декасахаридов **9a-c** (рис. 3), которые соответствовали мономерам и димерам повторяющихся звеньев КПС соответственно. Олигосахариды **8a,b** включали два остатка D-Gal и по одному остатку D-GlcNAc, D-GalNAc и производного 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-Д-глицеро-Д-галакто-нон-2-улозоновой (легионаминовой) кислоты. В соответствии с вариацией заместителя при N-7 легионаминовой кислоте в КПС [10] основной продукт расщепления **8a** и второй продукт **8b** содержали 5-N-ацетил-7-N-[(R)-3-гидроксипутироил]легионаминовую кислоту (Leg5Ac7Hb) или 5,7-ди-N-ацетиллегионаминовую кислоту (Leg5Ac7Ac), соответственно (табл. S5 в Приложении). Продукты **9a-c** включали два остатка Leg5Ac7Hb, по одному остатку Leg5Ac7Hb и Leg5Ac7Ac или два остатка Leg5Ac7Ac соответственно. На восста-

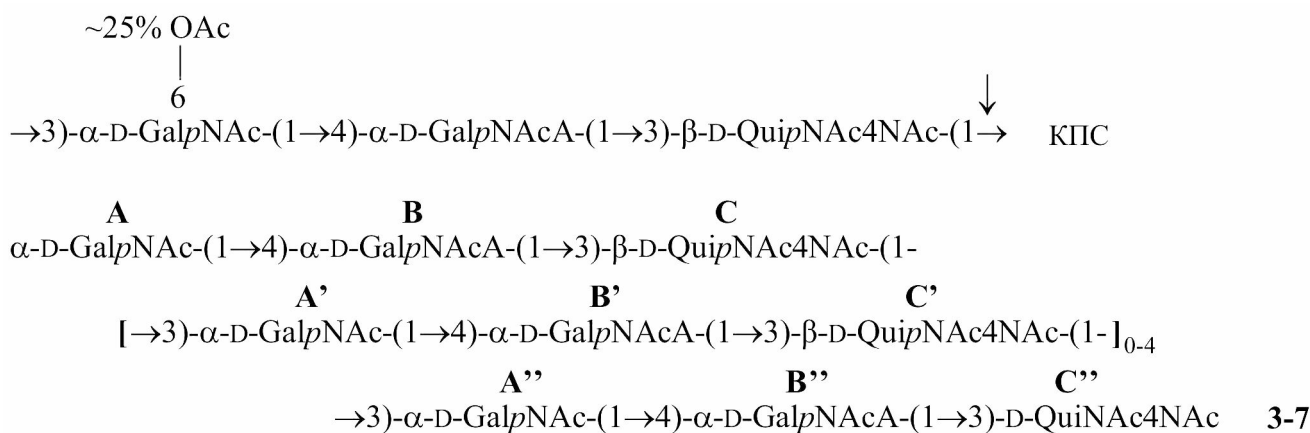


Рис. 2. Структуры КПС *A. baumannii* 28 [10] и олигосахаридов **3–7**, полученных в результате расщепления O-деацетилированного КПС деполимеразой gp49 фага Fri1. Место расщепления КПС указано стрелкой

навливающим конце как **8**, так и **9** находился остаток GalNAc.

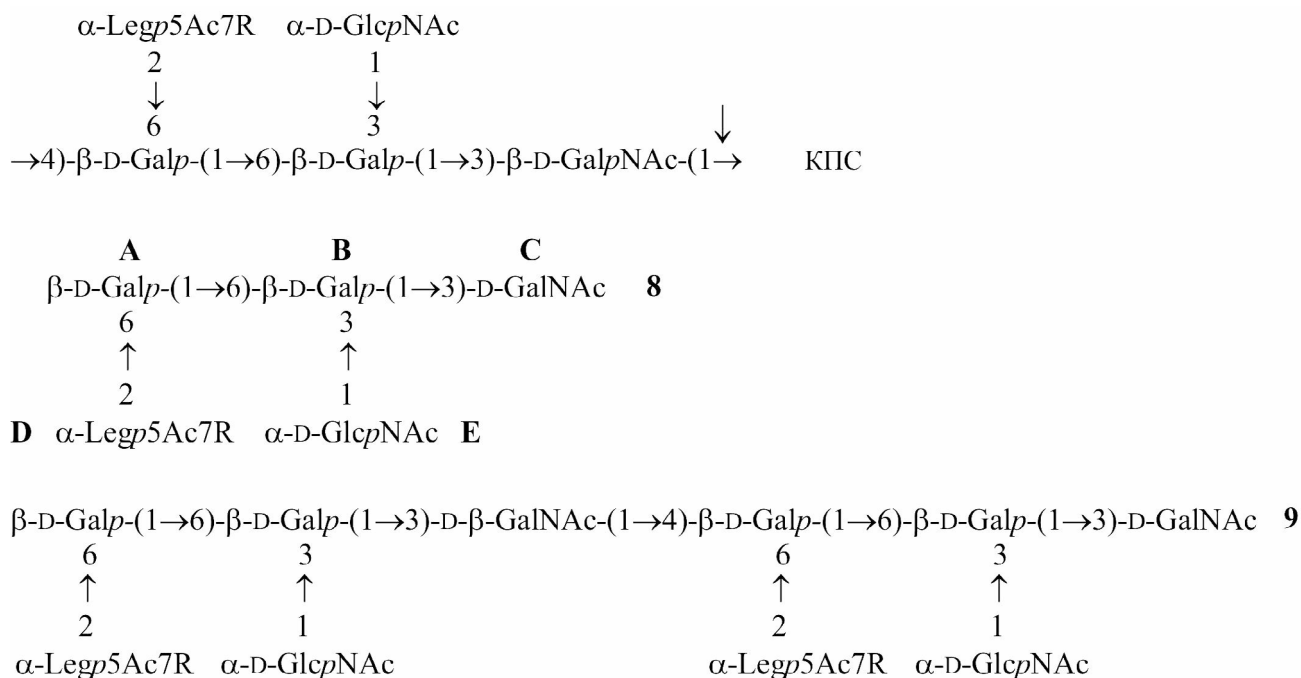
Следовательно, деполимераза gp42 фага AS12 расщепляет КПС *A. baumannii* 1432 по  $\beta 1 \rightarrow 4$ -гликозидной связи между остатками GalNAc и Gal соседних повторяющихся звеньев.

Расщепление КПС *A. baumannii* AC54 деполимеразой gp47 фага BS54 привело не к олигосахаридам, а к полисахариду, поэтому для расщепления был использован КПС штамма *A. baumannii* B05 (хозяин фага AM24 [17]), который относится к тому же типу K9, что и штамм AC54. В результате были получены два олигосахарида **10** и **11** (рис. 4). Основным продуктом – октасахарид **10** – соответствовал димеру повторяющегося звена КПС. Он состоял из четырех остатков L-FucNAc, двух остатков D-GalNAcA и двух остатков D-GlcNAc, один из которых находился на восстанавливаемом конце (табл. S6 в Приложении). Структура **10** подтверждалась масс-спектром HR ESI, в котором присутствовал пик иона  $[M-H]^{2-}$  при  $m/z$  802.3092 (рассчитанное значение  $m/z$  802.3049). Второй олигосахарид **11** был идентифицирован как додекасахарид, соответствующий тримеру повторяющегося звена КПС.

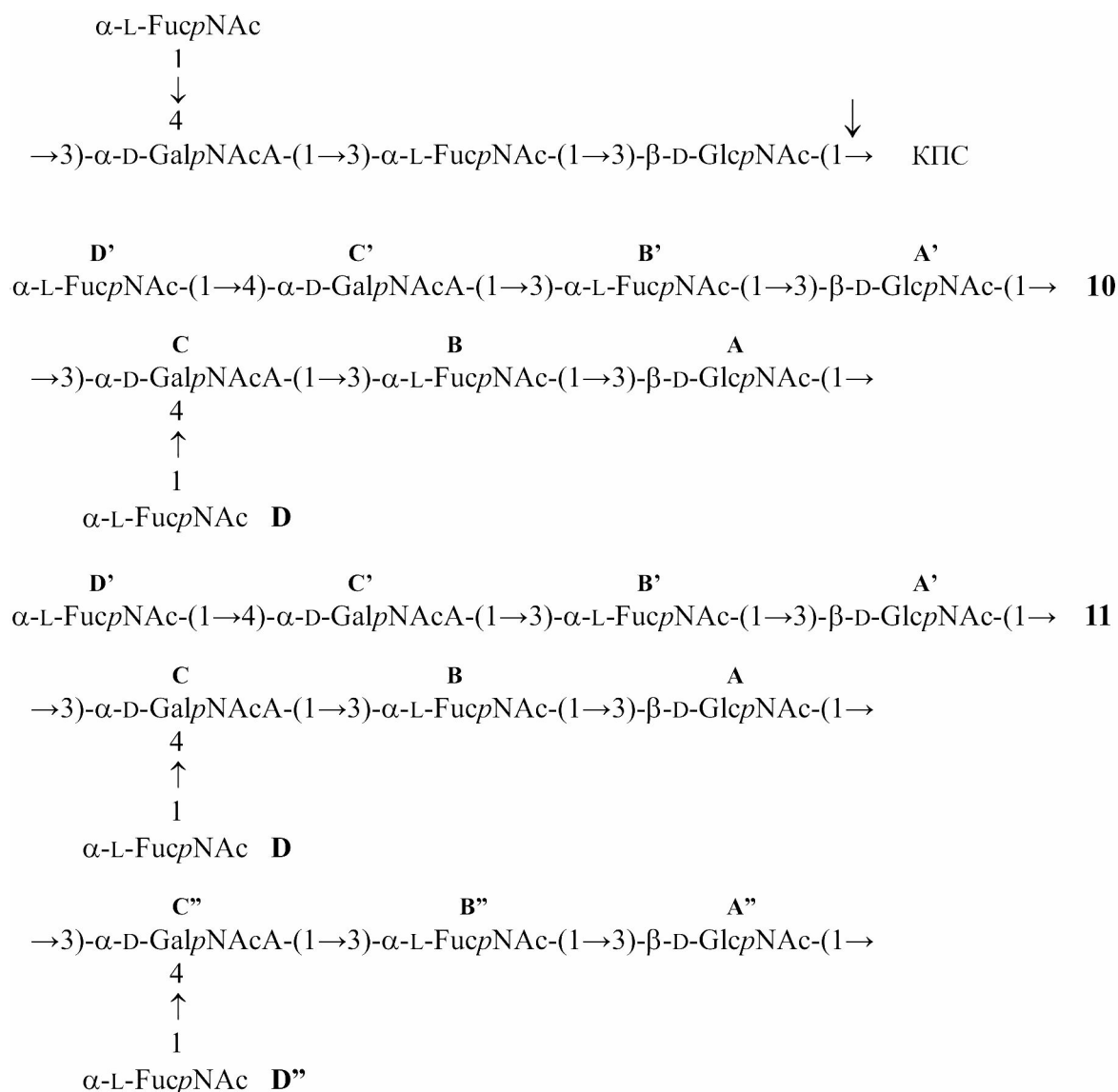
Следовательно, деполимераза gp47 фага BS54 расщепляет КПС *A. baumannii* B05 по  $\beta 1 \rightarrow 3$ -гликозидной связи между остатками GlcNAc и GalNAcA соседних повторяющихся звеньев.

Понимание химизма специфического взаимодействия фаговых деполимераз с КПС бактерий важно с точки зрения как биологии и генетики бактериофагов, так и возможного применения этих ферментов в биотехнологии. Показано, что препараты рекомбинантных деполимераз могут использоваться как терапевтические агенты [18, 19]. Поскольку число типов КПС, определяющих высокую вариабельность инфекционных штаммов *A. baumannii*, велико, желательно иметь наготове большой набор деполимераз с известной специфичностью. Однако, хотя специфичность ряда фаговых ферментов охарактеризована генетически [20], химический механизм действия установлен только для одной КПС-деполимеразы [21].

В настоящей работе мы впервые выяснили механизм и охарактеризовали продукты расщепления четырех разнообразных по структуре КПС *A. baumannii* фаговыми деполимеразами. Одна из них, деполимераза gp54 фага AP22, является полисахарид-лиазой, расщепляющей КПС *A. baumannii* 1053 по механизму  $\beta$ -элиминирования в одном из остатков ManNAcA. Три другие деполимеразы, gp49 фага Fri1, gp42 фага AS12 и gp47 фага BS46 – специфические гликозидазы, которые расщепляют КПС *A. baumannii* 28, 1432 и B05 соответственно, по гидролитическому механизму. Образующиеся при рас-



**Рис. 3.** Структуры КПС *A. baumannii* 1432 [11] и олигосахаридов **8** и **9**, полученных в результате расщепления КПС деполимеразой gp42 фага AS12. R и R' обозначают ацетил или (R)-3-гидроксипутаноил. Место расщепления КПС указано стрелкой



**Рис. 4.** Структуры КПС *A. baumannii* B05 [12, 13] и олигосахаридов **10** и **11**, полученных в результате расщепления КПС деполимеразой gp47 фага BS46. Место расщепления КПС указано стрелкой

щеплении олигосахаридные фрагменты КПС могут быть использованы в качестве компонентов кандидатных конъюгатных вакцин против инфекций, вызванных *A. baumannii*. Полученные данные являются биохимической основой применения литических бактериофагов и КПС-деполимераз хвостовых шипов, кодируемых в фаговых геномах, для контроля распространения антибиотикоустойчивых штаммов *A. baumannii*.

**Финансирование.** Выделение, анализ моносахаридного состава и определение структуры продуктов расщепления КПС поддержаны Рос-

сийским научным фондом (грант № 19-14-00273). Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинантной деполимеразы BS46 поддержаны Российским научным фондом (грант № 18-15-00403). Выращивание бактериальных клеток *A. baumannii* 1053, 1432 и B05 поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31 октября 2019 года).

**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

- Doi, Y., Murray, G. L., and Peleg, A. Y. (2015) *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options, *Semin. Resp. Crit. Care Med.*, **36**, 85-98.
- Lee, C. R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C. J., Jeong, B. C., and Lee, S. H. (2015) Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7**, 55, doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
- 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.
- 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.
- Wyres, L., Cahill, S. M., Holt, K. E., Hall, R. M., and Kenyon, J. J. (2020) Identification of *Acinetobacter baumannii* loci for capsular polysaccharide (KL) and lipooligosaccharide outer core (OCL) synthesis in genome assemblies using curated reference databases compatible with Kaptive, *Microb. Genom.*, doi: 10.1099/mgen.0.000339.
- Popova, A. V., Lavysh, D. G., Klimuk, E. I., Edelstein, M. V., Bogun, A. G., Shneider, M. M., Goncharov, A. E., Leonov, S. V., and Severinov, K. V. (2017) Novel friI-like viruses infecting *Acinetobacter baumannii*-vB\_AbaP\_AS11 and vB\_AbaP\_AS12-characterization, comparative genomic analysis, and host-recognition strategy, *Viruses*, **9**, E188, doi: 10.3390/v9070188.
- Popova, A. V., Zhilenkov, E. L., Myakinina, V. P., Krasnikova, V. M., and Volozhantsev, N. V. (2012) Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **332**, 40-46, doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02573.x.
- Popova, A. V., Shneider, M. M., Mikhailova, Y. V., Shelonov, A. A., Shagin, D. A., Edelstein, M. V., and Kozlov, R. S. (2020) Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* phage BS46, *Microbiol. Res. Announc.*, (in press).
- Shashkov, A. S., Shneider, M. M., Senchenkova, S. N., Popova, A. V., Nikitina, A. S., Babenko, V. V., Kostyukova, E. S., Miroshnikov, K. A., Volozhantsev, N. V., and Knirel, Y. A. (2015) Structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* 1053 having the KL91 capsule biosynthesis gene locus, *Carbohydr. Res.*, **404**, 79-82, doi: 10.1016/j.carres.2014.11.013.
- Kenyon, J. J., Shneider, M. M., Senchenkova, S. N., Shashkov, A. S., Siniagina, M. N., Malanin, S. Y., Popova, A. V., Miroshnikov, K. A., Hall, R. M., and Knirel, Y. A. (2016) 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*, **162**, 1479-1489, doi: 10.1099/mic.0.000313.
- Shashkov, A. S., Kenyon, J. J., Senchenkova, S. N., Shneider, M. M., Popova, A. V., Arbatsky, N. P., Miroshnikov, K. A., Volozhantsev, N. V., Hall, R. M., and Knirel, Y. A. (2016) *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*, **26**, 501-508, doi: 10.1093/glycob/cwv168.
- Haseley, S. R., and Wilkinson, S. G. (1996) Structure of the O-specific polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* O5 containing 2-acetamido-2-deoxy-D-galacturonic acid, *Eur. J. Biochem.*, **237**, 229-233.
- Vinogradov, E. V., Pantophlet, R., Dijkshoorn, L., Brade, L., Holst, O., and Brade, H. (1996) Structural and serological characterisation of two O-specific polysaccharides of *Acinetobacter*, *Eur. J. Biochem.*, **239**, 602-610.
- Taylor, N. M., Prokhorov, N. S., Guerrero-Ferreira, R. C., Shneider, M. M., Browning, C., Goldie, K. N., Stahlberg, H., and Leiman, P. G. (2016) Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction, *Nature*, **533**, 346-352, doi: 10.1038/nature17971.
- Tsedilin, A. M., Fakhrutdinov, A. N., Eremin, D. B., Zalesskiy, S. S., Chizhov, A. O., Kolotyrykina, N. G., and Ananikov, V. P. (2015) How sensitive and accurate are routine NMR and MS measurements, *Mendeleev Commun.*, **25**, 454-456.
- 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. L., Ed.), **5**, Academic Press, New York, pp. 83-91.
- Popova, A. V., Shneider, M. M., Myakinina, V. P., Bannov, V. A., Edelstein, M. V., Rubalskii, E. O., Aleshkin, A. V., Fursova, N. K., and Volozhantsev, N. V. (2019) Characterization of myophage AM24 infecting *Acinetobacter baumannii* of the K9 capsular type, *Arch. Virol.*, **164**, 1493-1497, doi: 10.1007/s00705-019-04208-x.
- Oliveira, H., Mendes, A., Fraga, A. G., Ferreira, A., Pimenta, A. I., Mil-Homens, D., Fialho, A. M., Pedrosa, J., and Azeredo, J. (2019) K2 capsule depolymerase is highly stable, is refractory to resistance, and protects larvae and mice from *Acinetobacter baumannii* sepsis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, doi: 10.1128/AEM.00934-19.
- Liu, Y., Leung, S. S. Y., Guo, Y., Zhao, L., Jiang, N., Mi, L., Li, P., Wang, C., Qin, Y., Mi, Z., Bai, C., and Gao, Z. (2019) The capsule depolymerase Dpo48 rescues *Galleria mellonella* and mice from *Acinetobacter baumannii* systemic infections, *Front. Microbiol.*, **10**, 545, doi: 10.3389/fmicb.2019.00545.
- Oliveira, H., Costa, A. R., Konstantinides, N., Ferreira, A., Akturk, E., Sillankorva, S., Nemeč, A., Shneider, M., Dötsch, A., and Azeredo, J. (2017) Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains, *Environ Microbiol.*, **19**, 5060-5077, doi: 10.1111/1462-2920.13970.
- Lee, I. M., Yang, F. L., Chen, T. L., Liao, K. S., Ren, C. T., Lin, N. T., Chang, Y. P., Wu, C. Y., and Wu, S. H. (2018) Pseudaminic acid on exopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* plays a critical role in phage-assisted preparation of glycoconjugate vaccine with high antigenicity, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 8639-8643, doi: 10.1021/jacs.8b04078.



**CLEAVAGE BY VARIOUS MECHANISMS OF *Acinetobacter baumannii*  
CAPSULAR POLYSACCHARIDES  
BY PHAGE-ENCODED DEPOLYMERASES\***

**Y. A. Knirel<sup>1\*\*</sup>, M. M. Shneider<sup>2,3</sup>, A. V. Popova<sup>3,4,5</sup>, A. A. Kasimova<sup>1,6</sup>,  
S. N. Senchenkova<sup>1</sup>, A. S. Shashkov<sup>1</sup>, and A. O. Chizhov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
119991 Moscow, Russia; E-mail: yknirel@gmail.com

<sup>2</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, 214019 Smolensk, Russia

<sup>4</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),  
141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

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

<sup>6</sup> Higher Chemical College of the Russian Academy of Sciences, D. I. Mendeleev University  
of Chemical Technology of Russia, 125047 Moscow, Russia

Received March 11, 2020

Revised March 30, 2020

Accepted March 31, 2020

Aerobic gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* has recently become one of the most relevant pathogens associated with hospital-acquired infections worldwide. *A. baumannii* produces a capsule around the cell, which represents a thick viscous layer of structurally variable capsular polysaccharide (CPS). The capsule protects the bacteria against unfavorable environmental factors and biological systems, including bacteriophages and host immune system. Many *A. baumannii* phages have structural depolymerases (tailspikes) that specifically recognize and digest bacterial CPS. In this work, we studied the interaction of tailspike proteins of four lytic depolymerase-carrying phages with *A. baumannii* CPS. Depolymerases of three bacteriophages (Fri1, AS12, and BS46) were identified as specific glycosidases that cleave the CPS of *A. baumannii* strains 28, 1432, and B05, respectively, by the hydrolytic mechanism. The gp54 depolymerase from bacteriophage AP22 was characterized as a polysaccharide lyase that cleaves the CPS of *A. baumannii* strain 1053 by  $\beta$ -elimination at hexuronic acid (ManNAcA) residues.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*, bacteriophage, tailspike, capsular polysaccharide, hexuronic acid, depolymerase, glycosidase, polysaccharide lyase, receptor binding protein, NMR spectroscopy