



УДК 579.842.17.088:577.114.5::543.422.23

О-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПОЛИСАХАРИДЫ НОВОГО ВИДА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ *Escherichia albertii*, БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ *E. coli*

© 2019 г. О. И. Науменко*, С. Н. Сенченкова*, Ю. А. Книрель*., #

*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991, Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 29.05.2019 г.

После доработки 01.07.2019 г.

Принята к публикации 18.07.2019 г.

Приведены данные о строении О-специфических полисахаридов (О-антигенов) всех девяти известных молекулярных типов (потенциальных О-серотипов) нового вида энтеробактерий *Escherichia albertii* – возбудителей кишечных инфекций у людей и птиц. Рассмотрены преимущества и ограничения методов структурного анализа, использовавшихся для установления строения полисахаридов *E. albertii*. Сравнением с последовательностями в доступных базах данных проведена аннотация генов, входящих в генные кластеры биосинтеза О-антигенов *E. albertii*. Обсуждаются структурные и генетические взаимосвязи между О-антигенами *E. albertii* и близкородственного вида *E. coli*. Найдено, что в дополнение к О-антигену *E. albertii* O9 экспрессирует маннан, имеющий такое же строение, что и маннан *E. coli* O8.

Ключевые слова: О-специфический полисахарид, структура, маннан бактериальный, гликозидная связь, избирательное расщепление, О-антиген, биосинтез, генный кластер О-антигена, гликозилтрансфераза, *Escherichia coli*, *Escherichia albertii*

DOI: 10.1134/S0132342319060320

ВВЕДЕНИЕ

Обзор посвящен О-специфическим полисахаридам (ОПС), или в биологическом контексте О-антигенам, недавно открытого важного в медицинском отношении вида энтеробактерий – *Escherichia albertii*. ОПС представляет собой полисахаридную цепь липополисахарида, расположенного на поверхности клетки грамотрицательных бактерий.

Сокращения: ГКО – генный кластер О-антигена, ОПС – О-специфический полисахарид, CMP – цитидинмонофосфат, Col – колитоза (3,6-дидезокси-*L*-ксило-гексоза), dTDP – дезокситимидиндифосфат; COSY – корреляционная спектроскопия (correlation spectroscopy), Fuc – фукоза, GDP – гуанидиндифосфат, GlcNAc3NAcA – 3-ацетамидо-2-ацетимидоиламино-2,3-дидезоксиглюкуроновая кислота, HMBC – гетероядерная мультисвязевая корреляция (heteronuclear multiple-bond correlation), HSQC – гетероядерная одноквантовая когеренция (heteronuclear single-quantum coherence), ManNAc3NAcA – 2,3-диацетамидо-2,3-дидезоксиманнуриновая кислота, Neu5Ac – *N*-ацетилнейраминавая кислота, NOESY – спектроскопия с использованием ядерного эффекта Оверхаузера (nuclear Overhauser effect spectroscopy), *orf* – открытая рамка считывания (open reading frame), P – фосфат, QuiNAc – *N*-ацетилхиноззамин (2-ацетамидо-2,6-дидезоксиглюкоза), Rha – рамноза, RhaNAc – *N*-ацетилрамнозамин (2-ацетамидо-2,6-дидезоксиманноза), ROESY – спектроскопия с использованием ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy), UDP – уридиндифосфат, UndPP – ундекапренилдифосфат, TOCSY – полная корреляционная спектроскопия (total correlation spectroscopy).

Автор для связи: (тел.: +7 (499) 137-61-48; факс: +7 (499) 135-53-28; эл. почта: yknirel@gmail.com).

Его тонкая структура определяет специфичность иммунного ответа организма-хозяина на бактериальную инфекцию, а широкое структурное разнообразие ОПС позволяет бактериям избегать защитного действия механизма адаптивного иммунитета.

Вид *E. albertii* получил свое название в честь бангладешского микробиолога Джона Альберта (M. John Albert).¹ Бактерии этого нового вида, близкородственные кишечной палочке (*E. coli*), являются возбудителями спорадических и эпидемических кишечных инфекций у людей и птиц [1–4]. Впервые штамм *E. albertii* был выделен от детей с диареей в Бангладеш и определен как штамм *Hafnia alvei*, но в 2003 году эта ошибка была исправлена [1]. Однако и после этого штаммы *E. albertii* продолжали ошибочно идентифицировать как *E. coli*, *H. alvei* и другие бактерии в связи с отсутствием описания их конкретных биохимических характеристик. Вследствие этого распространенность штаммов *E. albertii* может быть недооценена из-за отсутствия эффективных методов их дискриминации от других членов семейства Enterobacteriaceae.

До последнего времени бактерии *E. albertii* оставались малоизученными и в других аспектах. В частности, отсутствовала их классификация, необходимая для серодиагностики, эпидемиоло-

¹ В 1990-е годы авторы обзора проводили с Джоном Альбертом совместные исследования О-антигенов холерного вибриона (*Vibrio cholerae*).

гического мониторинга и выявления источников инфекции. В 2015–2018 гг. геномы около 100 штаммов *E. albertii*, выделенных из пищевых источников, были секвенированы и на основании различий в генных кластерах О-антигенов (ГКО) разделены на девять молекулярных типов, потенциально отвечающих девяти О-серотипам (O1–O9) ([5]; а также: Н. Zheng, Y. Xiong, J. Wang, Н. Wang, Q. Li, неопубликованные данные). Последующее установление строения ОПС представителей этих типов подтвердило обоснованность такой классификации. С использованием полученных данных о строении ОПС методами биоинформатики был проведен функциональный анализ генов биосинтеза О-антигенов *E. albertii*. Полученные в результате этих исследований данные являются предметом настоящего обзора.

СОСТАВ И СТРОЕНИЕ О-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДОВ *Escherichia albertii*

ОПС построены из повторяющихся олигосахаридных единиц (О-звеньев), включающих различные моносахариды и неуглеводные компоненты. В так называемом биологическом О-звене моносахариды расположены в том порядке, в каком они переносятся один за другим при сборке О-звена в процессе биосинтеза ОПС. Как правило, структурный анализ ОПС приводит к установлению строения олигосахаридного звена, которое может совпадать со строением биологического О-звена или отличаться от него пермутацией моносахаридных компонентов. Для выяснения структуры биологического О-звена в последнее время используются генетические данные (см. раздел “ГЕНЕТИКА БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНОВ *E. albertii*”). С помощью такой комбинации химического и генетического подходов установлены структуры биологических О-звеньев всех типов *E. albertii* [6–12], приведенные в табл. 1.

Размер О-звеньев *E. albertii* варьируется от трех до пяти моносахаридных остатков. Четыре из девяти типов *E. albertii* имеют линейные ОПС, а ОПС пяти типов являются разветвленными с одним боковым моносахаридным остатком, за исключением О-звена типа O6, в котором присутствуют две боковые гликозильные группы.

Из моносахаридов в ОПС *E. albertii* наиболее часто встречается D-Glc, D-Gal, D-GlcNAc и D-GalNAc, причем D-Gal является единственным сахаром, который найден не только в пиранозной, как все другие моносахариды, но и в фуранозной форме (в ОПС типов O5 и O7). Компонентами ОПС *E. albertii* являются также дезоксисахара L-Rha, L-Fuc и колитоза (3,6-дидезокси-L-ксило-гексоза), дезоксиаминосахара L-QuiNAc и L-RhaNAc, диаминогексуроновые кислоты D-GlcNAc3NAcA и D-ManNAc3NAcA и сиаловая кислота Neu5Ac.

Большинство аминогрупп аminosахаров ацетилированы, но в положении 2 производного диаминоглюкуроновой кислоты в ОПС типа O1 находится ацетамидиновая (N-ацетимидоиламино) группа. ОПС двух типов фосфорилированы. В основной цепи ОПС *E. albertii* O3 присутствует гликозилфосфат, а в ОПС типа O9 фосфатная группа присоединяет глицерин к остатку галактозы.

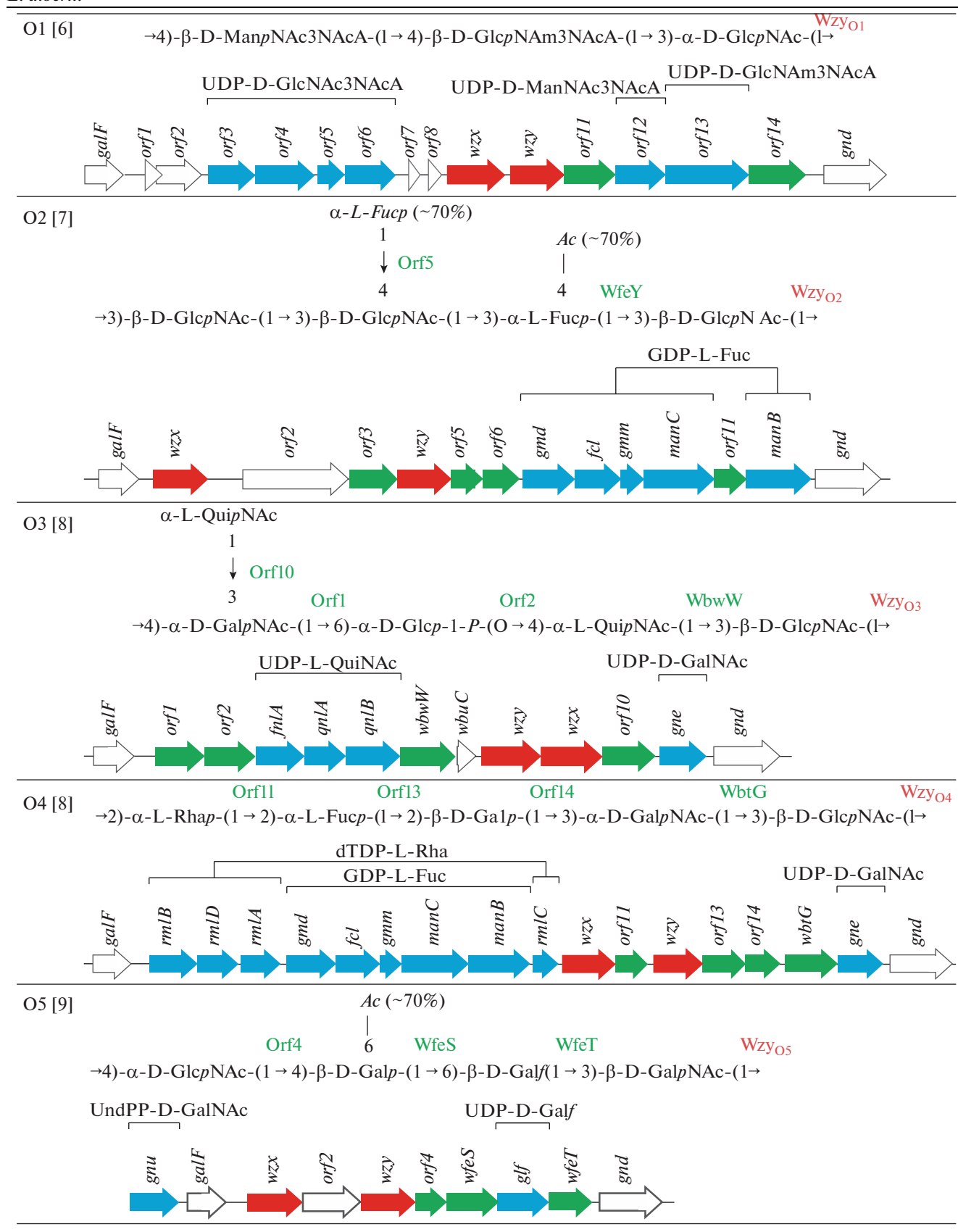
Кроме собственно О-антигена – фосфорилированного полисахарида, строение которого приведено в табл. 1, – *E. albertii* O9 продуцирует маннан, имеющий такую же структуру повторяющегося звена $\rightarrow 3$ - β -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow) (О.И. Науменко, А.С. Шашков, С.Н. Сенченкова, Ю.А. Книрель, неопубликованные данные), что и описанный ранее маннан *E. coli* O8 [13].

МЕТОДЫ СТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА ПОЛИСАХАРИДОВ

Для структурного анализа ОПС получали мягкой кислотной деградацией липополисахаридов, выделенных из бактериальных клеток водно-фенольной экстракцией [14]. В результате расщеплялась кислотолabile гликозидная связь остатка 3-дезоксикогулоновой кислоты, соединяющая углеводную и липидную части липополисахарида. В используемых для деградации условиях (2% CH₃CO₂H, 100°C, 2 ч) гликозидные связи моносахаридных компонентов ОПС сохранялись за исключением кислотолabile связи 3,6-дидезоксигексозы (колитозы), находящейся в боковой цепи ОПС *E. albertii* O8. Частичное отщепление этого моносахарида привело к нерегулярному полисахариду с нестехиометрическим (~60%) содержанием колитозы [10]. Из липополисахарида типа O9 образовались два полисахарида – ОПС и маннан, которые были разделены гель-проникающей хроматографией на Сефадексе G-50.

Моносахаридный состав ОПС определяли методом ГЖХ ацетилированных полиолов, которые получали из моносахаридов, высвобождавшихся полным кислотным гидролизом ОПС [15]. Этим методом были идентифицированы все моносахаридные компоненты ОПС *E. albertii*, за исключением 2,3-диамино-2,3-дидезоксигексуроновых кислот, входящих в состав ОПС типа O1, которые не удалось выделить в свободном виде из-за высокой кислотоустойчивости их гликозидных связей. В связи с этим производные диаминогексуроновых кислот идентифицировали с помощью спектроскопии ЯМР без их выделения. Такой же подход использовался для определения колитозы, которая не только присоединена кислотолabile гликозидной связью, но и сама в значительной степени разрушается в условиях полного кислотного гидролиза.

Таблица 1. Строение О-специфических полисахаридов и состав и организация генных кластеров О-антигенов *E. albertii*



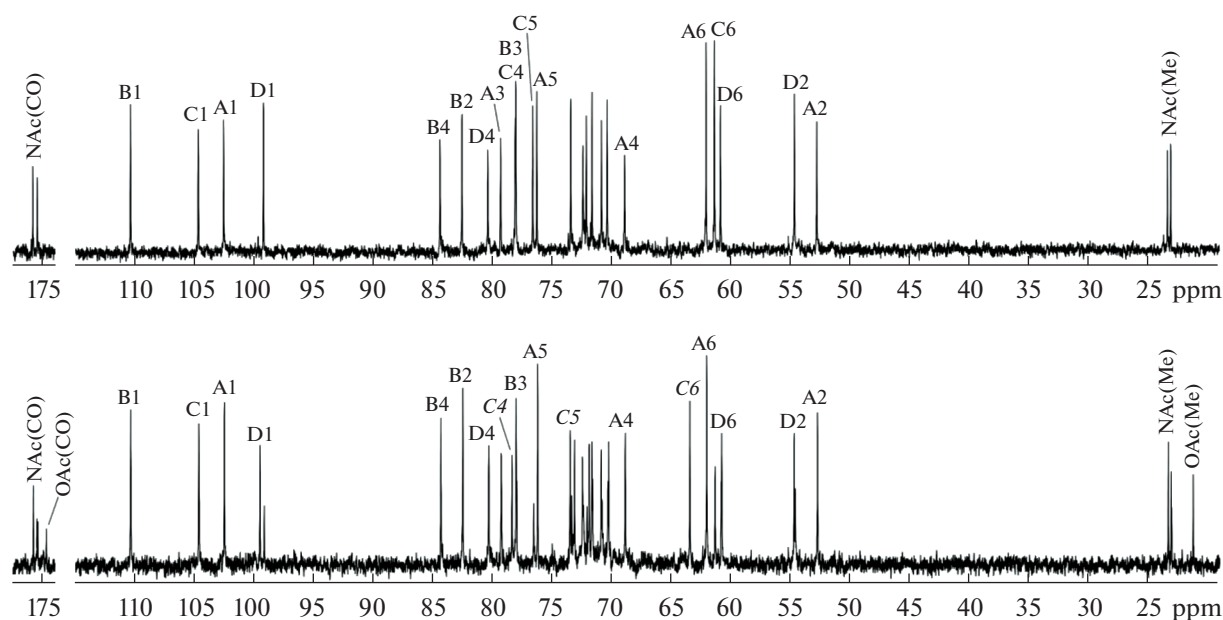


Рис. 1. Спектры ^{13}C -ЯМР ОПС *E. albertii* O5 (внизу) и полученного из него регулярного О-деацетилизованного полисахарида (вверху). Сигналы О-ацетилизованного остатка Galp в ОПС обозначены курсивом. Цифры соответствуют атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных буквами: А – GalNAc, В – Galf, С – Galp, D – GlcNAc.

Строение ОПС *E. albertii* устанавливали с помощью спектроскопии ЯМР на ядрах ^1H и ^{13}C . Одномерные эксперименты ЯМР позволяли оценить степень регулярности ОПС, определить размер О-звена, природу моносахаридов и неуглеводных компонентов, в случае их присутствия.

Для дальнейшего структурного анализа проводилось отнесение сигналов в спектрах ^1H и ^{13}C с помощью двумерной корреляционной спектроскопии ЯМР, включая эксперименты $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ TOCSY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC. Это открывало путь для определения конфигураций моносахаридов и гликозидных связей на основании констант спин-спинового взаимодействия вицинальных протонов моносахаридных циклов. Двумерные эксперименты $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY или $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC выявляли корреляции между атомами соседних моносахаридных остатков и тем самым положения замещения и последовательность моносахаридов в О-звене. Типы гликозидных связей подтверждали химическими сдвигами ^{13}C -ЯМР на основании известного эффекта – существенного сдвига в слабое поле сигналов связевых атомов углерода. Подробно основные принципы применения двумерной спектроскопии ЯМР для установления строения сложных углеводов рассмотрены в обзоре [16].

В ряде случаев спектроскопия ЯМР имела ограничения, связанные с нерегулярностью структуры полисахарида или совпадением сигналов в спектрах. Для преодоления этих трудностей применялись химические модификации ОПС. Так, для частично О-ацетилованных ОПС

E. albertii O2, O5 и O8 проводилось деацетилирование в мягких щелочных условиях (12.5% NH_4OH , 37°C, 16 ч). Для ОПС типов O2 и O8, содержащих боковые моносахаридные остатки (L-фукозу или колитозу) в нестехиометрическом количестве, применяли распад по Смитту или частичный кислотный гидролиз, соответственно, для удаления этих остатков.

Кислый ОПС *E. albertii* O9 модифицировали обработкой 48% фтористоводородной кислотой, приводящей к отщеплению глицерофосфатной группы без разрыва гликозидных связей и образованию нейтрального полисахарида.

Эффективный контроль за химическими превращениями осуществляли с помощью спектроскопии ЯМР. Например, рис. 1 показывает, какие изменения происходят в спектре ^{13}C -ЯМР при деацетилировании нестехиометрически (~70%) О-ацетилованного ОПС типа O5. Сравнение спектров ЯМР исходного и модифицированного полисахаридов использовалось также для подтверждения содержания и первоначального положения удаляемых моносахаридных остатков или неуглеводных заместителей.

Строение ОПС подтверждали избирательным расщеплением с образованием олигосахаридов, для которого использовались частичный кислотный гидролиз и сольволиз трифторуксусной или трифторметансульфоновой (трифликовой) кислотами [17–19].

При сольволизе действием $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ и гидролизе разбавленной кислотой в ОПС *E. albertii* O5 [9] расщеплялись гликозидные связи остат-

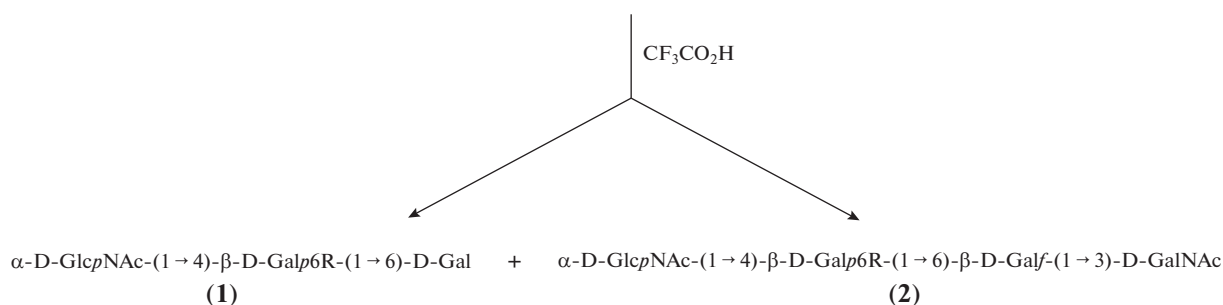
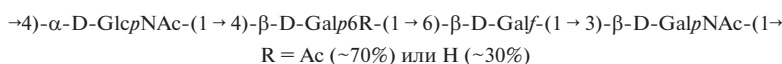


Рис. 2. Избирательное расщепление ОПС *E. albertii* O5 сольволизом $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$.

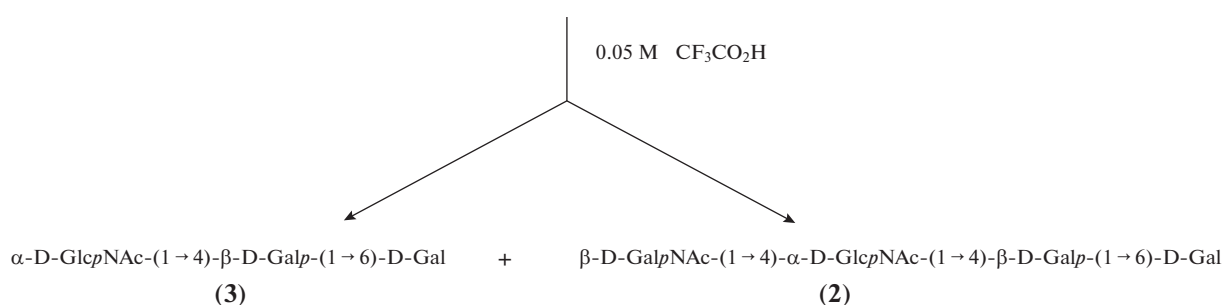
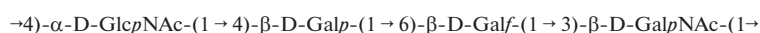


Рис. 3. Избирательное расщепление О-деацетилизованного ОПС *E. albertii* O5 кислотным гидролизом.

ков $\beta\text{-Gal}f$ и $\beta\text{-GalNAc}$ и были получены трисахариды **(1)** из исходного ОПС или **(3)** из О-деацетилизованного полисахарида (рис. 2 и 3, соответственно). Кроме того, образовались продукты разрыва только одной из этих лабильных связей, причем сольволиз и гидролиз вызывали преимущественное расщепление разных связей, давая тетрасахариды **(2)** или **(4)** с остатком GalNAc или Gal на восстанавливаемом конце (рис. 2 и 3, соответственно). Отметим, что сольволиз не затрагивал О-ацетильные группы, присутствующие в ОПС.

Сольволиз ОПС *E. albertii* O4 [8] трифторуксусной кислотой привел к набору олигосахаридов **(5)–(7)** от трисахаридов до пентасахаридов, в результате разрыва одной или нескольких гликозидных связей остатков $\alpha\text{-Fuc}$, $\alpha\text{-Rha}$ и $\beta\text{-GlcNAc}$ (рис. 4). Эти олигосахариды боргидридным восстановлением превращали в соответствующие олигосилполиолы, более удобные для хроматографического выделения и ЯМР-спектроскопического анализа.

ОПС *E. albertii* O1 был устойчив к действию трифторуксусной кислоты, и для его избирательного расщепления использовалась трифликовая кислота. Как и ожидалось, при сольволизе $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ разрывалась только связь $\alpha\text{-GlcNAc}$ и образовался трисахарид **(8)**, соответствующий

О-звену ОПС (рис. 5) (О.И. Науменко, А.С. Шашков, Ю.А. Книрель, неопубликованные данные).

Строение полученных олигосахаридов устанавливали с помощью спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением. При этом для кислого трисахаридов **(8)** из ОПС *E. albertii* O1 регистрировали отрицательные ионы, а для нейтральных олигосахаридов, полученных из других ОПС, – положительные ионы.

ГЕНЕТИКА БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНОВ *E. albertii*

У большинства грамотрицательных бактерий, включая *E. albertii*, синтез ОПС протекает по Wzx/Wzy-зависимому пути [20], который инициируется переносом гликозилфосфата D-GlcNAc-1-P из нуклеотидного производного UDP-D-GlcNAc на липидный носитель – ундекапренилфосфат (UndP) – при участии белка WecA. У бактерий, у которых первым моносахаридом О-звена является D-GalNAc (например, у *E. albertii* O5, O7 и O8), образующийся гликофосфолипид UndPP-D-GlcNAc превращается в UndPP-D-GalNAc с помощью 4-эпимеразы Gnu [21].

Последующая сборка олигосахаридного О-звена происходит путем последовательного переноса

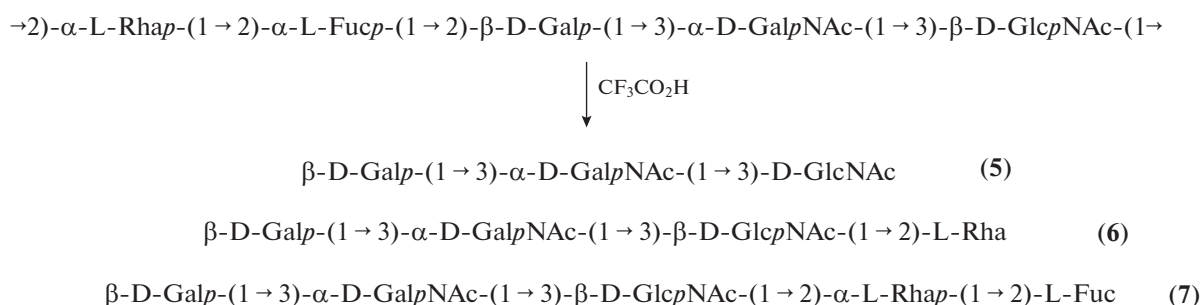


Рис. 4. Избирательное расщепление ОПС *E. albertii* O4 сольволизом $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$.

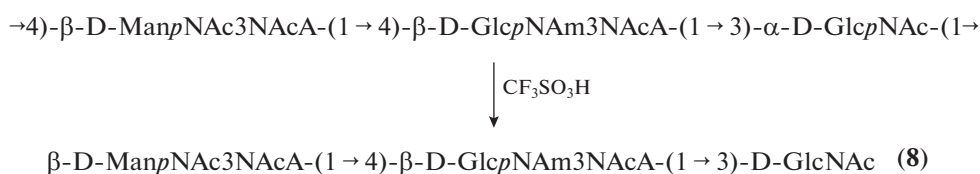


Рис. 5. Избирательное расщепление ОПС *E. albertii* O1 сольволизом $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$.

моносахаридов или гликозилфосфатов из соответствующих нуклеотид-активированных производных на UndPP-связанный аминсахар при участии специфических гликозилтрансфераз. Затем готовое О-звено, присоединенное к фосфолипиду UndPP, переносится через внутреннюю мембрану с помощью транслоказы (флиппазы) Wzx, и заканчивается синтез ОПС полимеризацией О-звена О-антигенполимеразой Wzy при участии регулятора Wzz, обеспечивающего модальное распределение длин полисахаридной цепи. В некоторых случаях имеет место постполимеризационная модификация ОПС, такая как, например, О-ацетилирование. После завершения синтеза ОПС переносится на олигосахаридный кор, присоединенный к липидной части (так называемому липиду А), и полученный липополисахарид экспортируется на внешнюю мембрану клеточной оболочки.

Большинство генов (открытых рамок считывания *orf*), участвующих в биосинтезе ОПС, организованы в генный кластер О-антигена (ГКО). У *E. albertii* он фланкирован консервативными генами *galF* и *gnd* и включает от 7 до 16 функциональных генов, имеющих одинаковое направление считывания от *galF* к *gnd* (табл. 1). Секвенирование ГКО всех типов *E. albertii* и аннотация входящих в них генов показали, что по своему составу и организации ГКО так же уникальны, как структуры ОПС этих бактерий.

В ГКО присутствуют гены синтеза нуклеотидных предшественников специфических моносахаридных компонентов ОПС и гены необходимого числа гликозилтрансфераз (на одну меньше, чем число моносахаридов в О-звене) (табл. 1). Большинство генов гликозилтрансфераз *E. albertii* отнесены к определенным гликозидным свя-

зям (табл. 1) путем сравнения с генами, кодирующими белки с известными функциями, которые депонированы в базе данных GenBank.

ГКО всех типов включают также гены процессинга *wzx* и *wzy*, а в генном кластере маннана *E. albertii* O9 вместо них присутствуют гены *wzm* и *wzt* (см. рис. 8 в следующем разделе), осуществляющие полимеризацию по альтернативному Wzm/Wzt-зависимому пути, который характерен для гомополисахаридов. Он заключается в наращивании полисахаридной цепи путем переноса моносахаридных остатков (в данном случае остатков маннозы) одного за другим без предварительной сборки олигосахаридного звена [20].

Кроме того, ГКО некоторых типов *E. albertii* содержат гены, кодирующие интегразы, транспозазы и другие белки с невыясненной ролью в синтезе ОПС.

Как это типично для грамотрицательных бактерий, предшественники D-Glcp, D-Galp и D-GlcNAc синтезируются генами “домашнего хозяйства”, расположенными вне ГКО *E. albertii*. В другом месте генома находится также ген *wecA*, необходимый для синтеза UndPP-D-GlcNAc. Ген *gnu* для синтеза UndPP-D-GalNAc из UndPP-D-GlcNAc, как и в геномах бактерий *E. coli*, находится вне ГКО рядом с геном *galF* (табл. 1), и его присутствие указывает на то, что первым моносахаридом О-звена является D-GalNAc.

ГКО *E. albertii* O3 и O9, в состав ОПС которых входят α -D-глюкозилфосфат или глицерофосфат, включают гены *orf2* и *orf3*, кодирующие гликозилфосфотрансферазу и глицерофосфотрансферазу, соответственно. В ГКО *E. albertii* O8 присутствует ген ацетилтрансферазы *wbsI* для О-ацетилирования

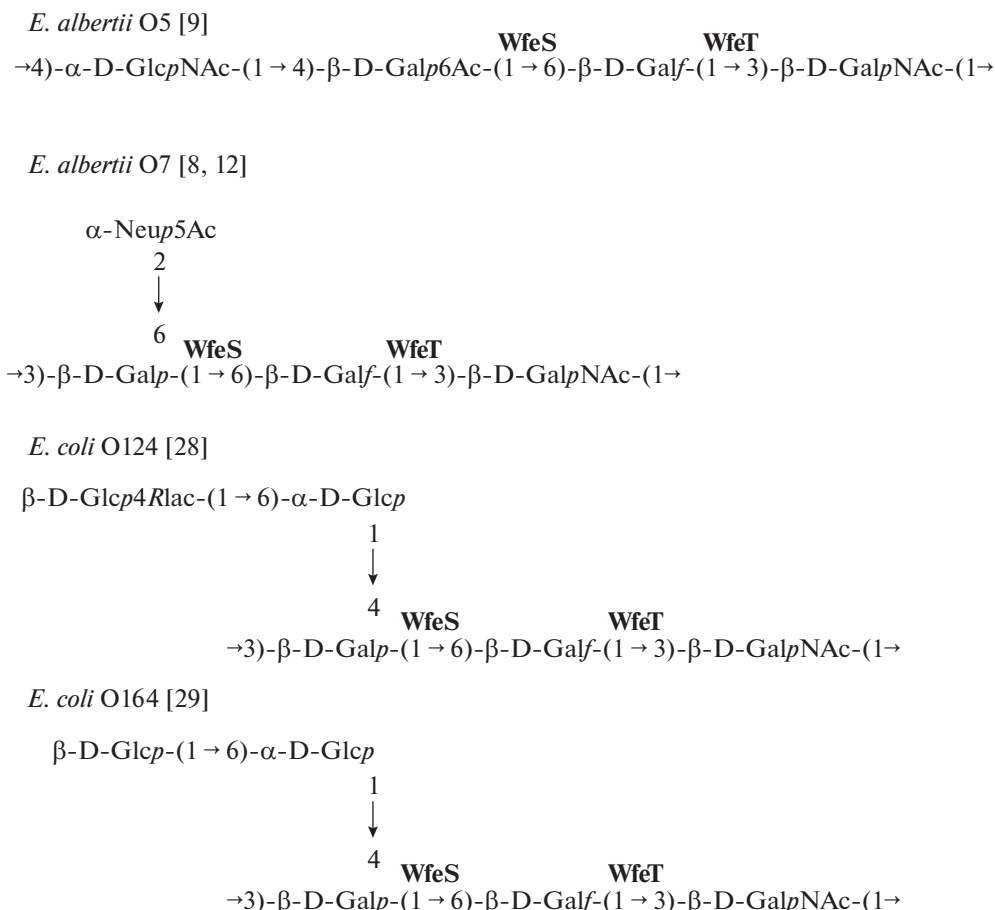


Рис. 6. Строение структурно родственных ОПС *E. albertii* O5 и O7 и *E. coli* O124 и O164. Rlac обозначает (R)-1-карбок-сиэтильную группу (остаток молочной кислоты). Гликозилтрансферазы показаны рядом с гликозидными связями, к которым они относятся.

остатка D-галактозы, тогда как у бактерий *E. albertii* O2 и O5, ОПС которых также содержат О-ацетильные группы, гены ацетилтрансфераз в ГКО не обнаружены, и, следовательно, они находятся в другом месте генома.

Пути биосинтеза большинства нуклеотидных предшественников специфических моносахаридных компонентов ОПС *E. albertii* известны [22–27], и соответствующие гены присутствуют в ГКО (табл. 1). К таким нуклеотид-активированным моносахаридам относятся UDP-D-Galf (типы O5 и O7), UDP-D-GalNAc (O4 и O8), UDP-L-QuiNAc (O3), UDP-L-RhaNAc (O6), UDP-D-ManNAc3NAcA (O1), dTDP-L-Rha (O4), GDP-L-Fuc (O2, O4 и O8), GDP-Col (O8) и CMP-Neu5Ac (O7). Для каждого пути в ГКО присутствуют от одного гена (UDP-D-Galf, UDP-D-GalNAc) до шести генов (GDP-Col).

Путь биосинтеза нуклеотидного предшественника диаминоуроной кислоты D-GlcNAм3NAcA, являющейся уникальным компонентом ОПС *E. albertii* O7, не установлен. Предположительно этот моносахарид активируется в виде UDP-производного, которое образуется из UDP-D-Glc-

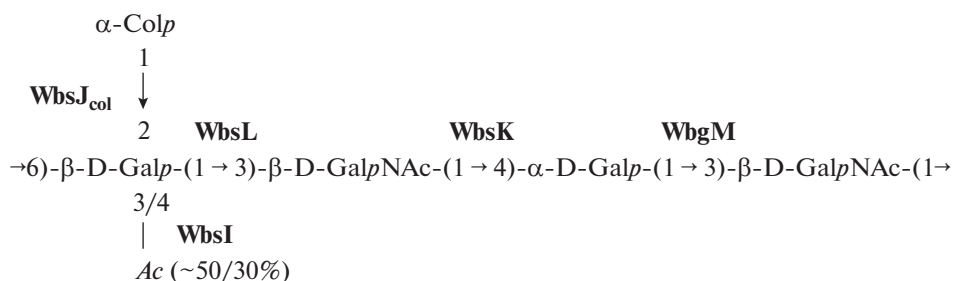
NAc3NAcA, являющейся также предшественником UDP-D-ManNAc3NAcA — другого компонента этого ОПС. Очевидно в процессе участвует аминотрансфераза Orf13, которая превращает 2-N-ацетильную группу остатка D-GlcNAc3NAcA в 2-N-ацетимидоильную.

Особенность ГКО *E. albertii* O9 — отсутствие биосинтеза нуклеотидного предшественника D-маннозы, входящей в состав ОПС, тогда как обычно у эшерихий и родственных бактерий, использующих GDP-D-Man для синтеза маннозосодержащих ОПС, два из трех необходимых генов (*manB* и *manC*) находятся в ГКО. Эти гены обнаружены в геноме бактерий типа O9 в генном кластере маннана, расположенном рядом с ГКО по направлению считывания (см. рис. 8 в следующем разделе), и в ГКО не дублируются.

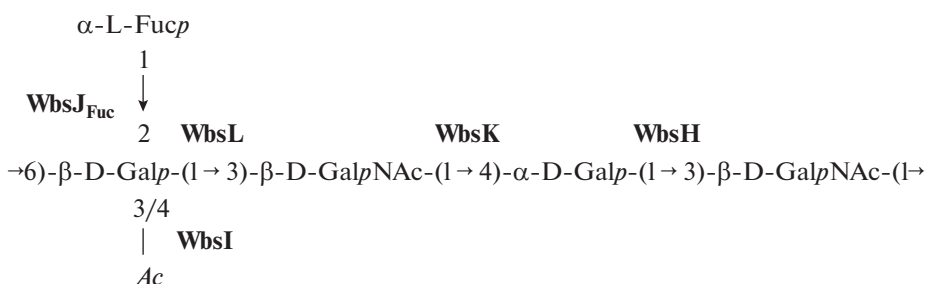
СТРУКТУРНОЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО ПОЛИСАХАРИДОВ *E. albertii* И *E. coli*

В то время как ОПС большинства типов *E. albertii* отличаются уникальными структурами и ГКО

E. albertii O8 [11]



E. coli O128 [30, 31]



E. coli O55 [32]

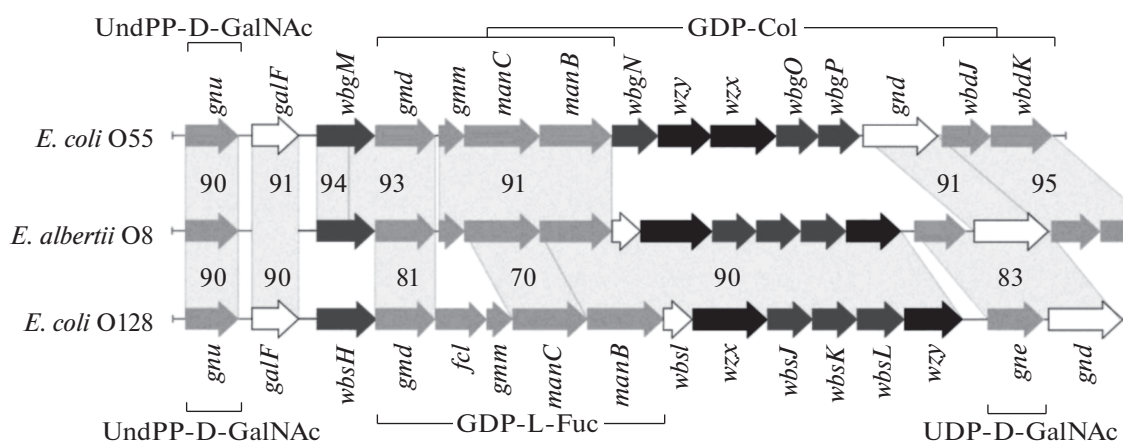
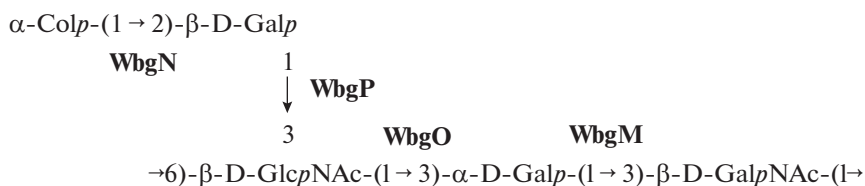


Рис. 7. Строение близкородственных ОПС и сравнение ГКО *E. albertii* O8, *E. coli* O55 и *E. coli* O128. Гликозилтрансферазы и ацетилтрансфераза показаны рядом со связями, к которым они относятся. Черным обозначены гены процессинга, темно-серым – гены гликозилтрансфераз, светло-серым – гены синтеза моносахаридных предшественников. Степень идентичности гомологов генов и модулей генов указана между кластерами в процентах.

не только внутри вида, но и внутри рода эшерихий, ОПС типов O3 и O6–O8 имеют выраженные структурные и генетические взаимосвязи с ОПС *E. coli*.

Так, ОПС *E. albertii* O6 и *E. coli* O3 характеризуются идентичным строением, а ОПС *E. albertii* O3 отличаются от *E. coli* O181 только отсутствием

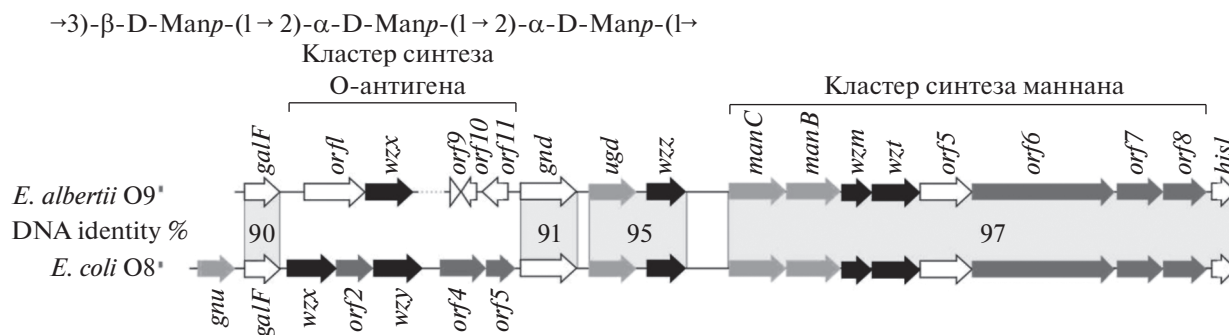


Рис. 8. Структура маннана и сравнение генных кластеров О-антигенов и маннана *E. albertii* O9 и *E. coli* O8. Черным обозначены гены процессинга, темно-серым – гены гликозилтрансфераз, светло-серым – гены синтеза монсахаридных предшественников. В генном кластере маннана *orf5* кодирует метилтрансферазу. Степень идентичности генов и модулей генов указана между кластерами в процентах.

О-ацетильной группы в положении 6 остатка GalNAc [8]. В ГКО обеих пар бактерий присутствуют гомологи одних и тех же генов, расположенных в одинаковом порядке (у *E. coli* O181 ген ацетилтрансферазы очевидно находится вне ГКО).

E. albertii O7 имеет такое же строение трисахаридной линейной части О-звена что и *E. coli* O124 и O164, и такой же трисахаридный фрагмент β-D-Galp-(1→6)-α-D-Galf-(1→3)-β-D-GalpNAc присутствует в линейном тетрасахаридном О-звене *E. albertii* O5 (рис. 6) [8, 9]. Соответственно ГКО этих четырех бактерий имеют гомологичные участки, включающие гены UDP-D-Galp-мутазы *glf* (для синтеза UDP-D-Galf) и двух гликозилтрансфераз *wfeS* и *wfeT*, ответственных за синтез общего трисахаридного фрагмента ОПС.

ОПС *E. albertii* O8 характеризуется структурным сходством с ОПС *E. coli* O128 – оба имеют одинаковую основную цепь с повторяющимся тетрасахаридным звеном, но различные боковые моносахаридные заместители (α-Сол у первого и α-L-Фуц у второго) [10]. Соответственно, их ГКО имеют высокогомологичные участки, ответственные за сборку О-звена и процессинг О-антигена (гомология генов гликозилтрансфераз, присоединяющих терминальные моносахаридные остатки, и генов процессинга *wzx* и *wzy* у этих двух бактерий очевидно обусловлена близким структурным родством α-L-фукозы и α-колито-зы, являющейся 3-дезоксид-аналогом L-фукозы). С другой стороны, ОПС *E. albertii* O8 и *E. coli* O55 имеют общий дисахаридный фрагмент, включающий терминальный остаток α-колито-зы (рис. 7). ГКО этих двух бактерий роднит присутствие генов пути биосинтеза колито-зы, а также гомологов гена гликозилтрансферазы, ответственной за образование первой гликозидной связи внутри О-звена α-D-Galp-(1→3)-β-D-GalpNAc.

Маннан, второй полисахарид, продуцируемый *E. albertii* O9, имеет такую же структуру повторяющегося звена, что и терминированный О-метиль-

ной группой маннан, обнаруженный ранее у *E. coli* O8 [13]. Генные кластеры биосинтеза маннана у этих двух бактерий имеют одинаковый состав и организацию, и у обеих они находятся рядом с ГКО, расположенным между генами *galF* и *gnd* (рис. 8) (H. Zheng, Y. Sun, L. Bai, J. Wang, H. Wang, Q. Li, Y. Xiong, неопубликованные данные).²

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование О-антигенов *E. albertii* позволило установить строение ОПС с одной стороны и провести аннотацию входящих в ГКО генов биосинтеза ОПС с другой стороны.

В отличие от ГЖХ ацетилированных полиолов, применяющейся для определения моносахаридного состава уже более 50 лет и ставшей классическим методом химии углеводов, структурный анализ полисахаридов в последние десятилетия претерпел существенные изменения. Так, как и во всех других современных структурных исследованиях полисахаридов, основным методом установления строения ОПС *E. albertii* была двумерная спектроскопия ЯМР. ОПС, лишенные строгой регулярности вследствие присутствия О-ацетильных группы или боковых моносахаридных заместителей в нестехиометрическом количестве, предварительно превращали в регулярные полисахариды путем удаления этих компонентов.

Для подтверждения установленных структур использовался избирательный сольволиз сильными органическими протонными кислотами с выходом на олигосахаридные фрагменты ОПС. В отличие от специфических методов избирательного расщепления, таких как распад по Смитту, дезаминирование аминосхаров или β-элиминирование из положения 4 уроновых кислот [19],

² Исследованный штамм *E. coli* O8 экспрессировал маннан в качестве единственного поверхностного полисахарида [13], и строение ОПС, кодируемого ГКО этой бактерии, остается неизвестным.

этот подход не предъявляет определенных требований к составу и строению ОПС и может быть применен практически к любому гетерополисахариду. Полученные данные показали, что наименее устойчивы к сольволизу трифторуксусной кислотой гликозидные связи дезоксигексоз и гексофураноз, а также β -связанных *N*-ацетилгексоаминов, и в целом соответствовали выявленным ранее закономерностям [17, 19]. Связь *N*-ацетил- α -гексоаминов устойчива к действию этого реагента, и для ее расщепления потребовался более сильный сольволитический агент – трифликовая кислота.

Состав и строение ОПС *E. albertii* являются типичными для энтеробактерий. Как и для близкородственных микроорганизмов *E. coli*, для них характерны так называемые общие сахара D-Glc, D-Gal и D-GlcNAc, а также D-GalNAc. Один из этих аминсахаров является первым моносахаридом биологического О-звена, с переноса которого на липидный носитель начинается биосинтез ОПС. Большинство специфических компонентов ОПС *E. albertii* также были найдены в ОПС различных серотипов *E. coli*, за исключением производных 2,3-диамино-2,3-дидезоксигексурновых кислот, присутствие которых сближает ОПС *E. albertii* O1 с ОПС ряда О-серотипов *Pseudomonas aeruginosa* [33]. Как правило, один из специфических компонентов ОПС расположен в терминальном положении последнего О-звена и благодаря своей пространственной доступности вносит наибольший вклад в специфичность иммунного ответа на бактериальную инфекцию.

Как у *E. coli* и родственных энтеробактерий (*Salmonella enterica*, *Citrobacter* spp. и ряда других), ГКО *E. albertii* расположен в хромосоме между консервативными генами *galF* и *gnd*. В него входят большинство генов, участвующих в биосинтезе ОПС, и генный состав ГКО хорошо согласуется с установленными структурами ОПС всех типов *E. albertii*. Типичным для энтеробактерий является отсутствие в ГКО гена *wecA* для синтеза UndPP-D-GlcNAc, который находится в генном кластере биосинтеза общего энтеробактериального антигена и в ГКО не дублируются. В отличие от ГКО *E. albertii* O8, в ГКО *E. albertii* O2 и O5 не обнаружены гены ацетилтрансфераз. Вероятнее всего они расположены вне ГКО в профагах, модифицирующих ОПС штамма-хозяина. Предполагаемая биологическая роль таких модификаций заключается в подаче сигнала другим фаговым частицам, специфически узнающим ОПС на бактериальной поверхности, что данная клетка уже инфицирована бактериофагом.

Кроме общих особенностей строения ОПС и организации ГКО *E. albertii* и *E. coli*, между отдельными штаммами этих бактерий наблюдается более близкое О-антигенное родство. Для одних штаммов это одинаковые структуры ОПС и высокоомологичные ГКО (*E. albertii* O3/*E. coli* O181, *E. albertii* O6/*E. coli* O3), для других – фрагменты

структуры ОПС и соответствующие модули генов в ГКО (*E. albertii* O5 и O7/*E. coli* O124 и O164, *E. albertii* O8/*E. coli* O55 и O28). Такое сходство указывает на происхождение ГКО от общего предка или горизонтальный перенос ГКО в первом случае и на рекомбинацию ГКО двух бактерий во втором случае.

Особенностью *E. albertii* O9 является экспрессия двух полисахаридов, один из которых является собственно ОПС, кодируемым ГКО, а второй – маннаном, генный кластер которого расположен рядом с ГКО. Маннан с такой же структурой, кодируемый таким же генным кластером, был ранее обнаружен у *E. coli* O8 [13]. Как и ГКО штаммов *E. albertii* и *E. coli* с одинаковыми ОПС, генный кластер биосинтеза маннана очевидно был приобретен одной бактерией от другой путем горизонтального переноса.

Обобщенные в настоящем обзоре данные по структуре и генетике ОПС создают молекулярную основу для классификации штаммов *E. albertii*. Они имеют также практическое значение, открывая возможность экспресс-диагностики инфекционных заболеваний с помощью полимеразной цепной реакции, удобной мишенью для которой являются высокоспецифичные гены биосинтеза О-антигенов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность коллегам из КНР Н. Zheng, Y. Xiong, J. Wang (National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Чанпин, Пекин, КНР), Н. Wang и Q. Li (Zigong Center for Disease Control and Prevention, Цзыгун, Провинция Сычуань, КНР) за вклад в генетическое исследование О-антигенов *E. albertii*.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Inglis T.J., Merritt A.J., Bzdyl N., Lansley S., Urosevic M.N. // *New Microbes New Infect.* 2015. V. 8. P. 171–173.
2. Wang H., Zheng H., Li Q., Xu Y., Wang J., Du P., Li X., Liu X., Zhang L., Zou N., Yan G., Zhang Z., Jing H., Xu J., Xiong Y. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Article 1857.
3. Huys G., Cnockaert M., Janda J.M., Swings J. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 807–810.
4. Asoshima N., Matsuda M., Shigemura K., Honda M., Yoshida H., Hiwaki H., Ogata K., Oda T. // *Jpn. J. Infect. Dis.* 2014 V. 67. P. 139–140.

5. Ooka T., Ogura Y., Katsura K., Seto K., Kobayashi H., Kawano K., Tokuoka E., Furukawa M., Harada S., Yoshino S., Seto J., Ikeda T., Yamaguchi K., Murase K., Gotoh Y., Imuta N., Nishi J., Gomes T.A., Beutin L., Hayashi T. // *Genome Biol. Evol.* 2015. V. 7. P. 3170–3179.
6. Zheng H., Shashkov A.S., Xiong Y., Naumenko O.I., Wang H., Senchenkova S.N., Wang J., Knirel Y.A. // *Carbohydr. Res.* 2017. V. 446–447. P. 28–31.
7. Naumenko O.I., Xiong Y., Zheng H., Senchenkova S.N., Wang H., Shashkov A.S., Li Q., Wang J., Knirel Y.A. // *Carbohydr. Res.* 2018. V. 461. P. 80–84.
8. Naumenko O.I., Zheng H., Senchenkova S.N., Wang H., Li Q., Shashkov A.S., Wang J., Knirel Y.A., Xiong Y. // *Carbohydr. Res.* 2017. V. 449. P. 17–22.
9. Naumenko O.I., Zheng H., Xiong Y., Senchenkova S.N., Wang H., Shashkov A.S., Chizhov A.O., Li Q., Knirel Y.A., Wang J. // *Carbohydr. Res.* 2018. V. 457. P. 25–31.
10. Zheng H., Naumenko O.I., Wang H., Xiong Y., Senchenkova S.N., Wang J., Shashkov A.S., Li Q., Knirel Y.A. // *Carbohydr. Res.* 2019. V. 480. P. 73–79.
11. Naumenko O.I., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Zheng H., Xiong Y., Wang H., Li Q., Wang J. // *Abstr. 20th Eur. Carbohydr. Symp., 30 June–5 July 2019. Leiden, The Netherlands.*
12. Eserstam R., Rajaguru T.P., Jansson P.-E., Weintraub A., Albert M.J. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 3289–3295.
13. Jansson P.-E., Lönngren J., Widmalm G., Leontein K., Slettengren K., Svenson S.B., Wrangsell G., Dell A., Tiller P.R. // *Carbohydr. Res.* 1985. V. 145. P. 59–66.
14. Westphal A., Jann K. // *Methods Carbohydr. Chem.* 1965. V. 5. P. 83–91.
15. Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. // *Anal. Chem.* 1965. V. 37. P. 1602–1603.
16. Dues J.Ø., Gotfredsen C.H., Bock K. // *Chem. Rev.* 2000. V. 100. P. 4589–4614.
17. Lvov V.L., Filatov A.V., Perepelov A.V., Shpirt A.M., Shashkov A.S., Chizhov A.O., Knirel Y.A. // *Mendeleev Commun.* 2016. V. 26. P. 279–281.
18. Knirel Y.A., Perepelov A.V. // *Aust. J. Chem.* 2002. V. 55. P. 69–72.
19. Книрель Ю.А., Науменко О.И., Сенченкова С.Н., Перепелов А.В. // *Успехи химии.* 2019. Т. 88. С. 406–424.
20. Valvano M.A., Furlong S.E., Patel K.B. // *Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells* / Eds. Knirel Y.A., Valvano M.A., Wien: Springer, 2011. P. 275–310.
21. Cunneen M.M., Liu B., Wang L., Reeves P.R. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e67646.
22. Hao Y., Lam J.S. // *Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells* / Eds. Knirel Y.A., Valvano M.A., Wien: Springer, 2011. P. 195–235.
23. Alam J., Nassau N., Liu H.W. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 16450–16460.
24. Nassau P.M., Martin S.L., Brown R.E., Weston A., Monsey D., McNeil M.R., Duncan K. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 1047–1052.
25. King J.D., Kocincova D., Westman E.L., Lam J.S. // *Innate Immun.* 2009. V. 15. P. 261e312.
26. Westman E.L., McNally D.J., Charchoglyan A., Brewer D., Field R.A., Lam J.S. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 11854–11862.
27. Liu B., Knirel Y.A., Feng L., Perepelov A.V., Senchenkova S.N., Wang Q., Reeves P.R., Wang L. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. P. 627–653.
28. Jonsson K.H., Weintraub A., Widmalm G. // *Carbohydr. Res.* 2006. V. 341. P. 2986–2989.
29. Linnerborg M., Weintraub A., Widmalm G. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 266. P. 460–466.
30. Sengupta P., Bhattacharyya T., Shashkov A.S., Kochanowski H., Basu S. // *Carbohydr. Res.* 1995. V. 277. P. 283–290.
31. Ali T., Weintraub A., Widmalm G. // *Carbohydr. Res.* 2008. V. 343. P. 695–702.
32. Lindberg B., Lindh F., Lönngren J., Lindberg A.A., Svenson S.B. // *Carbohydr. Res.* 1981. V. 97. P. 105–112.
33. Knirel Y.A., Paramonov N.A., Vinogradov E.V., Shashkov A.S., Dmitriev B.A., Kochetkov N.K., Kholodkova E.V., Stanislavsky E.S. // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 167. P. 549–561.

O-Specific Polysaccharides (O-Antigens) of a New Species of Enteric Bacteria *Escherichia albertii* Closely Related to *Escherichia coli*

O. I. Naumenko*, S. N. Senchenkova*, and Yu. A. Knirel*.*#

*Phone: +7 (499) 137-61-48; e-mail: yknirel@gmail.com

*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 47, Moscow, 119991 Russia

The present review summarizes data on structure and genetics of biosynthesis of O-specific polysaccharides (O-antigens) of all nine known molecular types (potential O-serotypes) of a new species of enteric bacteria *Escherichia albertii*, a causative agent of intestinal infections in humans and birds. Advantages and limitations of methods of structural analysis, which were used for structure elucidation of *E. albertii* polysaccharides, are discussed. Functions of genes in the gene clusters of *E. albertii* O-antigen biosynthesis were annotated by comparison with sequences in available databases. Attention is paid to structural and genetic relationships between the O-antigens of *E. albertii* and a closely related species *E. coli*. In addition to the O-antigen, *E. albertii* O9 was found to express a mannan having the same structure as the mannan of *E. coli* O8.

Keywords: O-specific polysaccharide, structure, bacterial mannan, glycosidic linkage, selective cleavage, O-antigen, biosynthesis, O-antigen gene cluster, glycosyltransferase, *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*