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

На правах рукописи



ОВЧИННИКОВА
Ольга Геннадьевна

СТРУКТУРА И ГЕНЕТИКА БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ РОДА *PROVIDENCIA*

02.00.10 – Биоорганическая химия
03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории химии углеводов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (ИОХ РАН) и на факультете биологических наук и биотехнологии ТЕДА Нанкайского университета (г. Тянь-дзинь, КНР).

Научный руководитель: **Книрель Юрий Александрович**
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Усов Анатолий Иванович**
доктор химических наук, профессор
заведующий лабораторией
ИОХ РАН

Ивашина Татьяна Владимировна
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (Пущино, Московская обл.)

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (Оболенск, Московская обл.)

Защита состоится 11 июня 2013 г. в 12.30 часов на заседании диссертационного совета Д 002.222.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН по адресу:
119991 Москва, Ленинский проспект, 47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОХ РАН. Автореферат размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан 26 апреля 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.222.01
доктор химических наук  Родиновская Л.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Соматические О-антигены наряду с капсульными К-антигенами и жгутиковыми Н-антигенами представляют собой три основных типа биомолекул, на которых традиционно основывается классификация и идентификация грамотрицательных бактерий. С химической точки зрения О-антиген или О-специфический полисахарид (О-полисахарид, ОПС) представляет собой полисахаридную цепь S-формы липополисахарида (ЛПС) – гликоконьюгата, являющегося основным компонентом внешнего слоя наружной мембраны клеточной стенки бактерий. ОПС обычно построен из повторяющихся олигосахаридных единиц (О-звеньев) и присоединяется к липидной части ЛПС (липиду А) через другой олигосахарид, называемый кором. Полисахаридная цепь направлена в сторону окружающей среды и содержит детерминанты иммуноспецифичности (эпитопы), которые являются сайтами связывания специфических антител, вырабатываемых системой адаптивного иммунитета в ответ на инфекцию и необходимых для эффективного фагоцитоза. В ходе эволюции сформировалось широкое структурное и, соответственно, иммунологическое разнообразие О-антигенных форм даже у бактерий одного вида. Оно служит основой для разработки серологических классификационных схем микроорганизмов, в которых серологически идентичные штаммы одного вида или нескольких близкородственных видов объединены в О-серогруппы. Структурные исследования ОПС позволяют выявить корреляцию между строением и иммуноспецифичностью О-антигенов и обосновать на химическом уровне часто наблюдающиеся серологические взаимосвязи штаммов внутри и между различными бактериальными таксонами.

В последнее время активно ведется разработка методов молекулярного типирования бактерий, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и технология на основе микрочипов. На генетическом уровне различия между структурами ОПС бактериальных клонов обусловлены полиморфизмом генного кластера О-антигена (ГКО) – определенного локуса генома, отвечающего за биосинтез О-полисахарида. Исследования генетики биосинтеза О-антигенов, направленные на решение таких фундаментальных задач, как выяснение молекулярных основ биосинтеза гликополимеров и изучение эволюционных путей формирования разнообразия антигенных форм, являются актуальными для современной науки. Функциональный анализ генов, участвующих в сборке О-звена и его полимеризации, позволяет выявлять гены, специфичные для каждой О-серогруппы, и использовать их в качестве маркеров для молекулярного типирования штаммов. Генетические данные также открывают пути для разработки биотехнологических подходов к производству гликовакцин нового поколения.

В рамках систематического структурно-генетического и иммунохимического изучения О-антигенов условно-патогенных бактерий в лаборатории химии углеводов ИОХ РАН исследуется род *Providencia* семейства энтеробактерий (Enterobacteriaceae). Представители этого рода широко распространены в природе и являются частью нормальной микрофлоры кишечника человека, однако у людей с ослабленным иммунитетом они могут вызывать раневые инфекции, воспаления мочеполовых путей и кишечные заболевания, нередко становясь причиной внутрибольничных инфекций. Объединенная серологическая классификация трех наиболее важных в медицинском отношении видов *Providencia* – *P. alcalifaciens*, *P. stuartii* и *P. rustigianii* – включает 63 О-серогруппы. К началу данной работы было установлено строение ОПС 13 О-серогрупп.

Цели и задачи работы. Настоящая работа направлена на создание химической основы для классификации *Providencia* по О-антигенам и обоснование серологических взаимосвязей между штаммами этих и других бактерий. Для этого требовалось установить строение ранее не изученных О-полисахаридов провиденсий. Еще одна цель работы – выяснение особенностей генетики биосинтеза О-антигенов *Providencia.* Для ее достижения необходимо было локализовать ГКО на хромосоме, секвенировать ГКО и провести функциональный анализ генов биосинтеза О-антигенов с использованием структурных данных; при необходимости получить биохимическое подтверждение предполагаемых функций генов.

Научная новизна работы заключается в установлении структур ОПС 23 О-серогрупп *Providencia*, из которых 22 структуры являются уникальными среди бактериальных полисахаридов. Близкое серологическое родство бактерий *P. stuartii* O47 и *Shigella boydii* O5 объяснено наличием у них структурно идентичных О-антигенов. Получили обоснование серологические взаимосвязи, наблюдающиеся между некоторыми штаммами *Providencia*. В составе ОПС впервые идентифицирована 6-дезокси-L-глюкоза (L-хиновоза) и обнаружены ранее не встречавшиеся неуглеводные компоненты бактериальных гликанов, такие как (*2R,4R*)-2,4-дигидроксипентановая кислота, *N*-[(*S*)-1-карбоксиэтил]-L-аланин (аланопин) и 2-фосфо-D-глицерамид.

Впервые у бактерий *Providencia* ГКО локализован в полиморфном хромосомном локусе между генами *cpxA* и *yibK*. В секвенированных ГКО девяти О-серогрупп предсказаны функции генов, кодирующих ферменты биосинтеза О-антигенов, включая синтез специфических моносахаридных компонентов ОПС.

Практическая ценность работы. Установленные структуры О-антигенов представляют собой химическую основу серологической классификации медицински важных видов *Providencia*, необходимой для серодиагностики инфекций и эпидемиологического мониторинга. Разработанные праймеры на основе генов, фланкирующих ГКО, могут быть использованы для амплифицирования и секвенирования ГКО неизученных О-серогрупп *Providencia.* Полученные нуклеотидные последовательности ГКО, депонированные в базу данных GenBank, могут быть использованы для разработки методов молекулярного типирования природных и клинических изолятов провиденсий.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 24 статьи в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены автором на одной российской и восьми международных конференциях.

Личный вклад автора. Автор лично проводил выделение и очистку О-полисахаридов, химические анализы, интерпретацию спектров ЯМР и масс-спектров, создание библиотеки генов, биоинформатический анализ, получение рекомбинантных белков и тестирование их активности, а также участвовал в планировании экспериментов, обсуждении полученных результатов и формулировании выводов. Все статьи по материалам диссертации подготовлены при непосредственном участии автора.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, результатов и их обсуждения, экспериментальной части, выводов, а также включает список литературы, список сокращений и приложения (табулированные данные спектров ЯМР О-полисахаридов, характеристики открытых рамок считывания ГКО). Работа изложена на 164 страницах, содержит 43 рисунка, 33 таблицы и 215 литературных ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Содержание работы представлено в двух основных частях. В первой части описана общая стратегия структурного анализа, приведены установленные структуры ОПС *Providencia,* обсуждаются особенности их состава и корреляция с иммуноспецифичностью О-антигенов. Вторая часть посвящена локализации и биоинформатическому анализу секвенированных ГКО с использованием полученных структурных данных, а также биохимическому подтверждению функций генов пути биосинтеза нуклеотидного предшественника колитозы (GDP-колитозы).

1 Строение О-полисахаридов бактерий *Providencia*

1.1 Установление строения О-полисахаридов

В работе изучено строение ОПС типовых штаммов 23 О-серогрупп *Providencia* (O3, O6, O9, O22, O25, O27–O32, O34–O36, O40, O43, O44, O46-O48, O49, O57 и O60) из Венгерской национальной коллекции медицинских бактерий (Национальный институт гигиены, Будапешт). ЛПС выделяли водно-фенольной экстракцией бактериальной массы по методу Вестфаля.* Для структурного анализа ОПС, свободный от липида А, получали мягким кислотным гидролизом ЛПС, расщепляющим кетозидную связь остатка 3-дезокси-D-*манно*-окт-2-улозоновой кислоты (Kdo), которая соединяет кор с липидом А. ОПС выделяли хроматографией на геле Sephadex G-50.

Полисахариды некоторых О-серогрупп *Providencia* оказались неустойчивыми в этих условиях. Так, кислотная деградация ЛПС *P. alcalifaciens* O36 привела к деполимеризации полисахаридной цепи по гликозидным связям остатков Kdo, присутствующих в О-звене. В результате вместо ОПС была выделена смесь олигосахаридов α-L-6dTal*p*2R-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→7)-Kdo (R = H или Ac), соответствующих химическому повторяющемуся звену О-полисахарида. В боковой цепи ОПС *P. alcalifaciens* O6 присутствовали терминальные остатки 3,6-дидезокси-L-*ксило*-гексозы (колитозы), часть которых отщеплялась в условиях кислотной деградации. В обоих случаях дополнительно применялся альтернативный метод получения полимера для структурного анализа – мягкая щелочная деградация ЛПС, удаляющая О-связанные жирные кислоты в липиде А.

При необходимости полисахариды дополнительно очищали ионообменной хроматографией на геле DEAE-Trisacryl M. В случае *P. alcalifaciens* O3 это позволило отделить нейтральный ОПС от кислого полисахарида, имеющего предположительно капсульное происхождение.

Для установления строения ОПС применялась комбинация традиционных химических методов анализа и спектроскопии ^{1}H и ^{13}C ЯМР.** К первым относятся моносахаридный анализ методом ГЖХ ацетатов полиолов или ацетилированных метилгликозидов; идентификация аминокомпонентов и уроновых кислот с помощью аминокислотного и углеводного анализатора; анализ положений замещения моносахаридов методом метилирования, включающим идентификацию частично метилированных ацетатов полиолов методом ГЖХ/МС; определение абсолютных конфигурацией моносахаридов и неуглеводных компонентов (аминокислот и глицериновой кислоты, полученной из глицерамида) методом ГЖХ ацетилированных (*S*)-2-октилгликозидов и (*S*)-2-октиловых эфиров, соответственно. Для определения абсолютной конфигурации моносахарида в простом эфире маннозы с 2,4-дигидроксипентановой кислотой эфир

*Выращивание бактериальной массы проводилось в Институте микробиологии, биотехнологии и иммунологии Университета Лодзи (Польша) под руководством профессора А. Рожальски.

**Автор благодарит профессора А.С. Шашкова за съемку и помощь в интерпретации спектров ЯМР.

расщепляли действием BCl_3. Определение конфигураций *N*-(1-карбоксиэтильных) производных аминокислот – N^{ε}-(1-карбоксиэтил)лизина и *N*-(1-карбоксиэтил)аланина – потребовало их выделения в индивидуальном виде с последующим сравнением спектров ^{13}C ЯМР со спектрами синтезированных стереоизомеров и измерением величины удельного оптического вращения.

Следующая информация о структуре О-полисахаридов извлекалась из спектров ЯМР:

1. Степень регулярности, размер О-звена, природа моносахаридов и неуглеводных заместителей, наличие фосфатных групп (по одномерным спектрам ^{1}H, ^{13}C и ^{31}P ЯМР; примеры даны на рис. 1).
2. Размеры циклов и стереохимия моносахаридов, конфигурации гликозидных связей (по корреляциям в двумерных спектрах COSY, TOCSY и $^{1}H,^{13}C$ HSQC, константам спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов, характерным химическим сдвигам ^{1}H и ^{13}C ЯМР).
3. Положения гликозилирования моносахаридов и места присоединения О-ацетильных, О-алкильных и фосфатных групп (по эффектам замещения – характерным смещениям сигналов ^{13}C ЯМР).
4. Положения *N*-ацильных заместителей аминосахаров и присутствие уроновых кислот в форме амидов (по корреляциям подвижных NH-протонов с CH-протонами при съемки спектров в H_2O/D_2O и протонов с атомами С, разделенными двумя и тремя связями, в спектре $^{1}H,^{13}C$ HMBC).
5. Последовательность моносахаридов (по ядерным эффектам Оверхаузера в спектрах NOESY или ROESY, выявляющим сближенность протонов соседних остатков; по данным $^{1}H,^{13}C$ HMBC).
6. Локализация фосфатных групп (по корреляциям протонов с атомом Р в спектре $^{1}H,^{31}P$ HMBC).
7. Абсолютные конфигурации кислотолабильных моносахаридов, таких как 2,4-диамино-2,4-дидезоксифукоза (по закономерностям в эффектах гликозилирования в спектре ^{13}C ЯМР) и лактона 2,4-дигидроксипентановой кислоты (по ядерным эффектам Оверхаузера в спектре ROESY).

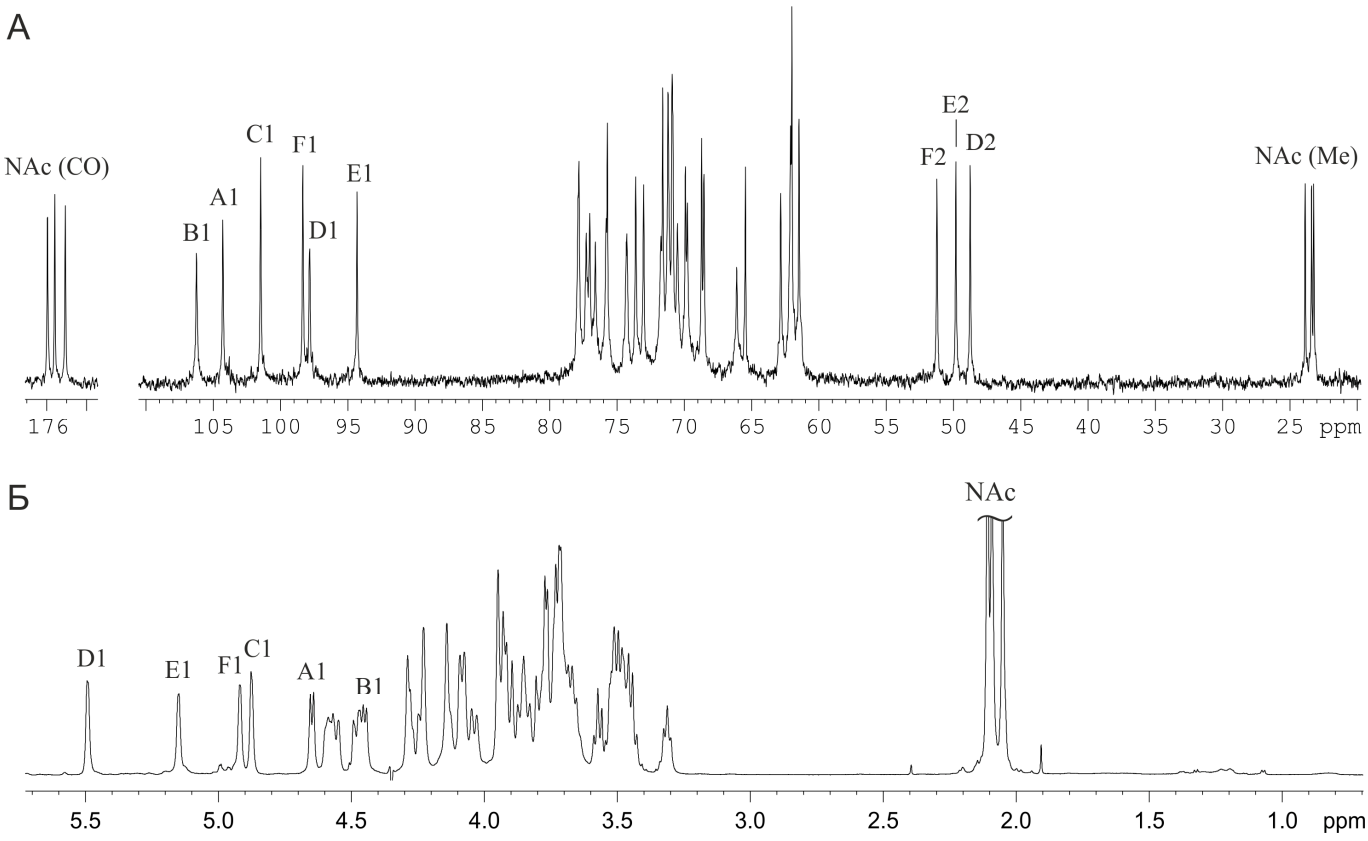


Рис. 1 – Спектры ^{13}C ЯМР (А) и ^{1}H ЯМР (Б) ОПС *P. alcalifaciens* O9. Структура ОПС приведена в таблице 1. Буквами обозначены моносахаридные остатки: A, B – Glc, C – Gal, D-F – GalNAc.

Следует отметить, что описанный ЯМР-спектроскопический подход для структурного анализа полисахаридов не является последовательным алгоритмом, однозначно приводящим к установлению структуры. Основными трудностями при расшифровке спектров являются перекрывание ключевых корреляционных пиков в двумерных спектрах ЯМР и нерегулярность структуры. Так, во многих О-серогруппах *Providencia* регулярность ОПС оказалась замаскированной наличием *О*-ацетильных групп в нестехиометрическом количестве. Для установления строения таких ОПС проводилось О-дезацетилирование действием 12% NH_4OH, анализ спектров ЯМР полученного регулярного полимера и локализация *О*-ацетильных групп по их дезэкранирующему эффекту на ядра ^1H и ^{13}C в спектрах ЯМР исходного полисахарида.

В ряде сложных случаев для подтверждения структуры ОПС подвергали распаду по Смиту, включающему окисление $NaIO_4$, восстановление $NaBH_4$ и мягкий кислотный гидролиз 2% HOAc. Полученные олигосахаридные фрагменты выделяли хроматографией на геле TSK HW-40, их строение устанавливали методами спектроскопии ЯМР, как описано выше для ОПС, и подтверждали определением молекулярных масс с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (ESI-MS).

Так, распад по Смиту ОПС *P. stuartii* O43 привел к олигосахариду с эритроновой кислотой (EryA) в виде агликона, которая образовалась из остатка GlcA, замещенного в положение 4:

→3)-β-D-Gal*p*A6-L-Ser-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→2)-α-D-Qui*p*4NAc-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→

↓ 1. $NaIO_4$; 2. $NaBH_4$; 3. HOAc

β-D-Gal*p*A6-L-Ser-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→2)-α-D-Qui*p*4NAc-(1→3)-L-EryA

При распаде по Смиту О-дезацетилированного ОПС *P. stuartii* O47 наряду с основным продуктом **1** был выделен побочный продукт **2**, являющийся результатом неполного расщепления гликозидной связи окисленного остатка Gal при мягком кислотном гидролизе:

→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→2)-β-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Man*p*-(1→3)-β-D-Man*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→

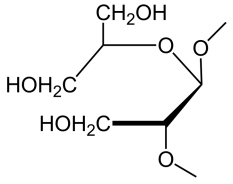
α-L-Rha*p*-(1→3)-┘

↓ 1. $NaIO_4$; 2. $NaBH_4$; 3. HOAc

β-D-Man*p*-(1→3)-β-D-Man*p*-(1→3)-L-EryA **1**

α-D-Glc*p*NAc-(1→2)-β-D-Gal*-(1→4)-β-D-Man*p*-(1→3)-β-D-Man*p*-(1→3)-L-EryA **2**

β-D-Gal* =



Для выделения необычных компонентов ОПС и олигосахаридных фрагментов применялись также другие химические подходы. Так, обработка ОПС *P. alcalifaciens* O22 48% HF привела к дефосфорилированному ОПС и первичному амиду глицериновой кислоты (GroAN), который был идентифицирован по спектру ^1H ЯМР в смеси H_2O/D_2O (9:1) и ESI-масс-спектру. Дисахаридный фрагмент α-D-Glc*p*NAc3O(*S*-lac)-(1→3)-L-Fuc*p*NAc, содержащий простой эфир GlcNAc с молочной

кислотой (lac), получен избирательным сольволизом ОПС *P. alcalifaciens* O32 трифторметансульфокислотой. Сольволиз с последующим гидролизом CF_3CO_2H использован также для выделения в индивидуальном виде *N*-(1-карбоксиэтил)аланина из ОПС *P. alcalifaciens* O35.

Большинство изученных штаммов *Providencia* продуцируют не только ЛПС S-типа, но и некоторые количества ЛПС R- и SR-типов, углеводная часть которых ограничена кором или кором с присоединенным одним О-звеном, соответственно. Благодаря этому в результате мягкой кислотной деградации ЛПС наряду с ОПС выделяли также соответствующие олигосахариды. Анализ методом ESI-MS позволил определить молекулярную массу О-звена как разницу между молекулярными массами олигосахаридов обоих типов и тем самым независимо подтвердить структуру ОПС (рис. 2).* В этом же анализе выяснялось, присутствуют ли уроновые кислоты в свободной форме или в форме первичного амида, имеющих различные молекулярные массы.

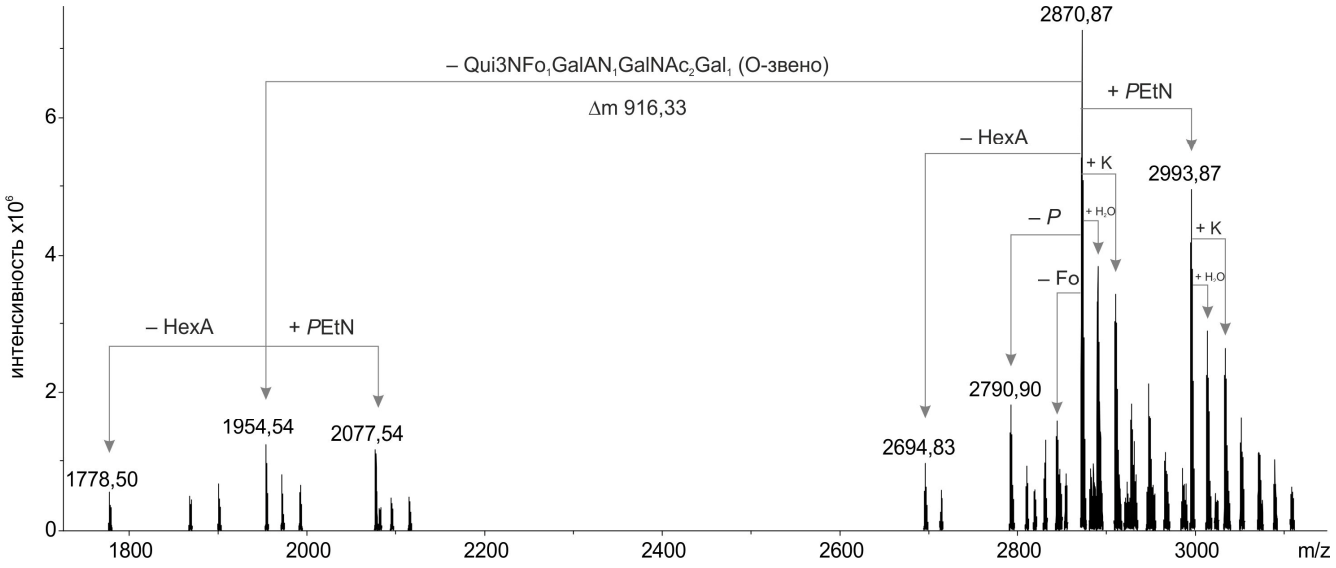


Рис. 2 – ESI-масс-спектр олигосахаридной фракции из ЛПС SR- и R-типов *P. alcalifaciens* O3. Приведены массы (Да) моноизотопных молекулярных ионов с остатком Kdo в ангидро-форме.

В штаммах трех серогрупп (O3, O9 и O34) олигосахариды, полученные из ЛПС SR-типа, подвергали дополнительной очистке методом ВЭЖХ на обращенной фазе и использовали для идентификации моносахарида О-звена, присоединенного непосредственно к кору в ЛПС SR-типа. Тем самым определяли строение биологического О-звена (см. ниже).

1.2 Особенности состава и строения О-полисахаридов

Структуры ОПС *Providencia*, установленные в настоящей работе, приведены в таблице 1. Все они специфичны для своих О-серогрупп, и, таким образом, отнесение изученных штаммов *Providencia* в отдельные О-серогруппы является обоснованным. Более того, эти структуры, за исключением ОПС серогруппы O47, являются уникальными среди известных структур бактериальных полисахаридов. Серологически родственные штаммы *P. stuartii* O47 и *Shigella boydii* O5 имеют идентичные ОПС, включая одинаковые положение и степень О-ацетилирования.

Изученные ОПС представляют собой гетерополисахариды, построенные из линейных или разветвленных О-звеньев, размер которых варьируется от трисахарида до гептасахарида. Общей особенностью большинства ОПС (~90%) является присутствие в них кислотных функций.

*Автор благодарит к.х.н. А.Н. Кондакову за съемку ESI-масс-спектров высокого разрешения.

Таблица 1 – Структуры О-полисахаридов бактерий рода *Providencia*, установленные в настоящей работе

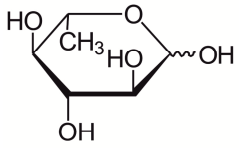
Вид и серогруппа	**Штамм**	**Структура О-полисахарида**
P. alcalifaciens O3:H3	3300/P25	→3)-α-D-Gal*p*AN-(1→4)-α-D-Gal*p*NAc-(1→4)-α-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*NAc-(1→* α-D-Qui*p*3NFo-(1→4)┘
P. alcalifaciens O6:H6	2634	→4)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→ α-Col*p*-(1→2)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→6)┘
P. alcalifaciens O9:H8	5032	→2)-β-D-Glc*p*-(1→6)-α-D-Gal*p*-(1→6)-α-D-Gal*p*NAc-(1→4)-α-D-Gal*p*NAc-(1→3)-α-D-Gal*p*NAc-(1→* β-D-Glc*p*-(1→3)┘
P. alcalifaciens O22:H21	166/49	→4)-β-D-Gal*p*NAc-(1→4)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Fuc*p*NAc4N-(1→* D-GroAN-(2–P–3)┘
P. alcalifaciens O25:K2:H4	5350/50	→6)-β-D-Gal*p*NAc-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→ *2S,8R*-alaLys-(2–6)-α-D-Gal*p*A-(1→4)┘
P. alcalifaciens O27:H17	5824/50	→2)-α-D-Qui*p*4NFo-(1→4)-α-D-Glc*p*A-(1→4)-β-D-Glc*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*NAc-(1→ ~70% AcO-6┘
P. alcalifaciens O28:H18	945/49	→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→3)-α-L-Fuc*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→ α-D-Glc*p*A-(1→3)-α-L-Fuc*p*-(1→4)┘
P. alcalifaciens O29:H2	575/48	→6)-α-D-Glc*p*NAc-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→ β-D-Glc*p*-(1→4)┘
P. alcalifaciens O30:H19	19372	→2)-β-D-Qui*p*4NFo-(1→2)-β-D-Rib*f*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-α-D-Fuc*p*NAc4N-(1→*
P. alcalifaciens O31:H-	5867	→3)-α-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*NAc-(1→3)-β-D-Gal*p*NAc-(1→ *2R,4R*-Dpa-(2–4)-β-D-Man*p*-(1→4)┘
P. alcalifaciens O32:H11	1853/49	→6)-α-D-Glc*p*NAc-(1→3)-α-L-Fuc*p*NAc-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→ *S*-lac-3┘ β-D-Glc*p*-(1→4)┘

P. rustigianii O34:H-	Hart	→4)-β-D-Glc*p*A-(1→4)-α-L-Fuc*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→2)-α-L-Fuc*p*-(1→2)-β-D-Glc*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→* α-D-Gal*p*NAc-(1→3)┘
P. alcalifaciens O35:H18	901/49	→4)-α-D-Gal*p*NAc-(1→6)-α-D-Glc*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-β-D-Gal*p*NAc-(1→ └(6←1)-β-D-Qui*p*4N-(4–2)-*2S,4S*-Alo
P. alcalifaciens O36:H-	1757/7	→7)-β-Kdo*p*-(2→3)-α-L-6dTal*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→ ~70% AcO-2┘
P. alcalifaciens O40:H23	3261/51	→4)-β-D-Qui*p*3NFo-(1→3)-α-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-β-D-Gal*p*NAc-(1→**
P. stuartii O43:H28	1746/51	→2)-α-D-Qui*p*4NAc-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-β-Gal*p*A-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→ L-Ser-6┘
P. stuartii O44:H4	3768/51	→4)-α-D-Gal*p*NAc-(1→3)-α-L-Fuc*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-(1→4)-α-L-Qui*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→ β-D-Glc*p*A-(1→4)┘
P. alcalifaciens O46:H18	1035/49	→3)-β-D-Glc*p*A-(1→4)-α-L-Fuc*p*-(1→4)-α-L-Fuc*p*-(1→2)-β-D-Glc*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→ α-D-Glc*p*-(1→3)┘ ~80% AcO-6┘
P. stuartii O47:H4	3646/51	~35% AcO-6┐ →2)-β-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Man*p*-(1→3)-β-D-Man*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-α-D-Glc*p*NAc-(1→ α-L-Rha*p*-(1→3)┘
P. alcalifaciens O48:H25	918/49	→3)-α-D-Man*p*-(1→2)-α-L-Fuc*p*-(1→2)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-α-D-Gal*p*NAc-(1→ AcO-4┘
P. stuartii O49:H4	5875/52	→4)-α-D-Gal*p*-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*NAc-(1→
P. stuartii O57:H29[в]	2615/53	→2)-α-D-Gal*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Glc*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→3)-β-D-Glc*p*NAc-(1→ ~75% AcO-2┘ L-Ala-6┘
P. alcalifaciens O60:H24	1068/56	→4)-β-D-Glc*p*-(1→3)-α-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*NAc-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→3)-β-D-Gal*p*NAc-(1→ L-Ser-6┘

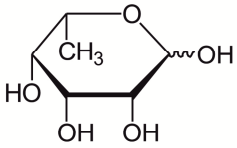
*Структура соответствует биологическому повторяющемуся звену ОПС. **В ОПС присутствует незначительное количество *O*-ацетильных групп.

Принятые сокращения в таблице 1. Моносахариды: Col – 3,6-дидезокси-L-*ксило*-гексоза (колитоза); 6dTal – 6-дезокситалоза; Fuc – фукоза; FucNAc – 2-ацетамидо-2-дезоксифукоза; FucNAc4N – 4-амино-2-ацетамидо-2,4-дидезоксифукоза; GalA, GalAN – галактуроновая кислота, галактуронамид; GlcA – глюкуроновая кислота; Qui – 6-дезоксиглюкоза (хиновоза); Qui3NFo – 3-формамидо-3-дезоксихиновоза; Qui4NAc, Qui4NFo – 4-ацетамидо-, 4-формамидо-4-дезоксихиновоза; Kdo – 3-дезокси-D-*манно*-окт-2-улозоновая кислота; Rha – рамноза. Неуглеводные заместители: alaLys – N^{ε}-(1-карбоксиэтил)лизин (аланинолизин); Alo – *N*-(1-карбоксиэтил)аланин (аланопин); Dpa – 2,4-дигидроксипентановая кислота; GroAN – глицерамид; lac – 1-карбоксиэтил; P – фосфат.

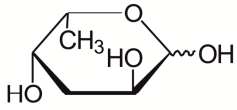
Из моносахаридов чаще всего встречаются типичные для энтеробактерий аминосахара D-GlcNAc и D-GalNAc, а также D-Glc, D-Gal и D-GlcA. Реже присутствуют D-Rib, D-Man, L-Rha, L-Fuc, D-GalA, различные 6-дезоксиаминосахара и D-FucNAc4N. Кроме того, обнаружены сахара, редко встречающиеся в бактериальных полисахаридах, такие как L-Qui, L-6dTal, Col и Kdo:



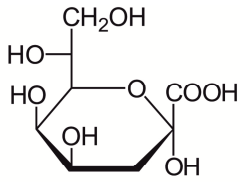
L-Qui



L-6dTal



Col



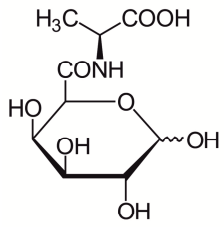
Kdo

L-Qui впервые в полисахаридах достоверно идентифицирована в настоящей работе в ОПС *P. stuartii* O44 (ранее было сделано предположение, что она входит в состав ЛПС *Legionella feeleii*). Впоследствии L-Qui была обнаружена также в ОПС *Yersinia pseudotuberculosis* O12, имеющим с ОПС *P. stuartii* O44 общий дисахаридный фрагмент α-L-Qui*p*-(1→3)-D-Glc*p*NAc.

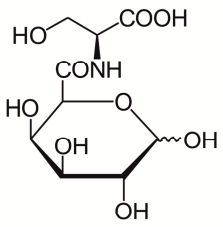
L-6dTal и Kdo входят в состав ОПС *P. alcalifaciens* O36. Ранее L-6dTal была обнаружена в ряде других гликанов, в том числе в ОПС *Escherichia coli* O88, и она ответственна за перекрестную серологическую реакцию ЛПС этой бактерии и *P. alcalifaciens* O36. Kdo является обязательным компонентом кора ЛПС, однако в ОПС ее обнаруживают редко. Кроме провиденсий, Kdo была найдена только в ОПС энтеробактерий рода *Cronobacter* и таксономически отдаленной морской бактерии *Pseudoalteromonas flavipulchra*. Интересно, что ОПС *P. alcalifaciens* O36 обладает заметным структурным сходством с полисахаридом *P. flavipulchra*, имеющим структуру →7)-α-Kdo-(2→3)-α-L-6dTal4Ac-(1→3)-β-D-Gal-(1→ и отличающимся только одним моносахаридом (Gal вместо GlcNAc), положением *O*-ацетильной группы и аномерной конфигурацией остатка Kdo.

Терминальный остаток колитозы входит в состав общего трисахаридного фрагмента α-Col-(1→2)-β-D-Gal-(1→3)-β-D-GlcNAc, который присутствует в ОПС *P. alcalifaciens* O6, *E. coli* O55 и *Salmonella enterica* O50 (две последние бактерии продуцируют идентичные ОПС) и очевидно обусловливает наблюдаемое между ними серологическое родство. Этот же трисахаридный мотив характерен для ОПС *Pseudoalteromonas tetraodonis* IAM 14160^{T}, *Aeromonas trota* и капсульного полисахарида *Vibrio cholerae* O139, но их серологические исследования не проводились. Наличие такого мотива предположительно связано с молекулярной мимикрией, позволяющей патогенным бактериям избегать адаптивного иммунного ответа. Действительно, колитоза является 3-дезокси-аналогом L-фукозы, и таким образом трисахаридный фрагмент О-антигенов имитирует антигенную детерминанту H типа 1, связанную со структурой α-L-Fuc-(1→2)-β-D-Gal-(1→3)-β-D-GlcNAc.

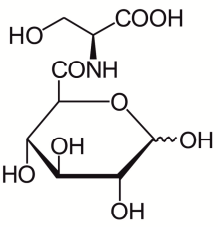
Карбоксильные группы уроновых кислот присутствуют в свободной форме или в виде амидов. В ОПС *P. alcalifaciens* O3 обнаружен первичный амид D-галактуроновой кислоты (D-GalAN), однако более распространены амиды D-GlcA и D-GalA с аминокислотами, включая L-аланин (серогруппа O57), L-серин (серогруппы O43 и O60) и производное аминокислоты семейства опинов – N^{ε}-[(*R*)-1-карбоксиэтил]-L-лизин (так называемый аланинолизин, *2S,8R*-alaLys) в серогруппе O25:



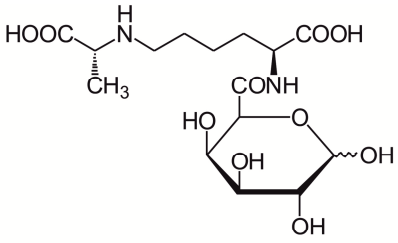
D-GalA6(L-Ala)



D-GalA6(L-Ser)



D-GlcA6(L-Ser)

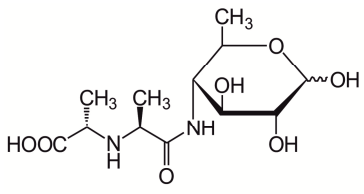


D-GalA6(*2S,8R*-alaLys)

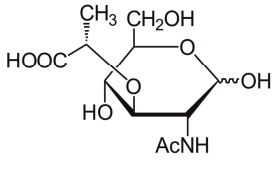
Амиды D-GlcA и D-GalA с *2S,8R*-alaLys и стереоизомерным *2S,8S*-alaLys обеспечивают перекрестную серологическую реактивность О-антигена *P. alcalifaciens* O25 и ЛПС серогрупп O14 и O23. Как оказалось, абсолютная конфигурация 1-карбоксиэтильной группы, различная в серогруппах O14, O23 и O25, существенного иммунологического значения не имеет.

Аминогруппы аминосахаров обычно ацетилированы, однако 6-дезоксиаминосахара с аминогруппой в положении 3 или 4 могут нести *N*-формильную группу. D-FucNAc4N в ОПС *P. alcalifaciens* O22 и O30, как и во всех других известных FucNAc4N-содержащих полисахаридах бактерий, имеет свободную аминогруппу в положении 4. Ее сочетание с фосфатной группой или карбоксильной группой уроновой кислоты придает указанным ОПС цвиттерионный характер. Отметим, что в отличие от нейтральных и кислых полисахаридов, которые индуцируют Т-независимый иммунный ответ без формирования иммунной памяти, цвиттерионные полисахариды являются Т-зависимыми антигенами и обладают иммуномодуляторными свойствами.

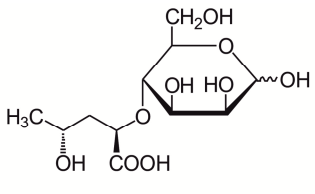
В ОПС *P. alcalifaciens* O35 присутствует еще один представитель семейства опинов – *N*-[(*S*)-1-карбоксиэтил]-L-аланин (аланопин, *2S,4S*-Alo), являющийся *N*-ацильным заместителем D-Qui4N (рис. 3). В полисахаридах бактерий он обнаружен впервые в настоящей работе и одновременно в ОПС *Proteus vulgaris* O76, а также в коре ЛПС *Proteus mirabilis* O6 и O57, где он первоначально был ошибочно идентифицирован как дипептид аланина. Благодаря присутствию аланопина ЛПС всех перечисленных бактерий дают перекрестные серологические реакции.



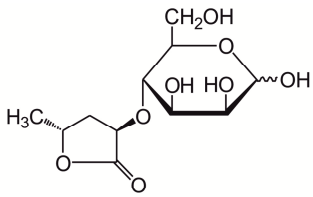
D-Qui4N(*2S,4S*-Alo)



D-GlcNAc3O(*S*-lac)



D-Man4O(*2R,4R*-Dpa)



D-Man4O(*2R,4R*-Dpl)

Рис. 3 – *N*-Аланопильное производное Qui4N и простые эфиры GlcNAc и Man с гидроксикислотами.

Кроме аминокислот, в ОПС *Providencia* обнаружены гидроксикислоты (рис. 3). В ОПС *P. alcalifaciens* O32 (*S*)-молочная кислота (*S*-lac) образует простой эфир с остатком D-GlcNAc, называемый *N*-ацетилизомурамовой кислотой. В отличие от *R*-lac-изомера – *N*-ацетилмурамовой кислоты, широко распространенной как компонент пептидогликана клеточной стенки бактерий, –

N-ацетилизомурамовая кислота ранее была обнаружена только в ОПС *Proteus penneri* O31 и O64. Интересно, что как у протея, так и у провиденсий существуют О-антигенные формы, имеющие такую же структуру основной цепи, как *S*-lac-содержащие ОПС, но отличающиеся отсутствием молочной кислоты. Таким О-антигеном, параллельным О-антигену *P. alcalifaciens* O32, является ОПС *P. alcalifaciens* O29, также изученный в настоящей работе. Идентичность углеводного скелета очевидно объясняет наблюдаемую серологическую кросс-реактивность этих бактерий.

Уникальным компонентом ОПС *P. alcalifaciens* O31 является (*2R,4R*)-2,4-дигидрокси-пентановая кислота (Dpa), которая образует простой эфир с D-Man и частично находится в форме 1,4-лактона (Dpl) (рис. 3). Это первый случай ее обнаружения в бактериальных полисахаридах. Эфир диастереомерной (*2S,4R*)-Dpa с D-GlcNAc был одновременно найден в ОПС *P. alcalifaciens* O8.

Хотя фосфорилирование нетипично для О-антигенов *Providencia*, в изученных штаммах найден ОПС, в котором фосфатная группа присутствует в составе заместителя 2-фосфо-D-глицерамида (серогруппа O22). Семь ОПС *Providencia* включают *O*-ацетильные группы, которые во всех серогруппах, за исключением O48, присутствуют в нестехиометрическом количестве.

В таблице 1 приведены установленные (для серогрупп O3, O9 и O34 в результате структурного анализа и серогрупп O22 и O30 при генетическом анализе, см. ниже) или предполагаемые структуры биологических О-звеньев – олигосахаридов, которые собираются и затем полимеризуются в ходе биосинтеза ОПС. Как и в других энтеробактериях, в ОПС *Providencia* первым моносахаридом О-звена, перенос которого из нуклеотидного предшественника на липидный носитель инициирует биосинтез О-антигена, оказался *N*-ацетил-D-гексозамин. Гликозидная связь этого моносахарида, соединяющая первое О-звено ОПС с кором и образующаяся при участии фермента лигазы (олигосахарилтрансферазы), во всех изученных ЛПС имеет β-конфигурацию. В то же время за полимеризацию О-звеньев отвечает фермент О-антиген-полимераза, и в зависимости от специфичности этого фермента гликозидная связь, соединяющая О-звенья друг с другом, может иметь как α-, так и β-конфигурацию. Например, в О-антигене *P. alcalifaciens* O9 остаток GalNAc в первом О-звене имеет β-конфигурацию, а во всех остальных звеньях – α-конфигурацию.

Наиболее часто (в 12 О-серогруппах) первым моносахаридом О-звена является GlcNAc, а в остальных О-серогруппах, за исключением O22 и O30, его место занимает GalNAc. ОПС *P. alcalifaciens* O30 не содержит в своем составе *N*-ацетилгексозаминов, а в ОПС *P. alcalifaciens* O22 к остатку GalNAc присоединен 2-фосфо-D-глицерамид, что делает его участие в инициации биосинтеза О-антигена маловероятным. Однако оба эти ОПС содержат диаминосахар FucNAc4N, известный как первый моносахарид О-звена в ОПС *Shigella sonnei*. То, что именно с этого моносахарида начинаются также О-звенья *P. alcalifaciens* O22 и O30, подтверждено в ходе функционального анализа генов биосинтеза О-антигенов этих бактерий (раздел 2.3).

Как видно из структур биологических О-звеньев, показанных в таблице 1, в ОПС 11 О-серогрупп на невосстанавливающем конце полисахаридной цепи находятся наиболее необычные компоненты (Kdo, Col, *N*-ацильные производные Qui3N и Qui4N, эфиры с lac и Dpa, амид с alaLys, фосфат GroAN). Эти терминальные группы наиболее доступны для взаимодействий с другими биологическими объектами, включая клетки иммунной системы и антитела. Их уникальность увеличивает антигенное разнообразие бактерий и может давать им преимущества в различных экологических нишах, в частности, помогать патогенам избегать защитного действия механизмов приобретенного иммунитета.

2 Характеристика генных кластеров О-антигенов *Providencia*

2.1 Локализация и организация генных кластеров О-антигенов

Гены синтеза специфических моносахаридных компонентов О-антигенов являются наиболее консервативными из генов, входящих в ГКО, и имеют высокую степень гомологии между бактериями независимо от их таксономического положения. Благодаря этому такие гены могут использоваться для локализации ГКО путем обнаружения гомологичных им открытых рамок считывания (ОРС) при полногеномном анализе бактерий с неизвестным положением ГКО. До нашей работы к таким бактериям относились и провиденсии.

Анализ секвенированных геномов двух штаммов *Providencia* с установленными структурами О-антигенов – *P. alcalifaciens* O19 и *P. stuartii* O47 (номера доступа GenBank ABXW00000000 и ABJD00000000, соответственно) выявил ОРС, гомологичные генам биосинтеза dTDP-D-Fuc3NAc, dTDP-L-Rha и GDP-D-Man – нуклеотидных предшественников моносахаридных компонентов О-антигенов этих штаммов. В обоих геномах искомые ОРС находились на хромосоме между двумя генами «домашнего хозяйства» *cpxA* и *yibK,* кодирующими двухкомпонентную сенсорную киназу и тРНК/рРНК-метилтрансферазу, соответственно. В геноме *P. rustigianii* DSM 4541 (номер доступа GenBank ABXV00000000) с неизвестной структурой О-антигена область *cpxA–yibK* также содержала гены, ассоциированные с биосинтезом полисахарида. На основании этих данных сделано предположение, что ГКО бактерий рода *Providencia* локализован между генами *cpxA* и *yibK*. Оно было подтверждено дальнейшими исследованиями.

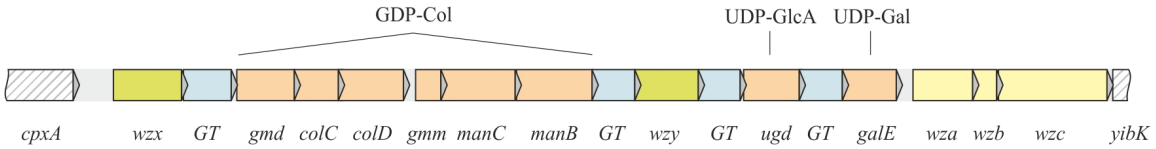
На основе нуклеотидных последовательностей фланкирующих генов *cpxA* и *yibK* разработаны праймеры, с помощью которых методом ПЦР длинных фрагментов амплифицированы ГКО штаммов *Providencia* O22, O28, O30, O36, O39, O40 и O44. Продукты ПЦР размером ~20000 пар нуклеотидов фрагментировали и клонировали в плазмидный вектор pUC18 для создания библиотеки генов и секвенирования методом дробовика. Кроме того, ГКО *P. alcalifaciens* O6, идентичный ГКО серогруппы O39 (см. ниже), был амплифицирован и секвенирован по частям, используя праймеры, созданные на основе нуклеотидной последовательности ГКО *P. alcalifaciens* O39.

Организация ГКО изученных штаммов *Providencia* и соответствующие структуры О-антигенов показаны на рис. 4. ГКО различаются по размеру и содержат от 10 до 20 ОРС, причем все они, за исключением двух генов транспозаз в ГКО *P. alcalifaciens* O22, транскрибируются в одинаковом направлении от *cpxA* к *yibK*. Функции ОРС предсказаны с помощью программы BLASTp на основании гомологии с аннотированными генами биосинтеза полисахаридов других бактерий, представленными в базе данных генетических последовательностей GenBank.

В каждом ГКО обнаружен специфический набор генов, включая а) гены биосинтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов, являющихся специфическими компонентами О-антигенов, б) гены гликозилтрансфераз, участвующих в сборке О-звена на липидном носителе на цитоплазматической стороне внутренней мембраны, и в) гены процессинга О-антигена – трансмембранного переноса О-звена и полимеризации. Функции генов, предсказанные *in silico*, соответствовали установленным структурам О-антигенов девяти штаммов, в то время как штамм *P. alcalifaciens* O39 имел ГКО, практически идентичный ГКО *P. alcalifaciens* O6, но другую структуру О-антигена, совпадающую со структурой О-антигена *P. alcalifaciens* O35 (таблица 1).

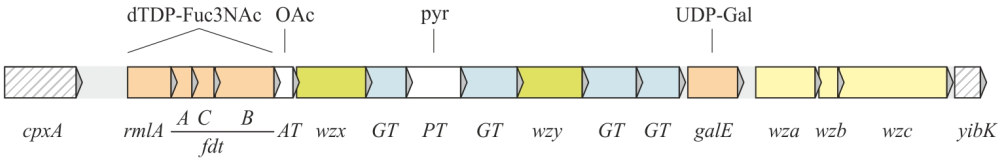
***P. alcalifaciens* O6**

→4)-β-GlcA-(1→3)-β-GlcNAc-(1→
α-Col-(1→2)-β-Gal-(1→3)-β-GlcNAc-(1→6)┘



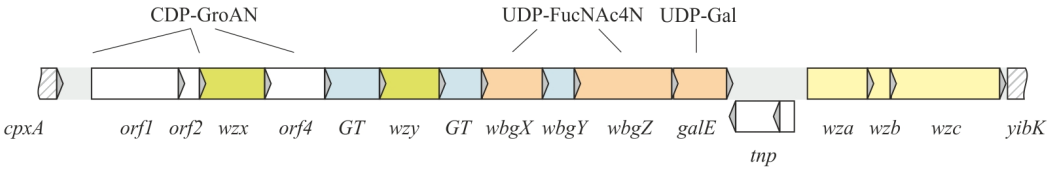
***P. alcalifaciens* O19**

→2)-β-Fuc3NAc4Ac-(1→3)-α-GlcNAc-(1→4)-α-Gal-(1→4)-β-Gal-(1→3)-β-GlcNAc-(1→
S-pyr-(2–4,6)┘



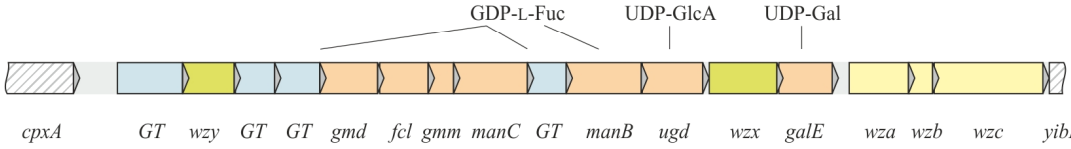
***P. alcalifaciens* O22**

→4)-β-GalNAc-(1→4)-β-Gal-(1→3)-β-FucNAc4N-(1→
D-GroAN-(2–P–3)┘



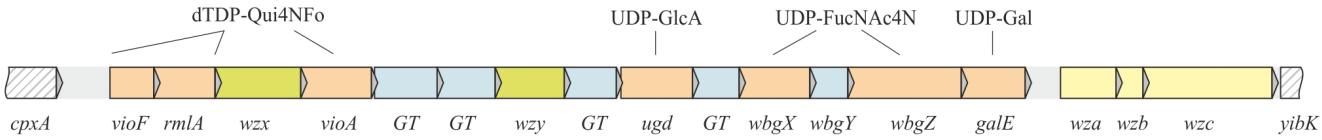
***P. alcalifaciens* O28**

→3)-β-GlcNAc-(1→3)-α-L-Fuc-(1→3)-β-GlcNAc-(1→
α-GlcA-(1→3)-α-L-Fuc-(1→4)┘



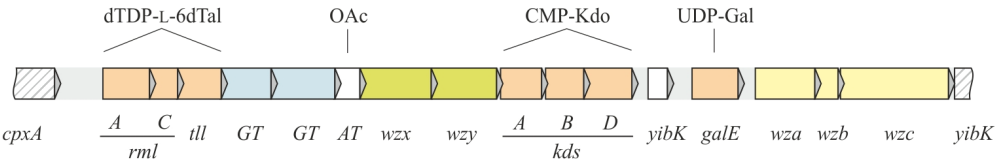
***P. alcalifaciens* O30**

→2)-β-Qui4NFo-(1→2)-β-Rib-(1→4)-β-GlcA-(1→4)-β-GlcA-(1→3)-α-FucNAc4N-(1→



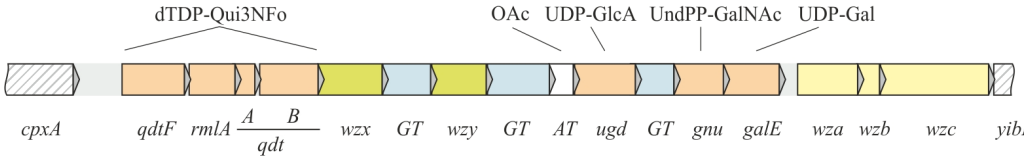
***P. alcalifaciens* O36**

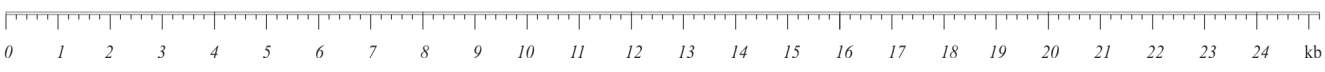
→7)-β-Kdo-(2→3)-α-L-6dTal-(1→3)-α-GlcNAc-(1→
AcO-2┘ (~70 %)



***P. alcalifaciens* O40**

→4)-β-Qui3NFo-(1→3)-α-Gal-(1→3)-β-GlcA-(1→3)-β-GalNAc-(1→





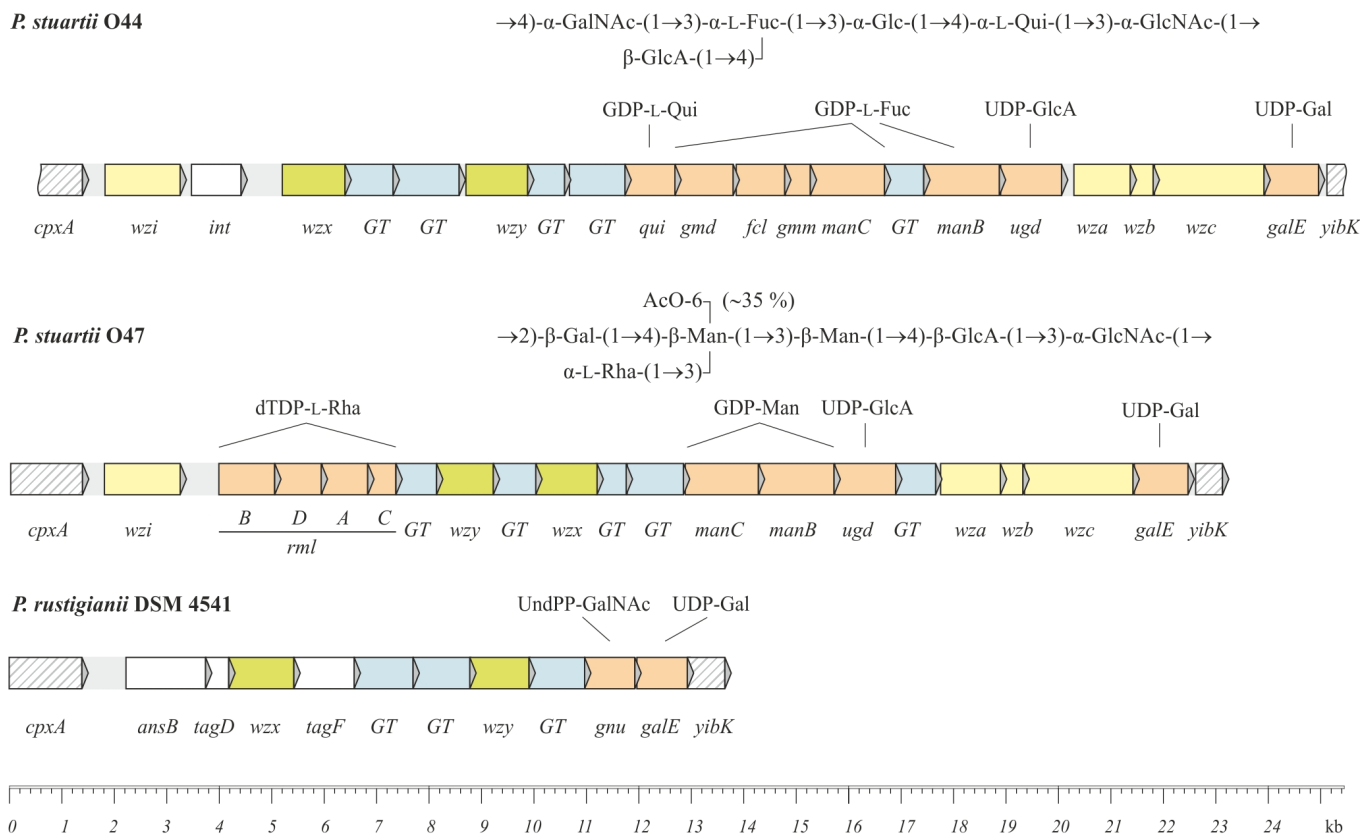


Рис. 4 – Организация ГКО *Providencia*. Гены трансфераз обозначены следующим образом: GT – гликозилтрансфераза, AT – ацетилтрансфераза, PT – пируваттрансфераза. Приведенные структуры О-антигенов, за исключением О-антигена *P. alcalifaciens* O19, установлены в настоящей работе. pyr – 1-карбоксиэтилиден (ацеталь пировиноградной кислоты). Нуклеотидные последовательности ГКО серогрупп O22, O28, O30, O36, O39 (>99% идентичности с ГКО серогруппы O6), O40 и O44 депонированы в базу данных GenBank под номерами JQ417203, JQ319041, JQ801294, HM583639, JN097785, HM583640 и JN097784, соответственно. ГКО *P. rustigianii* DSM 4541 показан как еще один пример, демонстрирующий гетерогенность области *cpxA–yibK*, но не был включен в анализ, так как структура его О-антигена неизвестна.

Как и в других изученных энтеробактериях, ГКО *Providencia* отличаются пониженным содержанием GC-пар по сравнению с геномом в целом (31–36% против 41%), причем их наименьшим содержанием обладают гены процессинга О-антигена *wzx* и *wzy*. Это может объясняться приобретением ГКО путем горизонтального переноса от других бактерий, но остается неясным, почему содержание GC-пар в ГКО всегда ниже по сравнению со среднегеномным.

Для удобства дальнейшего изложения гены ГКО условно разделены на четыре группы в соответствии с их предполагаемыми функциями.

2.2 Гены биосинтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов

Пути биосинтеза специфических моносахаридных компонентов О-антигенов штаммов *Providencia* с секвенированными ГКО представлены на рис. 5. Гены синтеза нуклеотидных предшественников распространенных моносахаридов (UDP-Glc, UDP-GlcNAc и ADP-Rib) являются генами “домашнего хозяйства” и в ГКО не дублируются. UDP-Gal и UDP-GalNAc синтезируются путем обратимой 4-эпимеризации UDP-Glc и UDP-GlcNAc, катализируемой ферментами GalE и Gne, соответственно. В бактериях, способных утилизировать экзогенную галактозу, ген *galE* вместе с генами *galT* и *galK* находится в галактозном опероне. Вне gal-оперона

различить *galE* и *gne* только на основании гомологии ДНК трудно. Это связано как с ограниченным числом биохимически охарактеризованных ферментов, так и с тем, что каждая из 4-эпимераз может проявлять обе активности, обладая большей специфичностью по отношению к UDP-Glc/Gal, UDP-GlcNAc/GalNAc или одинаковой специфичностью к обоим субстратам.



Рис. 5 – Пути биосинтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов, входящих в изученные О-антигены *Providencia.* Предсказанные пути, не подтвержденные биохимически, обозначены пунктиром. Расшифровка принятых сокращений моносахаридов дана в примечании к таблице 1. *Фермент кодируется геном вне ГКО, который дублируется в ГКО только в составе оперона *rmlBDAC*. **Фермент кодируется геном вне ГКО.

Полногеномный поиск гомологов генов UDP-Glc 4-эпимеразы и UDP-GlcNAc 4-эпимеразы в *P. alcalifaciens, P. stuartii* и *P. rustigianii* выявил два гомолога *galE,* один из которых расположен в gal-опероне (кроме *P. alcalifaciens*), а другой в ГКО. Гомолог *galE* располагается на 3'-конце ГКО *Providencia* рядом с генами *wza, wzb, wzc* (см. ниже) в консервативной области, отличающейся от остальной части ГКО содержанием GC-пар, близким к среднегеномному. В штамме *P. alcalifaciens* O19, лишенном gal-оперона, но содержащем галактозу в О-антигене, *galE* очевидно кодирует UDP-Glc 4-эпимеразу. В ГКО *P. alcalifaciens* O22 и *P. stuartii* O44, О-антигены которых содержат GalNAc, единственным кандидатом, которому можно приписать функцию *gne*, также является *galE*. Этот ген вместе с генами *wz* сохраняется и в ГКО серогрупп, в которых UDP-предшественники Gal и GalNAc не требуются для синтеза О-антигена, в то время как остальная часть ГКО варьируется от серогруппы к серогруппе.

В О-антигене *P. alcalifaciens* O40 первым моносахаридом биологического повторяющегося звена является GalNAc. У энтеробактерий его предшественником является не нуклеотидное, а липидное производное UndPP-GalNAc, которое синтезируется 4-эпимеризацией UndPP-GlcNAc, образующегося из UDP-GlcNAc и ундекапренилфосфата (UndP). Соответственно для синтеза UndPP-GalNAc необходима другая 4-эпимераза, которую, однако, долгое время не отличали от UDP-GlcNAc 4-эпимеразы и называли также Gne. Недавно для их различения было предложено переименовать UndPP-GlcNAc 4-эпимеразу в Gnu. Гомолог *gnu* найден в ГКО *P. alcalifaciens* O40, а также *P. rustigianii* DSM 4541, структура О-антигена которого не установлена.

Специфическими моносахаридными компонентами О-антигенов серогрупп O19, O30, O36, O40 и O47 являются D-Fuc3NAc, D-Qui4NFo, L-6dTal, D-Qui3NFo и L-Rha, соответственно. Биосинтез их нуклеотидных предшественников протекает через общий интермедиат dTDP-6-дезокси-D-*ксило*-гексоз-4-улозу, образующуюся из глюкозо-1-фосфата в две стадии, катализируемые тимидилтрансферазой RmlA и 4,6-дегидратазой RmlB (рис. 5). Для синтеза dTDP-L-Rha в ГКО *P. stuartii* O47 имеется полный набор генов *rmlBDAC*, тогда как для синтеза dTDP-производных остальных четырех сахаров найдены все ожидаемые гены, за исключением *rmlB*. Это позволило предположить, что *rmlB* находится вне области *cpxA–yibK*. Действительно, полногеномный анализ штаммов *P. alcalifaciens, P. stuartii* и *P. rustigianii* выявил гомологи *rmlA* и *rmlB* [номера доступа GenBank EEB46719, EDU58095, EFB72495 (*rmlA*) и EEB46720, EDU58094, EFB72496 (*rmlB*)] в генном кластере общего энтеробактериального антигена (ОЭА), так как оба эти гена необходимы для синтеза D-Fuc4NAc – одного из компонентов ОЭА. Таким образом, *rmlA* дублируется в ГКО всех штаммов, О-антигены которых содержат указанные выше 6-дезоксисахара, а *rmlB* дублируется только в составе оперона *rmlBDAC* для синтеза dTDP-L-Rha. Превращение dTDP-D-Qui3N и dTDP-D-Qui4N в dTDP-D-Qui3NFo и dTDP-D-Qui4NFo требует участия формилтрансфераз, и кодирующие их гены *qdtF* и *vioF* обнаружены в ГКО *P. alcalifaciens* O40 и O30, соответственно. Функция *vioF* как dTDP-D-Qui4N формилтрансферазы подтверждена биохимически.*

Для предшественников остальных моносахаридов с известными путями биосинтеза – UDP-GlcA, GDP-D-Man, GDP-L-Fuc и GDP-Col – все ожидаемые гены найдены в ГКО соответствующих штаммов *Providencia*.

Нуклеотидный предшественник D-FucNAc4N, входящего в состав О-антигенов *P. alcalifaciens* O22 и O30, предположительно синтезируется из UDP-GlcNAc в две стадии, катализируемые специфической 4,6-дегидратазой и аминотрансферазой (рис. 5). Этот компонент и гены обоих ферментов ранее были найдены у бактерии *Shigella sonnei.* Если идентификация *wbgX* как гена аминотрансферазы не вызывала сомнений, то на ген 4,6-дегидратазы в ГКО *S. sonnei* было два кандидата – *wbgZ* и *wbgV*. В ГКО провиденсий серогрупп O22 и O30 найдены гомологи *wbgX* и *wbgZ*. Отсутствие *wbgV* свидетельствует о том, что 4,6-дегидратаза кодируется геном *wbgZ*, однако для окончательного решения этого вопроса необходимо биохимическое подтверждение.

В отличие от многих других 6-дезоксисахаров, путь биосинтеза L-хиновозы в бактериях оставался неизвестным, вероятно, из-за низкой распространенности этого моносахарида в полисахаридах. Недавнее обнаружение L-Qui в О-антигене *Yersinia pseudotuberculosis* O12 и анализ его ГКО, включая сравнение с ГКО *P. stuartii* O44, указывает на то, что GDP-L-Qui

*Подтверждение функции *vioF* было проведено B. Liu (Нанкайский университет, Тянь-дзинь, КНР).

синтезируется в одну стадию из GDP-L-Fuc с помощью специфической 4-эпимеразы, названной Qui. Гомолог Qui, кодируемый в ГКО *P. stuartii* O44, на 54,5% идентичен Qui *Y. pseudotuberculosis* и очевидно выполняет такую же функцию.

Kdo является обязательным компонентом кора ЛПС всех энтеробактерий, включая *Providencia*. Четыре гена *kdsABCD* для синтеза CMP-производного Kdo (рис. 5) обычно разбросаны по хромосоме. В штамме *P. alcalifaciens* O36, содержащем Kdo не только в коре, но и в О-антигене, три из четырех генов, кодирующие KdsD, KdsA и KdsB, дублируются в ГКО. Интересно, что гены синтеза CMP-Kdo в ГКО *P. alcalifaciens* обладают большей степенью сходства на аминокислотном уровне с гомологичными генами морских бактерий (*Marinomonas*, *Pseudoalteromonas, Vibrio* sp.), чем с генами синтеза Kdo кора *Providencia*, находящимися вне ГКО. Эти данные и близкое структурное сходство полисахаридов *P. alcalifaciens* O36 и *Pseudoalteromonas flavipulchra* позволяет предположить, что гены *kds* в ГКО *Providencia* были приобретены путем горизонтального переноса. Отметим, что в двух штаммах *Cronobacter sakazakii* O5 и O6, О-антигены которых также содержат Kdo, но не обладают структурным сходством с О-антигеном *P. alcalifaciens* O36, гены для синтеза CMP-Kdo не дублируются в ГКО. Таким образом, у различных бактерий для синтеза кора и О-антигена могут использоваться ферменты пути синтеза CMP-Kdo, кодируемые одними и теми же генами (*C. sakazakii*) или двумя различными наборами генов (*P. alcalifaciens*).

2.3 Гены гликозилтрансфераз

GlcNAc и GalNAc присутствуют в О-антигенах большинства серогрупп *Providencia* и, как и в других энтеробактериях, один из них предположительно является первым моносахаридом биологического О-звена. Это подтверждено в настоящей работе структурным анализом ЛПС SR-типа трех О-серогрупп *Providencia,* а также лит. данными для *P. rustigianii* O14 и *P. alcalifaciens* O19.

Синтез этих О-антигенов инициируется переносом GlcNAc-1-фосфата с UDP-GlcNAc на липидный акцептор UndP с помощью гликозилфосфаттрансферазы WecA, которая в отличие от гликозилтрансфераз, растворенных в цитозоле, является мембраносвязанным белком. У всех ранее изученных энтеробактерий ген *wecA* находится в генном кластере биосинтеза ОЭА и в ГКО не дублируется. В доступных геномах *Providencia* гомолог *wecA* также найден только в генном кластере ОЭА (номера доступа GenBank EEB46724, EDU58090, EFB72500), и очевидно кодируемый им фермент WecA участвует в синтезе как ОЭА, так и О-антигена.

В ГКО *P. alcalifaciens* O22 и O30 найдены гомологи гена *wbgY,* кодирующего другую гликозилфосфаттрансферазу. WbgY *Providencia* на 55% идентична WbgY *Shigella sonnei,* предполагаемой функцией которой является инициация биосинтеза О-антигена путем переноса FucNAc4N-1-фосфата на UndP (то, что FucNAc4N является первым моносахаридом О-звена *S. sonnei*, подтверждено структурным анализом). О-Антигены серогрупп O22 и O30 также содержат FucNAc4N, и, таким образом, этот диаминосахар является первым моносахаридом в О-звеньях и этих бактерий, тем более что в О-антигене серогруппы O30 нет других *N*-ацетил-D-гексозаминов, которые могли бы играть роль инициирующего моносахарида.

Для сборки UndPP-связанных три-, тетра-, пента- и гексасахаридных О-звеньев необходимо две, три, четыре и пять индивидуальных гликозилтрансфераз, соответственно. Нужное число генов гликозилтрансфераз найдено в ГКО всех штаммов *Providencia* с известными структурами

О-антигенов, за исключением серогруппы О36 (рис. 4). ГКО *P. alcalifaciens* О36 с Kdo-содержащим трисахаридным О-звеном включал только один ген, имеющий явную гомологию с генами гликозилтрансфераз. Единственным кандидатом на роль второй гликозилтрансферазы был продукт ОРС-5, гомологичный белкам KpsS, которые участвуют в биосинтезе К-антигенов ряда бактерий и предположительно отвечают за присоединение К-антигена к фосфатидил-Kdo. Кроме того, продукт ОРС-5 на 37% идентичен предсказанной методом исключения гликозилтрансферазе WepM, кодируемой в ГКО *Cronobacter sakazakii* О6, О-антиген которого также содержит Kdo.

Гликозилтрансферазы специфичны к гликозилдонору, гликозилакцептору, а также к положению и конфигурации создаваемой ими гликозидной связи, что обуславливает большое разнообразие этих ферментов. Лишь немногие из них охарактеризованы биохимически, и вследствие этого отнесение к конкретным гликозидным связям генов гликозилтрансфераз, участвующих в биосинтезе О-антигенов *Providencia,* в настоящей работе не проводилось.

2.4 Гены процессинга О-антигена

Белки Wzx и Wzy – О-антиген флиппаза и О-антиген полимераза, обеспечивающие перенос UndPP-связанного О-звена через внутреннюю мембрану и его полимеризацию, соответственно. Они являются гидрофобными мембранными белками, имеющими характерную топологию с множественными трансмембранными сегментами. Гены *wzx* и *wzy* найдены во всех изученных ГКО *Providencia*, и, следовательно, соответствующие О-антигены синтезируются по Wzx/Wzy-зависимому пути, типичному для гетерополисахаридов бактерий с О-звеном от трисахарида и выше.

Белки Wzx и Wzy отличаются низкой степенью идентичности со своими гомологами (у *Providencia* 26-45% и 25-37%, соответственно), и, таким образом, они специфичны для каждой О-серогруппы. Это делает *wzx* и *wzy* перспективными кандидатами в гены, на основе которых может быть разработан метод молекулярного типирования природных и клинических изолятов провиденсий.

Третий компонент Wzy/Wzx-зависимого процессинга – мембранный белок Wzz, модулирующий распределение длин цепи О-антигена, – обычно кодируется геном вне ГКО. В трех полностью секвенированных геномах *Providencia* гомологи *wzz (fepE)* (номера доступа GenBank EEB45532, EDU60377, EFB71782) также найдены вне ГКО в кластере генов, ассоциированных с синтезом и транспортом хелатора железа энтеробактина (энтерохелина).

2.5 Другие гены

В ГКО *P. alcalifaciens* О19 и О36 найдены гомологи генов О-ацетилтрансфераз, которые предположительно отвечают за 4-О-ацетилирование UDP-D-Fuc3NAc и 2-О-ацетилирование dTDP-L-6dTal, соответственно. Белковый продукт ОРС-10 в ГКО *P. alcalifaciens* О40 является гомологом предполагаемой ацетилтрансферазы *Bacteroides thetaiotaomicron*, ответственной за О-ацетилирование остатка галактозы. Это согласуется с присутствием минорной О-ацетильной группы в О-антигене серогруппы О40, хотя ее положение на остатке галактозы химически не подтверждено. ГКО серогруппы О19 содержит гомолог гена пируваттрансферазы, роль которой очевидно заключается в синтезе ацеталя пировиноградной кислоты на остатке GlcNAc.

В О-антигене *P. alcalifaciens* О22 присутствует D-глицерамид-2-фосфат. Биосинтез

нуклеотидного производного D-GroAN предположительно начинается с 2-фосфо-D-глицерата, который является интермедиатом в гликолизе. Белковый продукт ОРС-2 в ГКО серогруппы О22 на 82% идентичен глицеро-3-фосфат цитидилтрансферазе, а ОРС-1 на 60% идентичен аспарагинсинтетазе, катализирующей амидирование карбоксильной группы аспартата. Таким образом, можно предположить, что эти гены ответственны за двухстадийный синтез CDP-GroAN, включающий нуклеотид-активацию 2-фосфо-D-глицерата и амидирование. Продукт ОРС-4 является гомологом CDP-глицерофосфаттрансферазы и очевидно необходим для переноса GroAN-2-фосфата с CDP-GroAN на остаток GalNAc.

Кроме фланкирующего гена *yibK*, в ГКО *P. alcalifaciens* О36 присутствует его дефектный гомолог, инактивированный в результате нонсенс-мутации. В ГКО *P. alcalifaciens* О22 и *P. stuartii* О44 найдены гены транспозазы и интегразы, соответственно, известных как белки, обеспечивающие транспозицию мобильных генетических элементов.

Интригующей особенностью ГКО *P. alcalifaciens* и *P. stuartii* является присутствие на 3'-конце консервативной группы генов, представляющих собой гомологи *wza, wzb* и *wzc*. Эти гены не относятся к биосинтезу О-антигенов, но у бактерий *E. coli* они участвуют в синтезе и транслокации К-антигенов групп 1 и 4, которые могут экспрессироваться в липид А-связанной форме, образуя так называемые К-ЛПС. Кроме этих трех генов, в ГКО *P. stuartii* О44 и О47 найден гомолог гена *wzi,* который кодирует мембранный белок, специфичный для К-антигенов группы 1. Присутствие гомологов этих генов в ГКО свидетельствует о связи О-антигенов с К-антигенами также и у провиденсий, однако их точную роль в экспрессии поверхностных полисахаридов этих бактерий еще предстоит выяснить.

2.6 Биохимическое подтверждение функций генов биосинтеза GDP-колитозы

В то время как у всех остальных исследованных О-серогрупп ГКО отвечал структуре О-антигена, для серогруппы О39 такого соответствия не наблюдалось. В частности, анализ не выявил генов *rmlA, rmlB, vioA*, необходимых для синтеза dTDP-D-Qui4N, и гена *gnu* для синтеза UndPP-GalNAc – предшественников компонентов О-антигена этой О-серогруппы. Вместо этого присутствовали гомологи генов *manB* и *manC* пути биосинтеза GDP-маннозы, а также гомолог гена GDP-Man 4,6-дегидратазы (*gmd*) и еще два гена биосинтеза нуклеотидных предшественников сахаров (ОРС-4 и ОРС-5), которые очевидно участвуют в дальнейших превращениях GDP-Man. Продукт ОРС-4 принадлежит к семейству NAD-зависимых эпимераз/дегидратаз и обладает наибольшей идентичностью с GDP-L-Fuc синтазой ряда бактерий, а также гомологичен предполагаемому белку биосинтеза GDP-колитозы *Salmonella enterica.* Продукт ОРС-5 относится к суперсемейству пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимых аспартатных аминотрансфераз и обладает до 64% идентичности с аминотрансферазами различных бактерий. Высокая гомология наблюдалась также с предсказанной пиридоксамин-5-фосфат (PMP)-зависимой дегидразой *E. coli* О111. Таким образом, продукты ОРС-4 и ОРС-5 имеют высокую степень сходства с ферментами, участвующими в биосинтетических путях разных моносахаридов и имеющими различные функции, но при этом не играют очевидной роли в синтезе О-антигена серогруппы О39.

Для подтверждения функции *gmd* и выяснения функций ОРС-4 и ОРС-5 три кодируемых ими белка из *P. alcalifaciens* О39 были экспрессированы в *E. coli* BL21 в растворимой форме с С-терминальным His_6 тэгом и очищены никель-аффинной хроматографией.

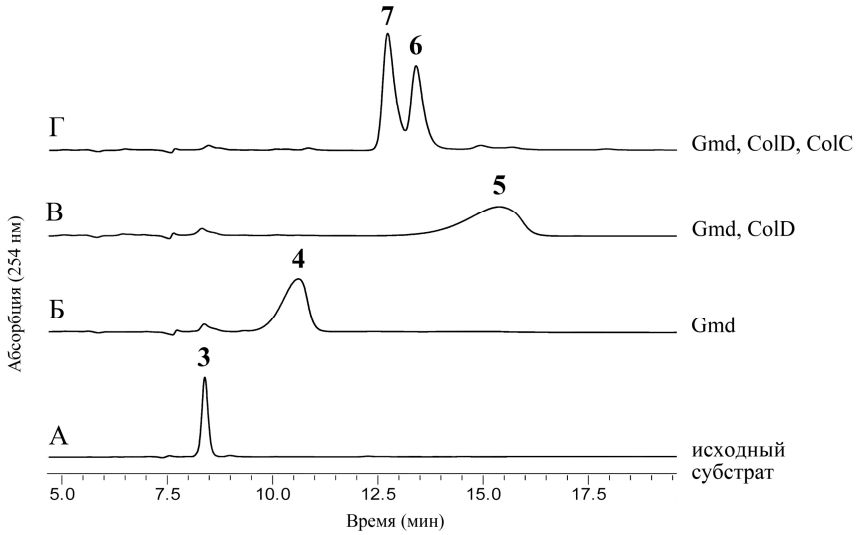


Рис. 6 – Анализ ВЭЖХ на обращенной фазе исходного субстрата (А) и продуктов реакций (Б-Г), катализируемых ферментами, указанными справа. **3** – GDP-D-Man, **4** – GDP-6-дезокси-D-*ликсо*-гексоз-4-улоза, **5** – GDP-3,6-дидезокси-D-*трео*-гексоз-4-улоза, **6** – GDP-Col, **7** – NAD^+. Время удерживания NADH составляет 41,5 мин, и его пик не показан.

4,6-Дегидратазная активность Gmd подтверждена инкубированием GDP-D-Man с Gmd и последующим анализом продуктов реакции методом ВЭЖХ. Субстрат GDP-D-Man **3** (рис. 6А) полностью превращался в продукт **4**, элюирующийся в виде широкого пика (рис. 6Б). ESI-масс-спектр **4** содержал пик иона $[M-H]^-$ при *m/z* 586, и, следовательно, молекулярная масса продукта **4** на 18 Да меньше по сравнению с исходным субстратом **3**, дававшим в ESI-масс-спектре пик иона $[M-H]^-$ при *m/z* 604. Таким образом, **4** является продуктом дегидратации **3**.

Для мониторинга методом спектроскопии ЯМР реакцию с Gmd проводили в ЯМР-ампуле и идентифицировали продукт **4** непосредственно в реакционной смеси (рис. 7А,Б). В первые несколько минут после добавления Gmd наблюдалось снижение концентрации GDP-D-Man **3** и появление сигналов GDP-6-дезокси-D-*ликсо*-гексоз-4-улозы **4**, существующей в равновесии с гем-диольной формой **4'** в соотношении ~3:1. Соединение **4'** давало такие же корреляционные картины в двумерных спектрах COSY и TOCSY, но все сигналы ^{1}H ЯМР были сдвинуты в сильное поле по сравнению с кето-формой **4**. Идентификация **4'** как гем-диольной формы **4** показывает ошибочность предположения, что **4'** представляет собой 3-кето-изомер **4**, которое было сделано ранее при исследовании пути биосинтеза GDP-D-Rha у бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

Добавление белкового продукта ORC-5 и L-глутамата в реакционную смесь, содержащую **4** и **4'**, привело к образованию нового продукта **5**, который также элюировался в виде широкого пика, что указывало на сохранение кето-группы (рис. 6В). Известно, что функция аспартатных аминотрансфераз требует L-глутамата и кофактора PLP, и, действительно, при отсутствии L-глутамата конверсии **4** не наблюдалось. В то же время экзогенный PLP не был необходим для образования **5**, и это заставило предположить, что продукт ORC-5 был очищен в виде комплекса с эндогенным PLP. Присутствие PLP подтверждалось УФ-абсорбцией раствора фермента, наблюдавшейся при 326 нм, а его рассчитанное насыщение кофактором составляло ~10%.* ESI-масс-спектр **5** содержал пик иона $[M-H]^-$ при *m/z* 570, который указывал на уменьшение молекулярной массы на 16 Да по сравнению с исходным соединением **4**, то есть на его дезоксигенирование.

*Автор благодарит профессора Т.В. Демидкину за помощь в определении PLP.

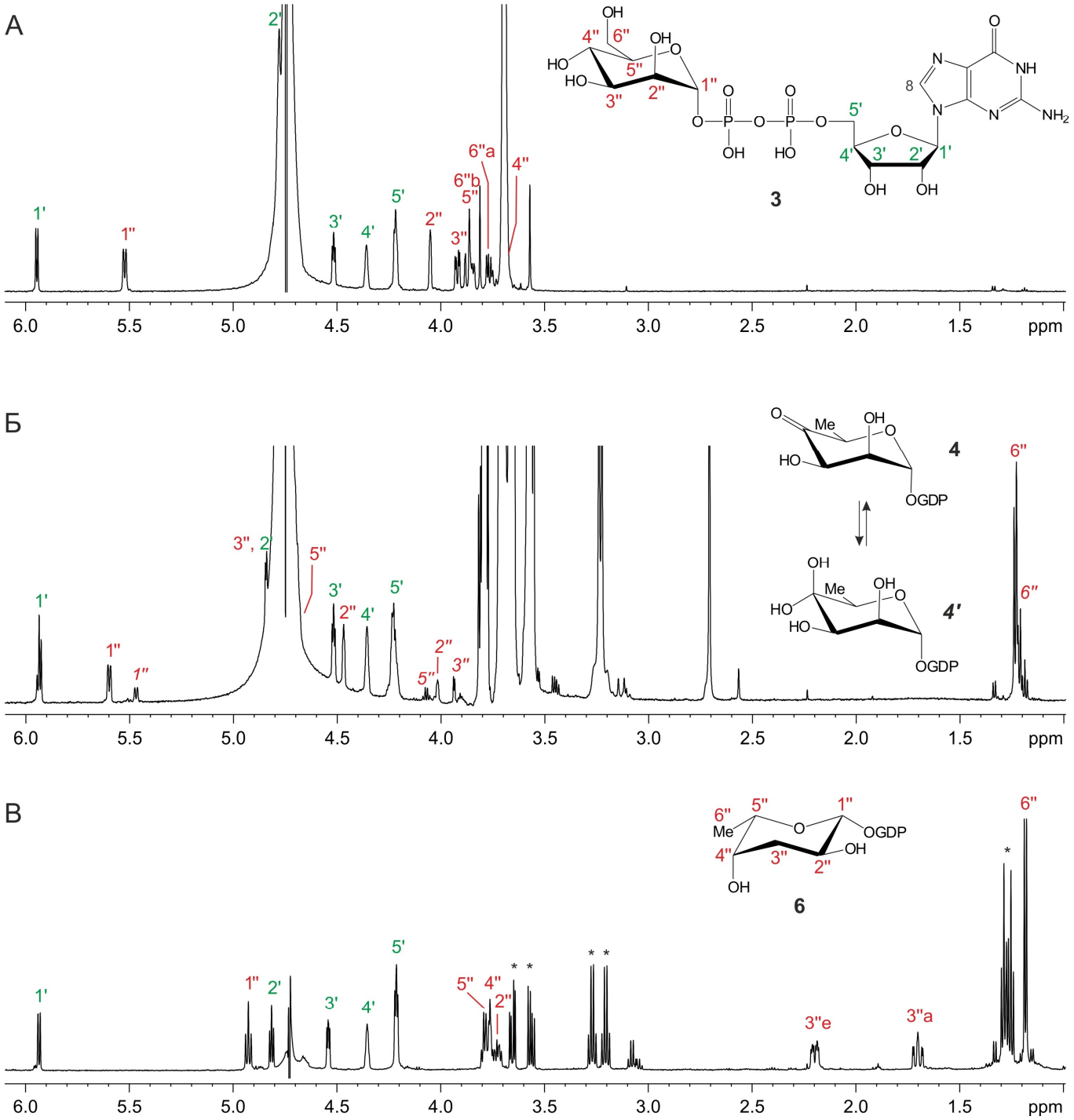


Рис. 7 – Спектры ^{1}H ЯМР исходного субстрата GDP-Man **3** (А), GDP-6-дезокси-D-*ликсо*-гексоз-4-улозы **4** (в равновесии с гем-диольной формой **4'**, отнесение сигналов которой показаны курсивом) (Б) и конечного продукта GDP-Col **6** (В). Спектры **3** и **4** записаны в реакционном буфере (10% D_2O, 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5), спектр **6** снят в D_2O. Сигнал H8 гуанина при 8,10 м.д. на спектрах не показан. Звездочкой отмечены сигналы примесей этанола, глицерина и триэтиламина.

Добавление к реакционной смеси белкового продукта OPC-4 и NADH привело к образованию соединения **6**, сопровождавшемуся конверсией NADH в NAD^+ (рис. 6Г). ESI-масс-спектр **6** содержал ионный пик $[M-H]^-$ при *m/z* 572, и, следовательно, молекулярная масса этого соединения увеличилась на 2 Да по сравнению с **5**, что указывало на восстановление кето-группы. Продукт **6**, элюирующийся в виде острого пика, был очищен ВЭЖХ и с помощью спектроскопии ^{1}H, ^{13}C и ^{31}P ЯМР идентифицирован как GDP-3,6-дидезокси-L-*ксило*-гексоза (GDP-колитоза)

(рис. 7В). Из этих данных следовало также, что исходное соединение **5** являлось GDP-3,6-дидезоксигексоз-4-улозой.

Таким образом, ОРС-4 и ОРС-5 являются гомологами генов *colC* и *colD* пути биосинтеза GDP-колитозы (рис. 8). ОРС-5 (*colD*) кодирует PLP-зависимую GDP-6-дезокси-D-*ликсо*-гексоз-4-улоза 3-дезоксигеназу, катализирующую 3-дезоксигенирование продукта Gmd в присутствии L-глутамата (реакция протекает через промежуточное образование основания Шиффа с последующей β-дегидратацией и гидролизом образующегося енамина). ОРС-4 (*colC*) кодирует бифункциональную GDP-3,6-дидезокси-D-*мрео*-гексоз-4-улоза 5-эпимеразу/4-редуктазу, которая катализирует превращение продукта ColD в GDP-Col. Ранее путь биосинтеза GDP-Col был биохимически охарактеризован только в *Yersinia pseudotuberculosis*, и наше исследование показало, что *P. alcalifaciens* использует тот же путь синтеза этого нуклеотидного предшественника.

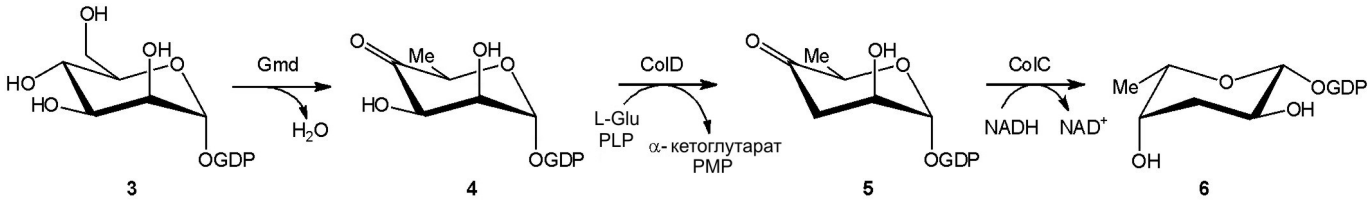


Рис. 8 – Путь биосинтеза GDP-Col **6**.

Как уже отмечалось, ГКО *P. alcalifaciens* O39 в области *cpxA–yibK* в целом и присутствие генов пути биосинтеза GDP-Col в частности не соответствует структуре О-антигена, который не содержит колитозу. В то же время колитоза является компонентом О-антигена *P. alcalifaciens* O6, и ГКО этой бактерии, полностью соответствующий структуре ее О-антигена (рис. 4), практически не отличается от ГКО *P. alcalifaciens* O39 (>99% идентичности ДНК, гены *colC* и *colD* попарно идентичны на 100%). Можно предположить, что штамм *P. alcalifaciens* O39 произошел от штамма *P. alcalifaciens* O6 путем инактивации ГКО в области *cpxA–yibK* и приобретения другого генного кластера для синтеза существующего О-антигена, расположившегося в другом месте генома. Для локализации этого альтернативного ГКО необходимо полногеномное секвенирование *P. alcalifaciens* O39.

* * *

Таким образом, идентичность ГКО *Providencia*, впервые локализованного в настоящей работе, подтверждена следующими данными: а) специфичным к О-серогруппе полиморфизмом области *cpxA–yibK*, продемонстрированным для десяти штаммов; б) отсутствием в геномах *P. alcalifaciens* O19 и *P. stuartii* O47 другого генного кластера, потенциально ассоциированного с синтезом О-антигена или другого полисахарида, отличного от ОЭА; в) соответствием функций генов, предсказанных *in silico,* установленным структурам О-антигенов; г) клонированием и биохимическим подтверждением функций трех ферментов пути синтеза нуклеотидного предшественника колитозы GDP-Col и формилтрансферазы пути синтеза dTDP-D-Qui4NFo.

Отметим, что в бактериях рода *Proteus,* включенного вместе с родом *Providencia* в трибу Proteeae, ГКО располагается в том же месте хромосомы за геном *cpxA* по ходу транскрипции. Для обоих родов также характерны уникальные компоненты О-антигенов, такие как *N*-ацетил-изомурамовая кислота и (1-карбоксиэтил)аминокислоты, и общие эпитопы, обеспечивающие многочисленные межродовые перекрестные серологические реакции. В то же время имеются и различия; так, бактерии *Proteus* не содержат в ГКО генов *wz* и не продуцируют ЛПС SR-типа.

ВЫВОДЫ

1. Установлены структуры О-специфических полисахаридов (О-антигенов) 23 О-серогрупп важных в медицинском отношении видов энтеробактерий рода *Providencia* – *P. alcalifaciens*, *P. stuartii* и *P. rustigianii*. Полученные данные вносят существенный вклад в создание химической основы классификации штаммов *Providencia* по О-антигенам и позволяют обосновать серологические взаимосвязи между штаммами, относящимися к различным О-серогруппам, а также между провиденсиями и другими энтеробактериями.

2. В изученных О-полисахаридах обнаружены различные кислоты неуглеводной природы, в том числе впервые в составе природных гликополимеров найдены (*2R,4R*)-2,4-дигидроксипентановая кислота, *N*-[(*S*)-1-карбоксиэтил]-L-аланин (аланопин) и 2-фосфо-D-глицерамид. Впервые идентифицирован редко встречающийся в бактериальных гликанах моносахарид L-хиновоза.

3. Впервые у бактерий *Providencia* генный кластер О-антигена локализован в полиморфном хромосомном локусе между генами *cpxA* и *yibK*. Выявлены особенности его организации у провиденсий, предсказаны функции генов биосинтеза О-антигенов 9 О-серогрупп и пути биосинтеза нуклеотидных предшественников их специфических моносахаридных компонентов. Полученные данные могут быть использованы для разработки метода молекулярного типирования природных и клинических изолятов провиденсий, основанного на генах процессинга О-антигенов, специфичных для каждой О-серогруппы.

4. Путем клонирования и проведения биохимических реакций с полученными рекомбинантными ферментами подтверждены функции генов пути биосинтеза GDP-колитозы – нуклеотидного предшественника одной из редко встречающихся 3,6-дидезоксигексоз, входящей в состав О-антигена серогруппы О6. Найдено, что биосинтез GDP-колитозы у провиденсий протекает по тому же пути, что и у ранее изученных бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

Статьи

1. Bushmarinov I.S., Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Blaszczyk A., Toukach F.V., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide of *Providencia stuartii* O49 // *Carbohydr. Res.* 2004, **339**, 1557–1560.

2. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Bakinovskiy L.V., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. The structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia stuartii* O47 // *Carbohydr. Res.* 2004, **339**, 2621–2626.

3. Kocharova N.A., Ovchinnikova O.G., Bushmarinov I.S., Toukach F.V., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. The structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia stuartii* O57 containing an amide of D-galacturonic acid with L-alanine // *Carbohydr. Res.* 2005, **340**, 775–780.

4. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Torzewska A., Blaszczyk A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia stuartii* O43 containing an amide of D-galacturonic acid with L-serine // *Carbohydr. Res.* 2005, **340**, 1407–1411.

5. Kocharova N.A., Ovchinnikova O.G., Toukach F.V., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. The O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia stuartii* O44 contains L-quinovose, a 6-deoxy sugar rarely occurring in bacterial polysaccharides // *Carbohydr. Res.* 2005, **340**, 1419–1423.

6. Kocharova N.A., Ovchinnikova O.G., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. The structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O30 // *Carbohydr. Res.* 2006, **341**, 786–790.
7. Bushmarinov I.S., Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Toukach F.V., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O29 // *Carbohydr. Res.* 2006, **341**, 1181–1185.
8. Bushmarinov I.S., Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Toukach F.V., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide and serological cross-reactivity of the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O32 containing *N*-acetylisomuramic acid // *Carbohydr. Res.* 2007, **342**, 268–273.
9. Kocharova N.A., Ovchinnikova O.G., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. The structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O36 containing 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid // *Carbohydr. Res.* 2007, **342**, 665–670.
10. Ovchinnikova O.G., Bushmarinov I.S., Kocharova N.A., Toukach F.V., Wykrota M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. New structure for the O-polysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O27 and revised structure for the O-polysaccharide of *Providencia stuartii* O43 // *Carbohydr. Res.* 2007, **342**, 1116–1121.
11. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Wykrota M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of a colitose-containing O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O6 // *Carbohydr. Res.* 2007, **342**, 2144–2148.
12. Kocharova N.A., Kondakova A.N., Vinogradov E., Ovchinnikova O.G., Lindner B., Shashkov A.S., Rozalski A., Knirel Y.A. Full structure of the carbohydrate chain of the lipopolysaccharide of *Providencia rustigianii* O34 // *Chem. Eur. J.* 2008, **14***,* 6184–6191.
13. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Bialczak-Kokot M., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O31 containing an ether of D-mannose with (*2R,4R*)-2,4-dihydroxypentanoic acid // *Carbohydr. Res.* 2009, **344**, 683–686.
14. Kocharova N.A., Kondakova A.N., Ovchinnikova O.G., Perepelov A.V., Shashkov A.S., Knirel Y.A. *N*-(1-Carboxyethyl)alanine (alanopine), a new non-sugar component of lipopolysaccharides of *Providencia* and *Proteus* // *Carbohydr. Res.* 2009, **344**, 2060–2062.
15. Овчинникова О.Г., Кочарова Н.А., Шашков А.С., Книрель Ю.А., Рожальски А. Структура О-специфического полисахарида бактерии *Providencia alcalifaciens* O46 // *Биоорган. химия* 2009, **35**, 408–413.
16. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Parkhomchuk A.A., Bialczak-Kokot M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O60 // *Carbohydr. Res.* 2011, **346***,* 377–380.
17. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Arbatsky N.P., Rozalski A., Knirel Y.A. Elucidation of the full O-polysaccharide structure and identification of the core type of the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O9 // *Carbohydr. Res.* 2011, **346***,* 644–650.
18. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Kondakova A.N., Bialczak-Kokot M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O28 // *Carbohydr. Res.* 2011, **346**, 2638–2641.
19. Кочарова Н.А., Овчинникова О.Г., Бялчак-Кокот М., Шашков А.С., Книрель Ю.А., Рожальски А. Структура О-полисахарида *Providencia alcalifaciens* O25, содержащего амид D-галактуроновой кислоты с N^{ε}-[(*R*)-1-карбоксиэтил]-L-лизином // *Биохимия* 2011, **76**, 864–871.
20. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the

O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O48 // *Carbohydr. Res.* 2012, **347**, 168–171.

21. Ovchinnikova O.G., Liu B., Guo D., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Chen M., Feng L., Rozalski A., Knirel Y.A., Wang L. Localization and molecular characterization of putative O-antigen gene clusters of *Providencia* species // *Microbiology* 2012, **158**, 1024–1036.

22. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Bialczak-Kokot M., Shashkov A.S., Rozalski A., Knirel Y.A. Structure of the O-polysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O22 containing D-glyceramide 2-phosphate // *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 3500–3506.

23. Ovchinnikova O.G., Liu B., Guo D., Kocharova N.A., Bialczak-Kokot M., Shashkov A.S., Feng L., Rozalski A., Wang L., Knirel Y.A. Structural, serological, and genetic characterization of the O-antigen of *Providencia alcalifaciens* O40 // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012, **66**, 382–392.

24. Ovchinnikova O.G., Kondakova A.N., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Structure of the O-polysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O3 containing 3,6-dideoxy-3-formamido-D-glucose and D-galacturonamide // *Carbohydr. Res.* 2012, **361**, 27–32.

Тезисы докладов на конференциях

25. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Torzewska A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. The structure of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Providencia stuartii* O47 // III German-Polish-Russian Meeting on Bacterial Carbohydrates, Wroclaw, Poland, October 6–9, 2004, p. 78.

26. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Kondakova A.N., Knirel Y.A., Rozalski A. Structures of the lipopolysaccharides of bacteria of the genus *Providencia* // XIV European Carbohydrate Symposium, Lübeck, Germany, September 2–7, 2007, p. 397.

27. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Kondakova A.N., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. New structures of L-fucose-containing O-polysaccharides of bacteria of the genus *Providencia* and the full lipopolysaccharide structure of *Providencia rustigianii* O34 // XXIV International Carbohydrate Symposium, Oslo, Norway, July 27–August 1, 2008, F-P058.

28. Ovchinnikova O.G., Parchomchuk A.A., Kocharova N.A., Kondakova A.N., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Rozalski A. Further progress in structural studies of lipopolysaccharides from bacteria *Providencia* // XV European Carbohydrate Symposium, Vienna, Austria, July 19–24, 2009, PB 020.

29. Овчинникова О.Г., Кочарова Н.А., Пархомчук А.А., Кондакова А.Н., Шашков А.С., Книрель Ю.А., Рожальски А. Прогресс в структурных исследованиях липополисахаридов бактерий рода *Providencia* // XII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, Владивосток, 7–14 сентября 2009 г., с. 50.

30. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Liu B., Feng L., Rozalski A., Wang L., Knirel Y.A. Genetic studies of *Providencia* O-antigens // 4th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Hyytiälä Forestry Field Station, Hyytiälä, Finland, September 19–22, 2010, p. 33.

31. Ovchinnikova O.G., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Liu B., Feng L., Rozalski A., Wang L., Knirel Y.A. Molecular analysis of the putative *Providencia* O-antigen gene cluster // FASEB Summer Research Conference *Microbial Polysaccharides of Medical, Agricultural and Industrial Importance*, Carefree, Arizona, USA, June 5–10, 2011.

32. Ovchinnikova O.G., Liu B., Kocharova N.A., Guo D., Shashkov A.S., Bialczak-Kokot M., Feng L., Rozalski A., Wang L., Knirel Y.A. Structure and gene cluster of the O-antigen of *Providencia alcalifaciens* O22 containing D-glyceramide 2-phosphate // XXVI International Carbohydrate Symposium, Madrid, Spain, July 22–27, 2012, P460.

33. Ovchinnikova O.G., Liu B., Shashkov A.S., Chen M., Perepelov A.V., Zhou D., Feng L., Rozalski A., Wang L., Knirel Y.A. Functional analysis of O-antigen biosynthesis genes in *Providencia* spp. // 5th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates, Suzdal, Russia, September 2–6, 2012, O27.