

УДК 577.114.5;577.21;579.842.15

МОДИФИКАЦИИ О-АНТИГЕНОВ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ АНТИГЕННОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ШИГЕЛЛ ФЛЕКСНЕРА, И ОПОСРЕДУЮЩИЕ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Обзор

© 2015 Ю.А. Книрель^{1*}, Цян-Чжэн Сунь², С.Н. Сенченкова¹,
А.В. Перепелов¹, А.С. Шашков¹, Цзянь-Го Сюй²

¹ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
119991 Москва, Ленинский просп., 47; факс: +7(499)137-6148,
электронная почта: yknirel@gmail.com

² National Institute for Communicable Disease Control and Prevention,
China CDC, P. O. Box 5, Changping, Beijing 102206, China;
E-mail: sunqiangzheng@icdc.cn

Поступила в редакцию 11.12.14
После доработки 24.02.15

О-антигены (О-специфические полисахариды) шигелл Флекснера (*Shigella flexneri*) – одного из основных возбудителей шигеллеза – отличаются широким разнообразием химических модификаций, происходящих после сборки олигосахаридного О-звена. Настоящий обзор посвящен структурным, серологическим и генетическим аспектам этих модификаций, включая недавно обнаруженные О-ацетилирование и фосфорилирование фосфотаноламином. Эти модификации наделяют хозяина специфическими иммунодетерминантами (О-факторами или О-антигенными эпитопами), которые обуславливают антигенное разнообразие шигелл Флекснера, рассматриваемое как один из факторов вирулентности этого патогена. Всего идентифицировано 30 вариантов О-антигенов шигелл Флекснера, и соответствующие им О-факторы охарактеризованы с помощью специфических антител. На основании этих данных предложено существенно расширить схему серотипирования этих бактерий. Идентифицирован ряд генов, ответственных за модификации О-антигенов и вызываемые ими конверсии серотипов *S. flexneri*. Выявлены генетические механизмы диверсификации О-антигенов, включающие приобретение мобильных генетических элементов, таких как профаги и плазмиды, возможно, с последующей мобилизацией и инактивацией генов. Полученные результаты углубляют наши представления о генетике и антигенности шигелл Флекснера и способствуют контролю над распространением шигеллеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Shigella flexneri*, О-антиген, структура О-полисахарида, серотип-конвертирующий бактериофаг, транспозон, плаزمид, серотипирование.

Шигеллез, или бактериальная дизентерия, – острое диарейное заболевание, остающееся серьезной проблемой здравоохранения, особенно в развивающихся странах. В мире ежегодно регистрируется 164,7 млн случаев, приводящих к 1,1 млн смертельных исходов, в основном среди детей младше пяти лет [1]. Возбудителем шигеллеза являются шигеллы (*Shigella*) – неподвижные непорообразующие факультативные анаэробные

грамотрицательные бактерии, которые входят в число бактериальных патогенов, наиболее часто выделяемых от пациентов с диареей. Инвазия этими бактериями слизистой оболочки толстого и прямого кишечника с последующим воспалительным ответом приводят к обширному разрушению слизистой, сопровождающемуся сильными коликами в животе и появлению крови и слизи в стуле [2]. На основании биохимических свойств и специфичности О-антигенов род *Shigella* разделяют на четыре вида или подгруппы: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* и *S. sonnei* [3], хотя генетически все они, за исключением *S. boydii* типа 13, являются клонами *Escherichia coli* [4]. *S. flexneri* является преобладающим видом, вызывающим шигеллез в развивающихся странах,

Принятые сокращения: GalA – галактуронозная кислота, GalNAc – 2-ацетамидо-2-дезоксигалактоза, GlcNAc – 2-ацетамидо-2-дезоксиглюкоза, IS – вставочная последовательность, ЛПС – липополисахарид, PEtN – фосфотаноламин, Rha – рамноза, Sf – *Shigella flexneri*.

* Адресат для корреспонденции.

и вторым по распространенности после *S. sonnei* в промышленно развитых странах [5–7].

Являясь серологически гетерогенным видом, шигеллы Флекснера подразделяется на серотипы и подтипы. Для серотипирования изолятов *S. flexneri* широко используются коммерчески доступные наборы моновалентных анти-сывороток («Denka Seiken», Япония) и моноклональных антител (MASFs) («Reagensia AB», Швеция). Сероспецифичность шигелл Флекснера определяется комбинацией иммунодетерминант (О-факторов), которые экспрессируются О-антигеном, расположенным на поверхности бактериальной клетки [3]. О-антиген, называемый также О-специфическим полисахаридом или О-полисахаридом, является частью липополисахарида (ЛПС) – компонента внешней мембраны клеточной оболочки. Он присоединяется к липидному якорю ЛПС (липиду А) через олигосахарид, называемый кором. О-полисахариды состоят из множества повторяющихся олигосахаридных единиц (О-звеньев). Структура и серология О-антигенов шигелл Флекснера являются предметом пристального внимания исследователей на протяжении последних 50 лет ([8–10] и цитируемые в них статьи).

О-антигены *S. flexneri* синтезируются по О-антиген-полимераза (Wzy)/флипаза (Wzx)-зависимому пути, согласно которому О-звено предварительно собирается на липидном носителе на цитоплазматической стороне внутренней мембраны и после переноса через мембрану (флиппинга) на периплазматическую сторону, контролируемого белком Wzx, полимеризуется с помощью белка Wzy при участии регулятора длины цепи Wzz. Известны две базовые структуры О-полисахаридов шигелл Флекснера, которым соответствуют два консервативных генных кластера биосинтеза О-антигена: один у серотипа 6 и другой у всех остальных серотипов. Бактерии этих двух групп имеют различное эволюционное происхождение и принадлежат к разным линиям клонов *Shigella* в составе *E. coli* [4]. Как и у большинства других клонов *E. coli*, включая другие виды шигелл, генный кластер О-антигена расположен на хромосоме между генами домашнего хозяйства *galF* и *gnd* [11]. Он содержит гены синтеза нуклеотидного (дезокситимидиндифосфатного) предшественника L-рамнозы – специфического моносахаридного компонента обоих базовых О-полисахаридов, а также гены гликозилтрансфераз, необходимых для сборки О-звена, и гены процессинга О-антигена: *wzx* и *wzy*, кодирующие флиппазу и О-антиген-полимеразу соответственно.

Молекулярное типирование, основанное на специфических генах в кластере О-антигена,

включая *wzx*, *wzy* и гены гликозилтрансфераз, относит все серотипы шигелл Флекснера, кроме серотипа 6, к одной группе [12]. К этой же группе относятся штаммы *E. coli* O13, O129 и O135, которые имеют такую же базовую структуру [10, 13] и практически идентичный генный кластер О-антигена [11]. Аналогично *E. coli* O147 образует одну молекулярную группу и имеет идентичную структуру О-антигена с серотипом 6 шигелл Флекснера [11, 12]. Близкородственные клоны *E. coli* и *S. flexneri* могут быть дифференцированы с помощью ПЦР-тестов по генам, не связанным с синтезом О-антигена [12].

О-антигены шигелл Флекснера, не относящихся к серотипу 6, отличаются широким разнообразием благодаря различным химическим модификациям базовой структуры, обуславливающим наблюдаемую серологическую гетерогенность [3]. Эти модификации [14], которые происходят после сборки О-звена и перед переносом готового О-полисахарида на кор-липид А ЛПС, опосредуются рядом генов, расположенных вне кластера О-антигена. Для серотипирования *S. flexneri* внутри этой группы разработан молекулярный подход, основанный на специфических генах, участвующих в модификациях О-антигена, которые были идентифицированы к тому времени [15].

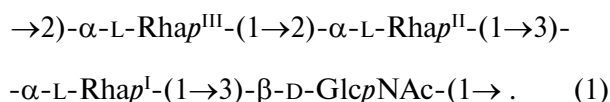
О-антиген играет важную роль в патогенезе шигелл Флекснера; в частности, он защищает бактерии от литического действия сывороточного комплемента и способствует адгезии и интернализации бактерий клетками эпителия кишечника [16–18]. Формирование антигенного разнообразия путем модификации О-антигенов считается важным фактором вирулентности *S. flexneri*, который увеличивает выживаемость патогена, вынуждая хозяина вырабатывать специфический иммунный ответ на каждый серотип [19]. Более того, такие модификации, как глюкозилирование в определенных положениях, способствуют инвазии шигеллами Флекснера клеток хозяина, опосредованной секреторной системой III типа [16].

В предыдущих обзорах, посвященных О-антигенам *S. flexneri* [9, 14, 19], были подробно рассмотрены известные на тот момент модификации, включая глюкозилирование в различных положениях и О-ацетилирование в одном положении (на Rha¹). Недавно были идентифицированы дополнительные сайты О-ацетилирования [10, 13, 20–25], а также обнаружен новый тип модификации – фосфорилирование фосфоэтаноломином (PEtN) [26–29]. Были также выяснены генетические основы этих новых модификаций. В настоящем обзоре обсуждаются структурные, серологические и генетические аспекты

модификаций О-антигенов шигелл Флекснера с уделением особого внимания новым данным.

СТРОЕНИЕ И ИМУННОСПЕЦИФИЧНОСТЬ О-АНТИГЕНОВ

О-полисахариды большинства известных серотипов шигелл Флекснера (1–5, 7, X и Y), за исключением серотипа 6, имеют одинаковую основу (1), построенную из повторяющихся тетрасахаридных О-звеньев, содержащих три остатка L-рамнозы (Rha^I–Rha^{III}) и один остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы (GlcNAc) [30]



Полисахарид (1), характерный для серотипа Y, характеризуется двумя типами антигенной специфичности, обозначаемыми как двойной групповой О-фактор 3,4. Структурный домен, обуславливающий этот О-фактор, до сих пор окончательно не идентифицирован [31, 32]. В некоторых случаях его проявления неоднозначны, т.к. штаммы, которые идентичны по строению О-антигена и присутствию других иммунодетерминант, могут как экспрессировать, так и не экспрессировать О-фактор 3,4 (например, бывшие серотипы 3b и 3c, которые предложено объединить в один серотип 3b [10]). Полисахарид (1) может быть модифицирован путем присоединения к одному или нескольким моносахаридам в О-звене различных химических групп (α -D-глюкопиранозильной, О-ацетильной, 2-аминоэтилфосфатной), иногда на конкурентной основе. Это приводит к широкому разнообразию структур О-антигенов и, соответственно, к серологической гетерогенности, служащей основой для серотипирования шигелл Флекснера (таблица).

Глюкозилированию может подвергаться любой из моносахаридов в полисахариде (1), что приводит к формированию типовых О-факторов I, II, IV и V (при глюкозилировании остатков Rha^I, Rha^{II} или GlcNAc в различные положения) и двойному групповому О-фактору 7,8 (при глюкозилировании остатка Rha^{III}) (рис. 1). Типовые О-факторы определяют серотипы 1, 2, 4 и 5 соответственно, в то время как групповой О-фактор 7,8 может экспрессироваться в различных серотипах и встречаться в комбинации с различными типовыми О-факторами [8, 9, 34, 35] (таблица). В результате в О-звеньях некоторых подтипов присутствуют две боковые глюкозильные группы. Степень глюкозилирования в

каждом из положений близка к стехиометрической, но первое О-звено О-полисахаридной цепи, присоединенное к кору ЛПС, не содержит глюкозных остатков [39–41].

В серотипе 7 остаток GlcNAc несет дисахарид α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp-(1→ [37, 38], определяющий О-фактор VII (IC). Подтип 7a первоначально назывался 1c [37], но дикие штаммы этого подтипа не реагируют с антителами к О-фактору I. В связи с этим было предложено переименовать его в 7a и заменить типовой О-фактор IC на VII в схеме серотипирования шигелл Флекснера [38].

О-Ацетилирование встречается на остатках Rha^I, Rha^{III} и GlcNAc [10, 22–24, 33, 38, 42] (рис. 1). Степень О-ацетилирования различна и, скорее всего, зависит не только от штамма, но и от условий его хранения и выращивания. 2-О-Ацетилирование остатка Rha^I стехиометрическое или близкое к стехиометрическому, в то время как степень 6-О-ацетилирования остатка GlcNAc варьируется от 30 до 75%. Остаток Rha^{III} О-ацетилирован в положении 3 в одних О-звеньях и в положении 4 в некоторых других (3/4-О-ацетилирование); при этом первый вариант является основным (25–70%), а второй – минорным (15–25%). В О-звеньях О-полисахаридов серотипа 2a обнаружены все комбинации О-ацетилированных и неацетилированных остатков Rha^{III} и GlcNAc, и, следовательно, О-ацетилирование обоих остатков является случайным [20]. В ЛПС с короткой О-специфической цепью, состоящей только из одного О-звена, остаток GlcNAc лишен 6-О-ацетильной группы, а остаток Rha^{III} моно-О-ацетилирован в любое из возможных положений [40].

О-Ацетилирование остатков Rha^I, Rha^{III} и GlcNAc обуславливает групповые О-факторы 6, 9 и 10 соответственно. Штаммы серотипа 3 экспрессируют типовой О-фактор III, который зависит от наличия той же 2-О-ацетильной группы на остатке Rha^I, что и групповой О-фактор 6 [42], но, в отличие от последнего, маскируется глюкозилированием остатка GlcNAc в серотипах 1b, 4b и 7b. В серотипах 1b и 4b О-фактор III может быть восстановлен путем трансформации функциональным геном специфической ацетилтрансферазы *oacD*, которая приводит к частичному 6-О-ацетилированию остатка GlcNAc (от ~25 до ~30%) с одновременным деглюкозилированием [24]. 6-О-Ацетилирование остатка GlcNAc характерно также для общего энтеробактериального полисахаридного антигена [43, 44], в результате чего связанный с ним О-фактор 10 экспрессируется рядом других энтеробактерий, включая *Shigella sonnei* (фаза II) [24].

Структуры О-полисахаридов *S. flexneri*. Включены как серотипы, получившие международное одобрение, так и провизорные серотипы, которые экспрессируют эпитопы, связанные с недавно идентифицированными О-ацетильными и PEtN-группами

Серотип	Структура О-полисахарида				
1	$\begin{array}{ccccc} R^1 & & R^2 & & \alpha\text{-D-Glcp-(1} \\ & & & & \downarrow \\ 3 & & 2 & & 4 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$				
	подтип	формула антигена	R ¹	R ²	ссылка
	1a	I: -	H	H	[8, 33]
	1a ₁	I: 9	Ac	H	[21]
	1b	I: 6; 9	Ac	Ac	[21]
	1d	I: 7,8	$\alpha\text{-D-Glcp}$	H	[34]
2	$\begin{array}{ccccc} R^1 & & \alpha\text{-D-Glcp-(1} & & R^2 \\ & & \downarrow & & \\ 3 & & 4 & & 6 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$				
	подтип	формула антигена	R ¹	R ²	ссылка
	2a ₁	II: 10	H	Ac	[33]
	2a ₂	II: 9; 10	Ac	Ac	[20, 21]
	2b	II: 7,8	$\alpha\text{-D-Glcp}$	H	[8]
	2b ₁	II: 7,8; 10	$\alpha\text{-D-Glcp}$	Ac	^a
3	$\begin{array}{ccccc} R^1 & & \text{Ac} & & R^2 \\ & & & & \\ 3 & & 2 & & 6 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$				
	подтип	формула антигена	R ¹	R ²	ссылка
	3a	III: 6; 7,8	$\alpha\text{-D-Glcp}$	H	[8], ⁶
	3a ₁	III: 6; 7,8; 10	$\alpha\text{-D-Glcp}$	Ac	[10]
	3b	III: 6	H	H	[8]
4	$\begin{array}{ccccc} R^1 & & R^2 & & \alpha\text{-D-Glcp-(1} \\ & & & & \downarrow \\ 3 & & 2 & & 6 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$				
	подтип	формула антигена	R ¹	R ²	ссылка
	4a	IV: -	H	H	[8]
	4av	IV: IV-1	PEtN	H	[26, 27]
	4b	IV: 6	H	Ac	[8]

Продолжение таблицы

5	$\begin{array}{c} R^1 \\ \\ \alpha\text{-D-Glcp-(1} \\ \downarrow \\ 3 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$					
	подтип	формула антигена	R ¹	ссылка		
	5a	V: –	H	[33, 35]		
	5a ₁	V: 9	Ac	[13]		
	5b	V: 7,8	$\alpha\text{-D-Glc}$	[35]		
X	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Glcp-(1} \\ \downarrow \\ 3 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$					
	подтип	формула антигена	R ¹	R ²	ссылка	
	X	-: 7,8	H	H	[35]	
	X ₁	-: 7,8; 10	H	Ac	^в	
	Xv	-: 7,8; IV-1	PEtN	H	[27]	
Y	$\begin{array}{c} R^1 \\ \downarrow \\ 3 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$					
	подтип	формула антигена	R ¹	R ²	R ³	ссылка
	Y	-: 3,4	H	H	H	[28, 30]
	Y ₁	-: 9	Ac	H	H	^г
	Y ₂	-: 9; 10	Ac	H	Ac	[10]
	Yv	-: IV-1	PEtN	PEtN	H	^д
	Yv ₁	-: IV-1; 10	PEtN	PEtN	Ac	[28, 29]
6	$\begin{array}{c} R^1 \\ \\ 3 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow \end{array}$					
	подтип	формула антигена	R ¹	ссылка		
	6 6v ^е	VI: 9	Ac	[10, 36]		

7	$\begin{array}{c} \text{R}^1 \\ \\ 3 \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{NAc}\text{-(1}\rightarrow \\ \uparrow \\ 4 \\ \alpha\text{-D-Glc}p\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Glc}p\text{-(1} \end{array}$				
	подтип	формула антигена	R ¹	R ²	ссылка
	7a (1c)	VII (IC): -	H	H	[37]
	7a ₁	VII: 9	Ac	H	[25]
7b	VII: 6	H	Ac	[38]	

Примечание. Остатки Rha^{III} и GlcNAc O-ацетилированы нестехиометрически. Минорное 4-O-ацетилирование остатка Rha^{III}, альтернативное основному 3-O-ацетилированию Rha^{III}, не показано. В формулах антигенов типовые и групповые факторы указаны до и после двоеточия соответственно. Экспрессия O-фактора 3,4, связанного с O-полисахаридной основой, варьируется, и, за исключением серотипа Y, в данной таблице этот фактор не включен в формулы антигенов.
^{a-д} Неопубликованные данные авторов. ^a Штамм 2005122; степень 6-O-ацетилирования GlcNAc ~75%; ^б штамм 2001019; ^в штамм 2005128; степень 6-O-ацетилирования GlcNAc ~75%; ^г штамм 06AH74; степень 3/4-O-ацетилирования Rha^{III} ~40/25%; ^а штаммы 06HN054 и 06HN303. ^е Предполагается на основании реакции с MASF IV-1 [45, 46] при отсутствии данных о структуре и генетике O-антигена.

В ранних исследованиях строения O-антигенов шигелл Флекснера O-ацетилирование остатков Rha^{III} и GlcNAc выявлено не было, и соответствующие O-факторы 9 и 10 не были включены в схему серотипирования этих бактерий. Для заполнения этого пробела мы предлагаем дополнительно подразделить существующие серотипы на O-фактор 9- и 10-положительные и -отрицательные подтипы: а) путем сохранения старых названий для подтипов, в которых отсутствуют оба O-фактора 9 и 10 [24, 33], и серотипа 1b, для которого в природе не был обнаружен подтип, отрицательный по O-фактору 9, и б) путем указания на экспрессию одного или обоих O-факторов 9 и 10 добавлением нижнего индекса 1 или 2 соответственно (например, 2a₁ и 2a₂ для подтипов, характеризующихся антигенной формулой II: 10 и II: 9; 10 соответственно). Для идентификации этих подтипов в набор для серодиагностики должны быть включены уже полученные и проверенные моноспецифические антисыворотки против O-факторов 9 [33] и 10 [24].

Фосфорилирование остатком PEtN обнаружено в подтипах 4av, Xv, Yv и Yv₁, обозначенных как «варианты» путем добавления буквы «v» к названию соответствующего PEtN-положительного подтипа [26–29]. Стехиометрическое фосфорилирование наблюдается в положении 3 остатка Rha^{III} в подтипе 4av [26] или Rha^{II} в подтипе Xv [27] (рис. 1) и сопровождается минорным

фосфорилированием (~10%) соседнего остатка рамнозы (в подтипе Xv минорная PEtN-группа заменяет глюкозильную группу на остатке Rha^{III}) [27]. В подтипах Yv и Yv₁ оба остатка рамнозы фосфорилированы: один из них полностью (Rha^{II} в подтипе Yv или Rha^{III} в подтипе Yv₁), а второй – частично ([28] и неопубликованные данные авторов). Показано, что в подтипе Yv₁ бисфосфорилирование встречается только в O-звеньях, не имеющих O-ацетильной группы, а O-полисахарид Yv₁ состоит из блоков повторяющихся звеньев, различающихся по числу PEtN-групп и присутствию или отсутствию O-ацетилирования [28].

Как и O-ацетилирование остатков Rha^{III} и GlcNAc, фосфорилирование PEtN не было выявлено в ранних исследованиях O-антигенов шигелл Флекснера, однако в диагностический набор MASF («Reagensia AB», Швеция) было включено моноклональное антитело MASF IV-1, полученное против PEtN-положительного штамма подтипа 4a (теперь 4av). Оно может использоваться для идентификации всех PEtN-положительных штаммов, т.к. соответствующий групповой O-фактор IV-1 (первоначально названный 4X [31]) связан с PEtN-фосфорилированием, независимо от того, на каком из остатков рамнозы (Rha^{II} или Rha^{III}) находится PEtN-группа [27, 29]. Тот факт, что одно и то же моноклональное антитело распознает PEtN-свя-

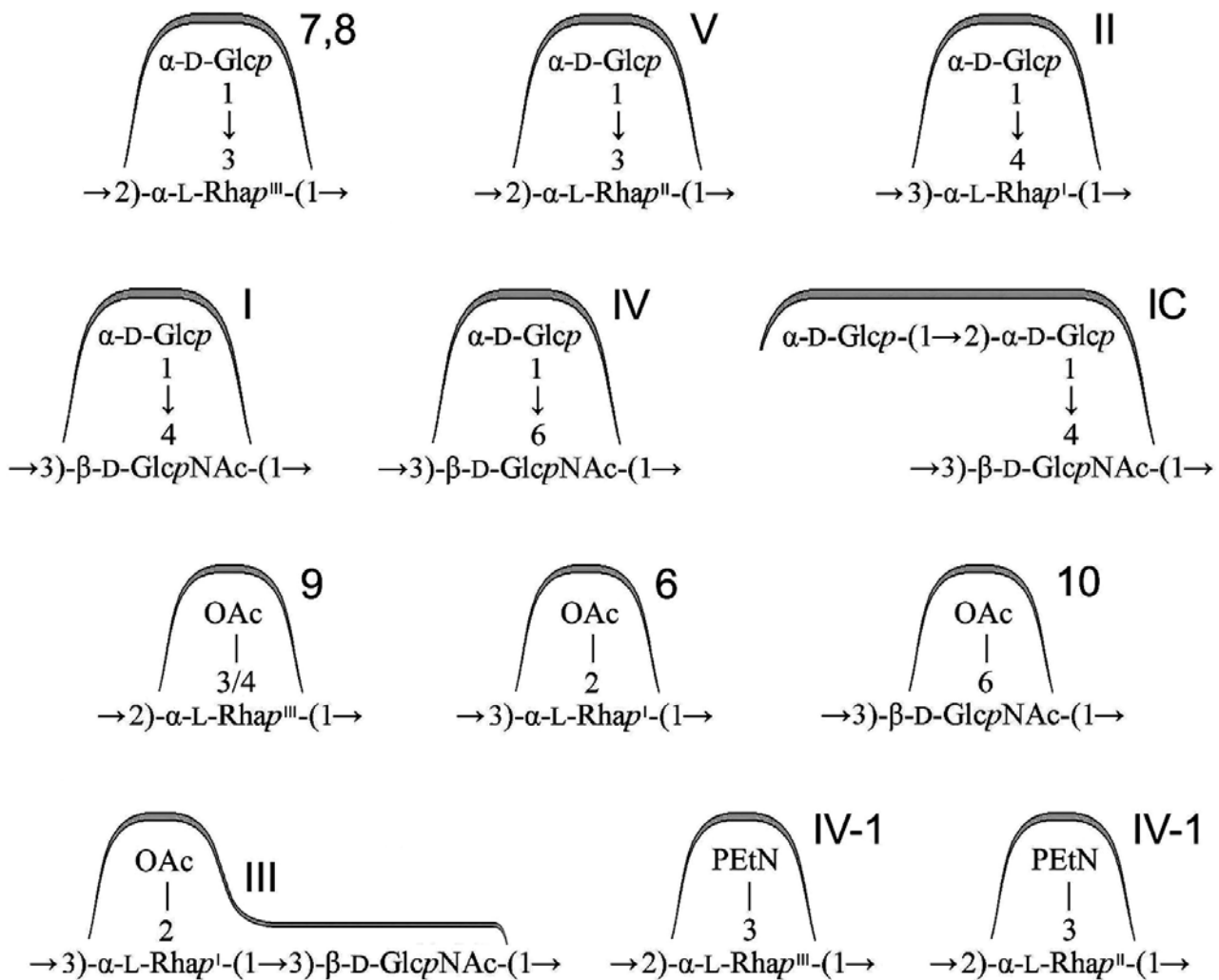
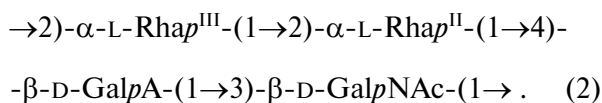


Рис. 1. О-факторы, связанные с различными группами, модифицирующими О-антиген

занный эпитоп на любом из двух моносахаридов, может быть объяснен резким поворотом полисахаридной цепи на каждом из 2-замещенных остатков Rha, что обуславливает легкую доступность как Rha^{II}, так и Rha^{III} для взаимодействия с белками, нивелируя роль соседних моносахаридных остатков.

О-полисахарид (2) серотипа 6 является кислым благодаря присутствию D-галактуроновой кислоты (GalA) [10, 36]. Первым моносахаридом в О-звене серотипа 6 является 2-ацетамидо-2-дезоксид-галактоза (GalNAc), а не GlcNAc, но α 1 \rightarrow 2-связанный дисахарид из двух остатков рамнозы на другом конце О-звена является общим для всех серотипов шигелл Флекснера



Штаммы серотипа 6 идентифицируют с помощью специфической антисыворотки VI, эпитоп которой на О-полисахариде не идентифицирован. Единственной химически охарактеризованной модификацией О-антигена серотипа 6 является 3/4-О-ацетилирование остатка Rha^{III} [10, 33]. Благодаря присутствию фрагмента О-полисахарида, общего со штаммами других серотипов, эта модификация наделяет серотип 6 О-фактором 9, который легко распознается антисывороткой, полученной против О-фактор 9-положительного штамма серотипа 2 [23, 33]. О-фактор 9 встречается во всех исследованных штаммах серотипа 6 [10, 23, 33]. Как и в серотипе 2а, в ЛПС серотипа 6 с короткой О-специфической цепью терминальный остаток Rha^{III} единственного О-звена О-ацетилирован случайным образом [40].

Семь атипичных штаммов серотипа 6, собранных в Бангладеш в 1985–1987 [45] и 1997–2000 гг. [46],

распознаются моноклональным антителом MASF IV-1, что позволяет предположить существование в природе подтипа 6v, имеющего PEtN-ассоциированный эпитоп. Структурные и генетические основы экспрессии О-фактора IV-1 в этом подтипе остаются невыясненными.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МОДИФИКАЦИЙ О-АНТИГЕНОВ И ОБУСЛОВЛЕННОЙ ИМИ КОНВЕРСИИ СЕРОТИПОВ

Глюкозилирование. В глюкозилировании О-полисахаридной основы (1) участвуют три Gtr-белка (GtrA, GtrB и Gtr-типоспецифический (Gtr-тип)). GtrA и GtrB высококонсервативны и функционально взаимозаменяемы в различных серотипах. GtrB катализирует синтез ундекапренилфосфат-β-глюкозы (UndP-β-Glc) из UDP-α-Glc, а GtrA выступает в роли флиппазы, обеспечивая транслокацию UndP-β-Glc из цитоплазмы в периплазму. Третий белок Gtr-тип является глюкозилтрансферазой, переносящей глюкозильную группу с UndP-β-Glc в определенное положение одного из моносахаридных остатков растущей О-полисахаридной цепи. В зависимости от специфичности по отношению к акцептору глюкозилтрансферазы GtrI, GtrII, GtrIV, GtrV, GtrVII (ранее GtrIc) и GtrX наделяют хозяина типовыми О-факторами I, II, IV, V, VII и групповым О-фактором X соответственно. Ферменты Gtr-тип являются интегральными мембранными белками, включающими 8–10 трансмембранных спиралей, с активными центрами, расположенными в больших периплазматических петлях на N- и C-концах. Они обладают слабым сходством с членами других известных семейств гликозилтрансфераз и предположительно относятся к GT-C суперсемейству гликозилтрансфераз, использующих фосфолипид-активированный моносахаридный субстрат-донор [47].

Единый оперон на хромосоме, кодирующий Gtr-белки (*gtr*-кластер), находится в профаге (возможно криптическом), приобретенным лизогенией бактерий одним или двумя из пяти умеренных бактериофагов (SfI, SfII, SfIV, SfV и SfX) [14, 48]. Каждый профаг (или пара профагов в случае бисглюкозилирования О-звена) интегрирован в ген *thrW* ТРНК в одной и той же области, расположенной рядом с геном *proA* в геноме *S. flexneri*. *gtr*-Кластер расположен непосредственно за сайтом присоединения фага *attP*, который следует за генами интегразы (*int*) и эксцизионазы (*xis*). Все бактериофаги были выделены из соответствующих штаммов *S. flexneri* и охарактеризованы [41, 46–54].

Лизогения бактериофагами SfI, SfII, SfIV, SfV и SfX превращает серотип Y в серотипы 1a, 2a, 4a, 5a и X соответственно (рис. 2), однако диапазон возможных реципиентов среди других серотипов различен. Так, из 12 изученных серотипов реципиентом для SfI является только серотип X, для SfII – два серотипа (3b и 5a), для SfX – также два серотипа (2a₁ и 3b), для SfIV – четыре подтипа серотипов 1, VII и X и для SfV – шесть подтипов серотипов 1–4. Ограничения в узнавании хозяина, очевидно, связаны с иммунитетом к фагам бактерий с модифицированными О-антигенами, которые представляют собой рецептор для адсорбции фага на поверхности клетки. Эти ограничения являются механизмом, с помощью которого лизогения предотвращает последующую инфекцию бактерий гомологичными или сходными фагами ([52–54]; Сунь Ц., Ван Ц., Ло С. и др., неопубликованные данные). Соответственно, может быть ограничен порядок лизогении двумя фагами, приводящими к серотипам, несущим более одного связанного с фагом модифицирующего фактора. Например, фаг SfI может заражать штаммы SfX-несущего серотипа X, приводя к серотипу 1d, но штаммы серотипа 1 устойчивы к фагу SfX [55] (рис. 2).

У некоторых диких штаммов, содержащих серотип-конвертирующие фаги, встречаются инактивирующие мутации в *gtr*-локусе, приводящие к их реверсии к родительскому серотипу (Y) или (в случае бисглюкозилирования) к промежуточному серотипу (рис. 2). Например, среди 35 штаммов серотипа Y 13 штаммов содержат дефектный ген *gtrII* и 6 штаммов – дефектный ген *gtrI*. Из 19 штаммов подтипов Yv и Yv₁, положительных по О-фактору IV-1, 13 штаммов имеют мутации в одном или обоих генах *gtrII* и *gtrB*, а 3 штамма несут дефектный ген *gtrX* [29]. В результате один и тот же серотип может иметь множественное происхождение; например, подтипы Yv и Yv₁ возникали независимо по меньшей мере трижды из серотипов Y, Xv и 2a в результате приобретения *opt*-несущей плазмиды, инактивации одного из *gtr*-генов или обоих событий соответственно [29] (рис. 2).

В серотипе 7, который отличается присутствием в качестве боковой цепи α1→2-связанного дисахарида глюкозы, присоединение первой глюкозильной группы опосредуется тем же *gtr*-кластером в профаге SfI, что и в серотипе 1 [56]. Ген *gtrVII*, первоначально названный *gtrIC*, кодирует серотип 7-специфическую глюкозилтрансферазу, которая присоединяет второй остаток глюкозы к первому. Как и другие типоспецифические гены *gtr*-тип, *gtrVII* входит в *gtr*-кластер из трех генов, но он расположен в дру-

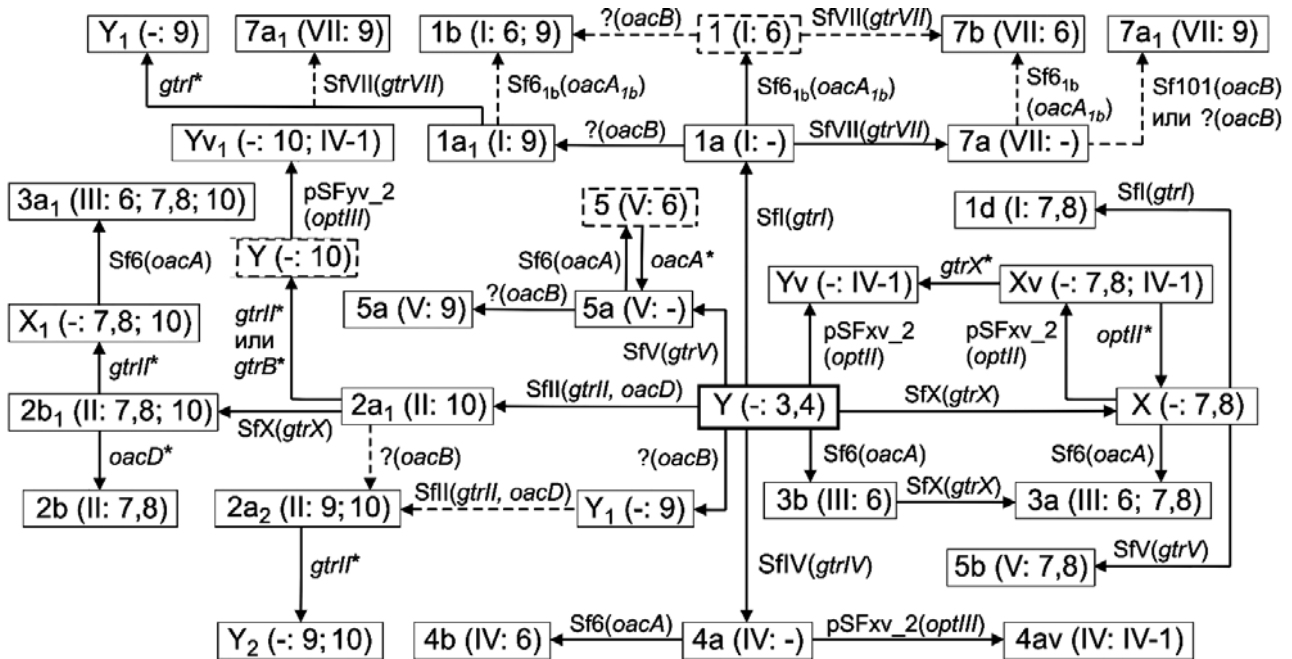


Рис. 2. Пути конверсии серотипов 1–5, 7, X и Y, опосредуемые бактериофагами SfI, SfII, SfIV, SfV, SfVII, SfX, Sf6 или Sf6_{1b}, Sf101 и плазмидами pSFYv₂ или pSFXv₂. Адаптировано на основании данных [24, 25, 27, 29, 52–56, 59] и неопубликованных данных Сунь Ц., Ван Ц., Ло С. и др. Формулы антигенов приведены в скобках (за исключением серотипа Y, групповой O-фактор 3,4, связанный с основой O-полисахарида, не показан). Звездочка указывает на инактивацию гена. Пунктирные стрелки обозначают, что последовательность серотип-конвертирующих событий неизвестна. Предположительные интермедиаты, которые не были найдены в природе, показаны в пунктирных рамках. Гипотетические бактериофаги Sf6_{1b} и SfVII не были выделены. Происхождение гена *oacB* из бактериофага Sf101 установлено для двух штаммов серотипа 7a₁, а мобилизация *oacB* в другие штаммы серотипа 7a и штаммы других серотипов с 3/4-O-ацетилированными O-антигенами предположительно происходит путем разрыва профага Sf101 элементами IS с последующей рекомбинацией [25]

гой области хромосомы рядом с консервативным локусом *uejO*. Он отдаленно родственен другим *gtr*-кластерам шигелл Флекснера и предположительно был приобретен путем заражения гипотетическим бактериофагом SfVII (SfIC) [56].

O-Ацетилирование. 2-O-Ацетилирование остатка Rha^I катализируется ацетилтрансферазой, которая первоначально была названа *Oac*, но после обнаружения в шигеллах Флекснера других O-антиген-модифицирующих ацетилтрансфераз было предложено переименовать ее в *OacA* [22]. Акцептором *OacA* является O-антиген серотипа Y с базовой структурой (1), а также некоторые другие серотипы (рис. 2). *OacA* включает 10 α-спиральных трансмембранных областей, N- и C-концы которых расположены в цитоплазме. Она гомологична нескольким известным и предсказанным ацетилтрансферазам, причем большая часть гомологии приходится на N-терминальные трансмембранные области [57]. В серотипах 3a, 3b и 4b ген *oacA* и соседний ген, кодирующий интегразу, находятся в уме-

ренном бактериофаге Sf6, который, как и бактериофаги, имеющие *gtr*-локус, принадлежит к группе канонических лямбовидных фагов. Геном Sf6 интегрирован в ген *argW* тРНК хромосомы хозяина рядом с консервативным геном *yfdC* (рис. 3, a) [58].

Серотипы 1b [59] и 7b (неопубликованные данные авторов) имеют вариант гена *oacA*, получивший название *oacA_{1b}* (первоначально *oac_{1b}*), который на 88–89% идентичен *oacA* на уровне ДНК и на 85% – на белковом уровне. Несмотря на довольно существенное различие в последовательностях, *oacA* и *oacA_{1b}* функционально взаимозаменяемы в отношении 2-O-ацетилирования остатка Rha^I. *oacA_{1b}* расположен в области хромосомы между консервативными генами *torT* и *ucmA*, которая, очевидно, имеет фаговое происхождение, но отличается от генома фага Sf6 (рис. 3, a). В то время как серотипы 3a, 3b и 4b могут быть получены путем заражения бактериофагом Sf6 штаммов серотипов X, Y и 4a соответственно, этот фаг не может превратить серотип 1a в серотип 1b. Таким образом, вероятнее

всего, *oacA_{1b}* был получен не в результате дивергенции гена *oacA*, а приобретен извне *S. flexneri*, возможно, в результате заражения другим бактериофагом (гипотетическим Sf6_{1b}).

6-О-Ацетилирование GlcNAc опосредуется гомологом *oac*, обозначенным *oacD*. Он находится в бактериофаге SfII, который одновременно ответственен за 4-О-гликозилирование остатка Rha^I, приводящее к серотипу 2 (рис. 3, б) [24]. Присутствие вставочной последовательности (IS) перед *oacD* позволяет предположить, что этот ген был включен в геном SfII в результате инсерции. Функциональный ген *oacD* присутствует также в штаммах нескольких других серотипов (3a₁, X₁, Y₁, Y₂, YV₁), которые содержат

криптический профаг SfII с нефункциональным *gtr*-локусом, ответственным за гликозилирование II типа. Таким образом, 6-О-ацетилирование GlcNAc, катализируемое ацетилтрансферазой OacD, не зависит от присутствия функционального *gtr*-локуса.

3/4-О-Ацетилирование остатка Rha^{III}, которое встречается в подтипах 1a₁, 1b, 2a₂, 5a₁, 7₁, Y₁, 6 и Y₂ [22, 25], опосредуется другим гомологом Oac, получившим название OacB. На эту модификацию не влияет трансформация штаммов 2a₂ и Y₁ локусом *gtrABX* для 3-О-гликозилирования (неопубликованные данные авторов) или геном *optII* для 3-О-фосфорилирования [60] остатка Rha^{III}. Напротив, трансформация штам-

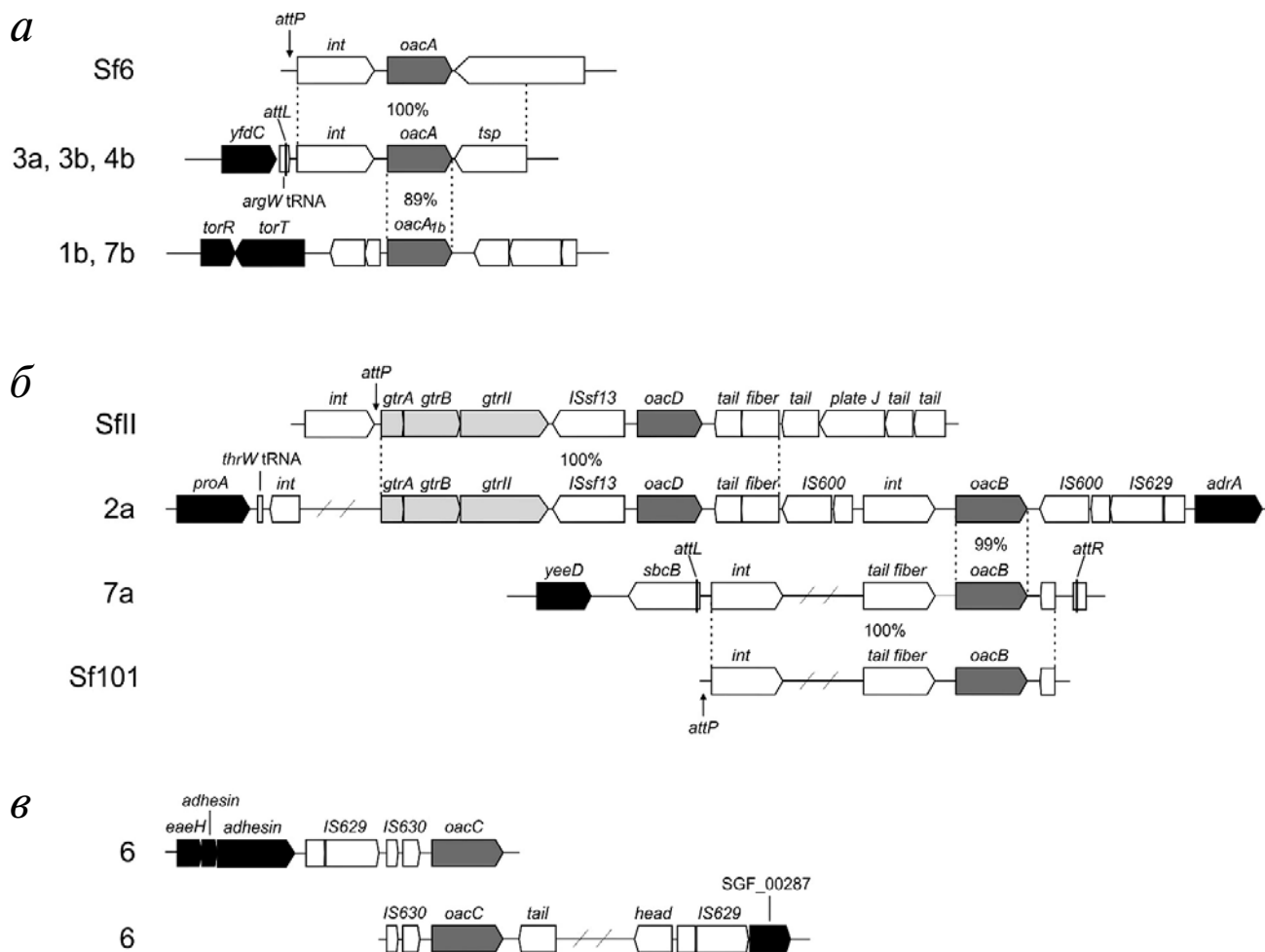


Рис. 3. Организация областей геномов бактериофагов и шигелл Флекснера, включающих гены О-ацетилтрансфераз: *oacA* (бывший *oac*) в бактериофаге Sf6 и серотипах 3a (подтип 3a₁), 3b, 4b и *oacA_{1b}* (бывший *oac_{1b}*) в серотипах 1b и 7b (a); *oacD* в бактериофаге SfII и серотипе 2a (подтип 2a₂, штамм Sf301), *oacB* в бактериофаге Sf101 и серотипах 7a (подтип 7a₁, штамм SFL1683) и 2a (б); *oacC* в серотипе 6 (штамм ССН 060 вверху и CDC 796-83 внизу) (в). Адаптировано на основании данных [22–25, 57, 59]. Локус *gtr* для гликозилирования II типа, гены О-ацетилтрансфераз и консервативные фланкирующие гены показаны светло-серым, темно-серым и черным цветом соответственно. *attP* указывает на сайт присоединения фага, *attL* и *attR* указывают на левый и правый концы интегрированного фагового генома

мов 2b и X геном *oacB* из штамма 2a₂ приводит к их превращению в серотипы 2a и Y соответственно вследствие замены 3-О-глюкозилирования на 3/4-О-ацетилирование остатка Rha^{III} [22]. Механизм, который делает О-ацетилирование более предпочтительной модификацией Rha^{III}, остается невыясненным.

Выявлено два альтернативных местоположения гена *oacB* на бактериальной хромосоме. В некоторых штаммах подтипа 7a₁ он находится в профаге Sf101, интегрированном в ген *sbcB* рядом с геном *yeed* [22] (рис. 3, б). В ряде других штаммов подтипа 7a₁ [25] и штаммах других серотипов, характеризующихся 3/4-О-ацетилированием [22], ген *oacB* расположен перед геном *adrA* в той же области *proA-adrA* на хромосоме, в которую интегрированы *gtr*-несущие профаги. Он следует за геном, кодирующим интегразу (*int*), и локус *int-oacB* фланкирован элементами IS, образуя транспозон-подобную структуру [22]. В изученных штаммах серотипа 2a эта структура расположена непосредственно за геном профага SfII (рис. 3, б).

В серотипе 6 присутствует еще один гомолог *oac*, называемый *oacC*, который отвечает за 3/4-О-ацетилирование остатка Rha^{III} и является общим для всех штаммов этого серотипа (рис. 3, в) [23]. Он расположен в фагоподобной структуре, находящейся в другой области хромосомы (рис. 3, в). Последовательности *OacB* и *OacC* обладают высокой степенью гомологии (идентичность 72%) и являются функционально взаимозаменяемыми в отношении 3/4-О-ацетилирования остатка Rha^{III}. Это неудивительно, поскольку О-полисахариды всех серотипов шигелл Флекснера имеют общий дисахаридный фрагмент $\rightarrow 2) - \alpha - L - Rha^{III} - (1 \rightarrow 2) - \alpha - L - Rha^{II} - (1 \rightarrow$, который, очевидно, является субстратом-акцептором как для *OacB*, так и для *OacC*. Все три известные ацетилтрансферазы *OacA-OacC*, модифицирующие остатки рамнозы, обладают высокой гомологией в областях, консервативных у белков внутренней мембраны семейства *трансацилаз* [23]; в частности, консервативными являются аминокислотные остатки R73 и R76, ключевые для функционирования ферментов *Oac* [57]. Дивергентные гены *oac* могли быть приобретены от других видов бактерий в результате независимых событий.

PEtN-фосфорилирование. Полиморфный ген *opt* (первоначально названный *lpt-O*), кодирующий PEtN-трансферазу, отвечает за присоединение PEtN-группы к остаткам Rha^{II} или/и Rha^{III} в подтипах 4a_v, X_v, Y_v и Y_{v1} [27, 28]. Предсказанные белки Opt относятся к суперсемейству сульфатаз и содержат сульфатазный домен на карбоксильном конце, который предположительно

катализирует перенос PEtN на моносахаридный остаток. Два функционально взаимозаменяемых *opt*-аллеля, *optII* и *optIII*, находятся на двухтяжеских кольцевых плаزمиде длиной 6850 п.н., обозначенных pSFxv_2 и pSFyv_2 соответственно (рис. 4). OptII и OptIII предпочтительно фосфорилируют остатки Rha^{II} и Rha^{III} [27–29], и кодирующие их гены присутствуют в подтипах X_v и 4a_v соответственно. Эволюция этих генов могла направляться давлением отбора. Так, в серотипе 4a остаток Rha^{III} не замещен, и OptIII может легко катализировать присоединение к нему PEtN-группы. Напротив, в серотипе X остаток Rha^{III} замещен глюкозильной группой, и фосфорилирование, опосредованное OptIII, не способно эффективно конкурировать за Rha^{III} с глюкозилированием 7,8 типа, в то время как OptII может беспрепятственно модифицировать Rha^{II}. В подтипах Y_v и Y_{v1} форма *opt* зависит от происхождения штамма: это *optII* в штаммах Y_v, полученных из серотипов Y или X_v, или *optIII* в штаммах Y_{v1}, полученных из серотипа 2 (рис. 2) [29]. Соответственно, в подтипе Y_v преимущественно фосфорилирован остаток Rha^{II}, а в подтипе Y_{v1} – остаток Rha^{III} ([28] и неопубликованные данные авторов).

Показано, что плазмиды pSFxv_2 [60] и pSFyv_2 (неопубликованные данные авторов) могут быть перенесены и стабильно поддерживаться в штаммах других серотипов *S. flexneri* (от 1 до 6), приводя к неприродным О-фактор IV-1-положительным серовариантам с сохранением или потерей исходной сероспецифичности или ослаблением проявления исходных эпитопов. Фосфорилирование PEtN-группой может пре-

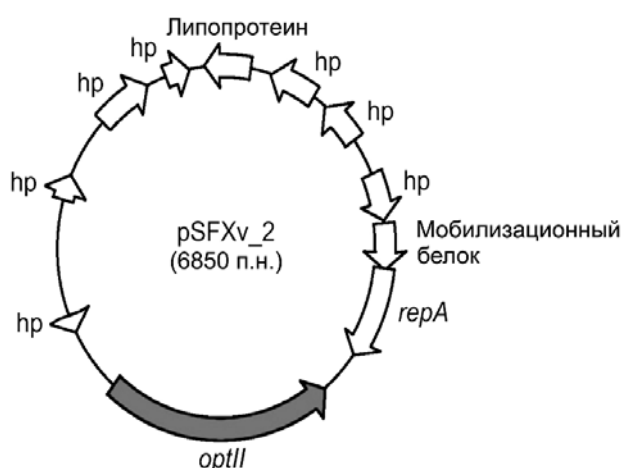


Рис. 4. Организация плазмиды pSFxv_2, несущей ген PEtN-трансферазы *optII*. Адаптировано на основании данных [27]. *repA* – ген инициации репликации белка, *hp* – гипотетический белок

пятствовать другим модификациям О-антигена не только по тому же, но и по другим моносахаридным остаткам; например, 3-О-фосфорилирование остатка Rha^{II} несовместимо с 4-О-глюкозилированием остатка Rha^I [60]. Этот факт предположительно объясняет отсутствие в природе PEtN-содержащего варианта серотипа 2a (подтипа 2av), в то время как его нефосфорилированная форма доминирует среди клинических изолятов. Это также показывает, что при образовании подтипа Yv₁ из подтипа 2a₁ сначала произошла инактивация гена *gtrII* или *gtrB*, устранившая глюкозилирование II типа, и только затем была приобретена плазида pSFYv_2 (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известные модификации О-антигенов шигелл Флекснера включают глюкозилирование, О-ацетилирование или/и PEtN-фосфорилирование различных моносахаридов в О-звене. Ни одна из них в отдельности не является уникальной, но их различные сочетания обуславливают необычайно высокое разнообразие О-антигенных форм. В настоящее время обнаружено около 30 структурных вариантов О-антигенов шигелл Флекснера с одной и той же базовой структурой, что существенно превышает их число, отмеченное у каких-либо других бактерий.

Известно, что глюкозилирование происходит на периплазматической стороне внутренней мембраны одновременно с полимеризацией О-звена [14]. Данные по О-ацетилированию, обобщенные ранее [14], являются противоречивыми, и остается неизвестным, на каком этапе происходит фосфорилирование О-антигена. Некоторые модификации различных моносахаридных остатков, например, 4-О-глюкозилирование остатка Rha^I и 3-О-фосфорилирование остатка Rha^{II}, несовместимы друг с другом. Характер модификаций первого О-звена, которое присоединено к кору ЛПС, может отличаться; в частности, это касается глюкозилирования, которое происходит, начиная только со второго О-звена с растущего конца, в то время как первое О-звено остается немодифицированным [40]. Этот факт, а также то, что одна и та же полимеразы Wzy катализирует синтез разных по структуре О-полисахаридов, указывает на сложные взаимодействия ферментов, участвующих в полимеризации и модификациях О-антигена, которые пока остаются невыясненными.

Разнообразные модификации О-полисахаридов кодируются рядом генов, находящихся вне кластера О-антигена между генами *galF* и *gnd*. Роль каждого из них была определена с по-

мощью серологического анализа диких штаммов и неполярных мутантов и установления строения выделенных О-полисахаридов. Был выявлен ряд генетических механизмов, лежащих в основе модификаций О-антигенов шигелл Флекснера и приводящих к конверсии серотипов.

Наиболее распространенным механизмом является лизогения бактериофагами, кодирующими глюкозилтрансферазы и/или ацетилтрансферазы. Один из бактериофагов – SfII – включает как генный кластер *gtr*, ответственный за 4-О-глюкозилирование остатка Rha^I, так и ген *oacD*, опосредующий 6-О-ацетилирование остатка GlcNAc [24]. Такое присутствие в одном серотип-конвертирующем фаге двух генетических факторов, участвующих в различных типах модификаций О-антигена, является уникальным для шигелл Флекснера.

Еще одним способом мобилизации факторов модификации О-антигена является комбинация гена *oacB*, отвечающего за 3/4-О-ацетилирование остатка Rha^{III}, с несколькими элементами IS, приводящая к транспозон-подобной структуре [22], которая могла возникнуть в результате разрыва *oacB*-несущего профага Sf101 элементами IS [25].

Большинство *gtr*-содержащих профагов и *oacB*-несущий локус находятся в одной и той же области хромосомы перед геном *adrA*, которая, очевидно, является консервативным сайтом вставки подвижных генетических элементов. С другой стороны, *gtr*-локус, ответственный за присоединение второго остатка глюкозы в серотипе 7, а также ген *oacB* в некоторых штаммах подтипа 7a₁ и гены всех других ацетилтрансфераз являются частью генома бактериофага или фагоподобной структуры, интегрированной в различные области хромосомы. Полиморфный ген *opt*, который кодирует PEtN-трансферазы, ответственные за фосфорилирование остатков Rha^{III} или/и Rha^{II}, находится на плазмиде размером 6,85 кб, которая обладает высоким потенциалом распространения среди серотипов шигелл Флекснера ([60] и неопубликованные данные авторов).

Таким образом, первичным генетическим механизмом диверсификации структур О-антигенов шигелл Флекснера (за исключением серотипа 6) является приобретение различных мобильных генетических факторов, включая профаги и плазмиды, которые могут легко передаваться между различными штаммами. Инактивация генов, участвующих в модификациях О-антигена, таких как *gtr*-гены, *oac* или *opt*, вносит вклад в дальнейшую конверсию серотипов. В результате участия нескольких факторов моди-

фикации О-антигенов один и тот же серотип может возникать несколько раз, причем не только одним и тем же [61], но и разными путями, включая как приобретение, так и потерю одного или нескольких факторов (рис. 2).

Недавнее обнаружение PEtN-фосфорилирования и идентификация новых сайтов О-ацетилирования уточнили представление об антигенной гетерогенности шигелл Флекснера (таблица, рис. 2). Стало ясно, что разнообразие О-антигенных форм у этих бактерий ранее недооценивалось. Для их отдельного детектирования предложено использовать специфические антисыворотки, полученные абсорбцией иммунных сывороток против диких штаммов соответствующими изогенными мутантами или наоборот [23, 24, 27, 28, 33, 62, 63], а также молекулярные подходы с использованием в качестве мишеней специфических генов, ответственных за модификации О-антигена [22–24, 27, 28, 61]. Серологический и молекулярный скрининг показали, что большинство недавно открытых форм О-антигенов встречается довольно часто. Полученные данные указывают на необходимость расширения существующей схемы серотипирования шигелл Флекснера за счет включения представительных штаммов новых вариантов в качестве отдельных подтипов.

Иммунный ответ человека на инфекцию, вызванную шигеллами Флекснера, является серотип-специфичным и формирует защиту от дальнейшей инфекции только тем же серотипом. Наряду с приобретением множественной антибиотикоустойчивости появление новых поверхностных эпитопов в результате модификаций О-антигена может предоставить патогену существенное преимущество и облегчить его распространение в человеческих популяциях.

Например, серотип Хv, характеризующийся PEtN-фосфорилированием Rha^{II}, первоначально появился в одной из провинций Китая в 2001 г. и распространился на большинство провинций за короткий период времени, обойдя 2а в качестве самого распространенного серотипа [62]. Известно, что глюкозилирование остатков Rha^I, Rha^{II} и GlcNAc наделяет штаммы шигелл Флекснера специфическими преимуществами [16], и можно предполагать, что 3/4-О-ацетилирование остатка Rha^{III} также каким-то образом полезно для бактерий, т.к. оно встречается в >95% штаммов серотипов 1а, 1b и 2а, наиболее распространенных в развивающихся странах.

Таким образом, представленные в обзоре данные, включая особенности модификации О-антигенов и лежащих в их основе генетических механизмов, проливают свет на роль вариации О-антигенов в антигенности, патогенности и эпидемичности шигелл Флекснера и указывают направления их дальнейших исследований. Эти данные будут полезны при разработке улучшенных методов диагностики и эффективных вакцин против шигеллеза, основанных на недавно открытых генах и эпитопах.

Авторы признательны своим коллегам, внесшим существенный вклад в развитие данной области.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-14-01042, Книрель Ю.А.), Национального фонда естественных наук Китая (грант 81271788, Ц. Сунь и Ц. Сюй) и Национальной ключевой программы инфекционных заболеваний Китая (гранты 2013ZX10004221, 2013ZX10004216-001-002; Ц. Сунь и Ц. Сюй).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bardhan, P., Faruque, A.S., Naheed, A., and Sack, D.A. (2010) Decrease in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia, *Emerg. Infect. Dis.*, **16**, 1718–1723.
- Schroeder, G.N., and Hilbi, H. (2008) Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion, *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**, 134–156.
- Ewing, W.H., and Lindberg, A.A. (1984) Serology of *Shigella*, *Methods Microbiol.*, **14**, 113–142.
- Pupo, G.M., Lan, R., and Reeves, P.R. (2000) Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10567–10572.
- Kotloff, K.L., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., Clemens, J.D., Swerdlow, D.L., Sansonetti, P.J., Adak, G.K., and Levine, M.M. (1999) Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies, *Bull. World Health Organ.*, **77**, 651–666.
- Shiferaw, B., Shallow, S., Marcus, R., Segler, S., Soderlund, D., Hardnett, F.P., and Van Gilder, T. (2004) Trends in population-based active surveillance for shigellosis and demographic variability in FoodNet sites, 1996–1999, *Clin. Infect. Dis.*, **38** (Suppl. 3), 175–180.
- Livio, S., Strockbine, N., Panchalingam, S., Tennant, S.M., Barry, E.M., Marohn, M.E., Antonio, M., Hossain, A., Mandomando, I., Ochieng, J.B., Oundo, J.O., Qureshi, S., Ramamurthy, T., Tamboura, B., Adegbola, R.A., Hossain, M.J., Saha, D., Sen, S., Faruque, A.S., Alonso, P.L., Breiman, R.F., Zaidi, A.K., Sur, D., Sow, S.O., Berkeley, L.Y., O'Reilly, C., Mintz, E.D., Biswas, K., Cohen, D., Farag, T.H., Nasrin, D., Wu, Y., Blackwelder, W.C., Kotloff, K.L., Nataro, J.P., and Levine, M.M. (2014)

- Shigella* isolates from the Global Enteric Multicenter study inform vaccine development, *Clin. Infect. Dis.*, **59**, 933–941.
8. Kenne, L., Lindberg, B., Petersson, K., Katzenellenbogen, E., and Romanowska, E. (1978) Structural studies of *Shigella flexneri* O-antigens, *Eur. J. Biochem.*, **91**, 279–284.
 9. Simmons, D.A.R., and Romanowska, E. (1987) Structure and biology of *Shigella flexneri* O antigens, *J. Med. Microbiol.*, **23**, 289–302.
 10. Perepelov, A.V., Shekht, M.E., Liu, B., Shevelev, S.D., Ledov, V.A., Senchenkova, S.N., L'vov, V.L., Shashkov, A.S., Feng, L., Aparin, P.G., Wang, L., and Knirel, Y.A. (2012) *Shigella flexneri* O-antigens revisited: final elucidation of the O-acetylation profiles and a survey of the O-antigen structure diversity, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **66**, 201–210.
 11. Liu, B., Knirel, Y.A., Feng, L., Perepelov, A.V., Senchenkova, S.N., Wang, Q., Reeves, P.R., and Wang, L. (2008) Structure and genetics of *Shigella* O antigens, *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 627–653.
 12. Li, Y., Cao, B., Liu, B., Liu, D., Gao, Q., Peng, X., Wu, J., Bastin, D.A., Feng, L., and Wang, L. (2009) Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of *Shigella*, *J. Med. Microbiol.*, **58**, 69–81.
 13. Perepelov, A.V., Shevelev, S.D., Liu, B., Senchenkova, S.N., Shashkov, A.S., Feng, L., Knirel, Y.A., and Wang, L. (2010) Structures of the O-antigens of *Escherichia coli* O13, O129 and O135 related to the O-antigens of *Shigella flexneri*, *Carbohydr. Res.*, **345**, 1594–1599.
 14. Allison, G.E., and Verma, N.K. (2000) Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*, *Trends Microbiol.*, **8**, 17–23.
 15. Sun, Q., Lan, R., Wang, Y., Zhao, A., Zhang, S., Wang, J., Xia, S., Jin, D., Cui, Z., Zhao, H., Li, Z., Ye, C., Jing, H., and Xu, J. (2011) Development of a multiplex PCR assay targeting O-antigen modification genes for molecular serotyping of *Shigella flexneri*, *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 3766–3770.
 16. West, N.P., Sansonetti, P., Mounier, J., Exley, R.M., Parsot, C., Guadagnini, S., Prevost, M.C., Prochnicka-Chalufour, A., Delepierre, M., Tanguy, M., and Tang, C.M. (2005) Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS, *Science*, **307**, 1313–1317.
 17. Kohler, H., Rodrigues, S.P., and McCormick, B.A. (2002) *Shigella flexneri* interactions with the basolateral membrane domain of polarized model intestinal epithelium: role of lipopolysaccharide in cell invasion and in activation of the mitogen-activated protein kinase ERK, *Infect. Immun.*, **70**, 1150–1158.
 18. Hong, M., and Payne, S.M. (1997) Effect of mutations in *Shigella flexneri* chromosomal and plasmid-encoded lipopolysaccharide genes on invasion and serum resistance, *Mol. Microbiol.*, **24**, 779–791.
 19. Brahmabhatt, H.N., Lindberg, A.A., and Timmis, K.N. (1992) *Shigella* lipopolysaccharide: structure, genetics, and vaccine development, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **180**, 45–64.
 20. Kubler-Kielb, J., Vinogradov, E., Chu, C., and Schneerson, R. (2007) O-Acetylation in the O-specific polysaccharide isolated from *Shigella flexneri* serotype 2a, *Carbohydr. Res.*, **342**, 643–647.
 21. Perepelov, A.V., L'vov, V.L., Liu, B., Senchenkova, S.N., Shekht, M.E., Shashkov, A.S., Feng, L., Aparin, P.G., Wang, L., and Knirel, Y.A. (2009) A similarity in the O-acetylation pattern of the O-antigens of *Shigella flexneri* types 1a, 1b and 2a, *Carbohydr. Res.*, **344**, 687–692.
 22. Wang, J., Knirel, Y.A., Lan, R., Senchenkova, S.N., Luo, X., Perepelov, A.V., Wang, Y., Shashkov, A.S., Xu, J., and Sun, Q. (2014) Identification of an O-acyltransferase gene (*oacB*) that mediates 3- and 4-O-acetylation of rhamnose III in *Shigella flexneri* O antigens, *J. Bacteriol.*, **196**, 1525–1531.
 23. Knirel, Y.A., Luo, X., Wang, J., Senchenkova, S.N., Lan, R., Shpirt, A.M., Du, P., Shashkov, A.S., Xu, J., and Sun, Q. (2014) Genetic and structural identification of an O-acyltransferase gene (*oacC*) responsible for the 3/4-O-acetylation on rhamnose III in *Shigella flexneri* serotype 6, *BMC Microbiol.*, **14**, 266.
 24. Sun, Q., Knirel, Y.A., Wang, J., Luo, X., Senchenkova, S.N., Lan, R., Shashkov, A.S., and Xu, J. (2014) Serotype-converting bacteriophage SfII encodes an acyltransferase protein that mediates 6-O-acetylation of GlcNAc in *Shigella flexneri* O-antigens, conferring on the host a novel O-antigen epitope, *J. Bacteriol.*, **196**, 3656–3666.
 25. Jakhelia, R., Marri, A., Stahle, J., Widmalm, G., and Verma, N.K. (2014) Serotype-conversion in *Shigella flexneri*: identification of a novel bacteriophage, Sf101, from a serotype 7a strain, *BMC Genomics*, **15**, 742.
 26. Perepelov, A.V., L'vov, V.L., Liu, B., Senchenkova, S.N., Shekht, M.E., Shashkov, A.S., Feng, L., Aparin, P.G., Wang, L., and Knirel, Y.A. (2009) A new ethanolamine phosphate-containing variant of the O-antigen of *Shigella flexneri* type 4a, *Carbohydr. Res.*, **344**, 1588–1591.
 27. Sun, Q., Knirel, Y.A., Lan, R., Wang, J., Senchenkova, S.N., Jin, D., Shashkov, A.S., Xia, S., Perepelov, A.V., Chen, Q., Wang, Y., Wang, H., and Xu, J. (2012) A novel plasmid-encoded serotype conversion mechanism through addition of phosphoethanolamine to the O-antigen of *Shigella flexneri*, *PLoS One*, **7**, e46095.
 28. Knirel, Y.A., Lan, R., Senchenkova, S.N., Wang, J., Shashkov, A.S., Wang, Y., Perepelov, A.V., Xiong, Y., Xu, J., and Sun, Q. (2013) O-antigen structure of *Shigella flexneri* serotype Yv and effect of the *lpt-O* gene variation on phosphoethanolamine modification of *S. flexneri* O-antigens, *Glycobiology*, **23**, 475–485.
 29. Sun, Q., Lan, R., Wang, J., Xia, S., Wang, Y., Wang, Y., Jin, D., Yu, B., Knirel, Y.A., and Xu, J. (2013) Identification and characterization of a novel *Shigella flexneri* serotype Yv in China, *PLoS One*, **8**, e70238.
 30. Kenne, L., Lindberg, B., Petersson, K., and Romanowska, E. (1977) Basic structure of the oligosaccharide repeating-unit of the *Shigella flexneri* O-antigens, *Carbohydr. Res.*, **56**, 363–370.
 31. Carlin, N.I.A., and Lindberg, A.A. (1987) Monoclonal antibodies specific for *Shigella flexneri* lipopolysaccharides: clones binding to type IV, V, and VI antigens, group 3,4 antigen, and an epitope common to all *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains, *Infect. Immun.*, **55**, 1412–1420.
 32. Carlin, N.I.A., Bundle, D.R., and Lindberg, A.A. (1987) Characterization of five *Shigella flexneri* variant Y-specific monoclonal antibodies using defined saccharides and glycoconjugate antigens, *J. Immunol.*, **138**, 4419–4427.
 33. Wang, J., Lan, R., Knirel, Y.A., Luo, X., Senchenkova, S.N., Shashkov, A.S., Xu, J., and Sun, Q. (2014) Serological identification and prevalence of a novel O-antigen epitope linked to 3- and 4-O-acetylated rhamnose III of lipopolysaccharide in *Shigella flexneri*, *J. Clin. Microbiol.*, **52**, 2033–2038.
 34. Shashkov, A.S., Senchenkova, S.N., Sun, Q., Lan, R., Wang, J., Perepelov, A.V., Knirel, Y.A., and Xu, J. (2013) Structure of the O-antigen of a novel *Shigella flexneri* serotype, 1d (I: 7,8), *Carbohydr. Res.*, **373**, 93–96.
 35. Kenne, L., Lindberg, B., Petersson, K., Katzenellenbogen, E., and Romanowska, E. (1977) Structural studies of the *Shigella flexneri* variant X, type 5a and 5b O-antigens, *Eur. J. Biochem.*, **76**, 327–330.
 36. Dmitriev, B.A., Knirel, Y.A., Sheremet, O.K., Shashkov, A.S., Kochetkov, N.K., and Hofman, I.L. (1979) Somatic

- antigens of *Shigella*. The structure of the specific polysaccharide of *Shigella newcastle* (*Sh. flexneri* type 6) lipopolysaccharide, *Eur. J. Biochem.*, **98**, 309–316.
37. Wehler, T., and Carlin, N.I.A. (1988) Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from a new provisional serotype of *Shigella flexneri*, *Eur. J. Biochem.*, **176**, 471–476.
 38. Foster, R.A., Carlin, N.I.A., Majcher, M., Tabor, H., Ng, L.-K., and Widmalm, G. (2011) Structural elucidation of the O-antigen of the *Shigella flexneri* provisional serotype 88-893: structural and serological similarities with *Shigella flexneri* provisional serotype Y394 (1c), *Carbohydr. Res.*, **346**, 872–876.
 39. Kondakova, A.N., Vinogradov, E.V., Shekht, M.E., Markina, A.A., Lindner, B., L'vov, V.L., Aparin, P.G., and Knirel, Y.A. (2010) Structure of the oligosaccharide region (core) of the lipopolysaccharides of *Shigella flexneri* types 2a and 5b, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **36**, 396–399.
 40. Kubler-Kielb, J., Vinogradov, E., Mocca, C., Pozsgay, V., Coxon, B., Robbins, J.B., and Schneerson, R. (2010) Immunochemical studies of *Shigella flexneri* 2a and 6, and *Shigella dysenteriae* type 1 O-specific polysaccharide-core fragments and their protein conjugates as vaccine candidates, *Carbohydr. Res.*, **345**, 1600–1608.
 41. Guan, S., Bastin, D.A., and Verma, N.K. (1999) Functional analysis of the O-antigen glucosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage SfX, *Microbiology*, **145**, 1263–1273.
 42. Carlin, N.I.A., Wehler, T., and Lindberg, A.A. (1986) *Shigella flexneri* O-antigen epitopes: chemical and immunochemical analyses reveal that epitopes of type III and group 6 antigens are identical, *Infect. Immun.*, **53**, 110–115.
 43. Lugowski, C., Romanowska, E., Kenne, L., and Lindberg, B. (1983) Identification of a trisaccharide repeating-unit in the enterobacterial common-antigen, *Carbohydr. Res.*, **118**, 173–181.
 44. Dell, A., Oates, J., Lugowski, C., Romanowska, E., Kenne, L., and Lindberg, B. (1984) The enterobacterial common-antigen, a cyclic polysaccharide, *Carbohydr. Res.*, **133**, 95–104.
 45. Carlin, N.I., Rahman, M., Sack, D.A., Zaman, A., Kay, B., and Lindberg, A.A. (1989) Use of monoclonal antibodies to type *Shigella flexneri* in Bangladesh, *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1163–1166.
 46. Talukder, K.A., Dutta, D.K., Safa, A., Ansaruzzaman, M., Hassan, F., Alam, K., Islam, K.M., Carlin, N.I., Nair, G.B., and Sack, D.A. (2001) Altering trends in the dominance of *Shigella flexneri* serotypes and emergence of serologically atypical *S. flexneri* strains in Dhaka, Bangladesh, *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 3757–3759.
 47. Rusden, A.D., Stephenson, D.P., and Verma, N.K. (2013) Topological investigation of glucosyltransferase V in *Shigella flexneri* using the substituted cysteine accessibility method, *Biochemistry*, **52**, 2655–2661.
 48. Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., Van Etten, J.L., Korres, H., Verma, N., and Vanderplassen, A. (2004) Glycosyltransferases encoded by viruses, *J. Gen. Virol.*, **85**, 2741–2754.
 49. Mavris, M., Manning, P.A., and Morona, R. (1997) Mechanism of bacteriophage SfII-mediated serotype conversion in *Shigella flexneri*, *Mol. Microbiol.*, **26**, 939–950.
 50. Allison, G.E., Angeles, D., Tran-Dinh, N., and Verma, N.K. (2002) Complete genomic sequence of SfV, a serotype-converting temperate bacteriophage of *Shigella flexneri*, *J. Bacteriol.*, **184**, 1974–1987.
 51. Allison, G.E., Angeles, D.C., Huan, P.T., and Verma, N.K. (2003) Morphology of temperate bacteriophage SfV and characterisation of the DNA packaging and capsid genes: the structural genes evolved from two different phage families, *Virology*, **308**, 114–127.
 52. Sun, Q., Lan, R., Wang, Y., Wang, J., Wang, Y., Li, P., Du, P., and Xu, J. (2013) Isolation and genomic characterization of SfI, a serotype-converting bacteriophage of *Shigella flexneri*, *BMC Microbiol.*, **13**, 39.
 53. George, D.T., Stephenson, D.P., Tran, E., Morona, R., and Verma, N.K. (2013) Complete genome sequence of SfII, a serotype-converting bacteriophage of the highly prevalent *Shigella flexneri* serotype 2a, *Genome Announc.*, **1**, e00626–13.
 54. Jakhelia, R., Talukder, K.A., and Verma, N.K. (2013) Isolation, characterization and comparative genomics of bacteriophage SfIV: a novel serotype converting phage from *Shigella flexneri*, *BMC Genomics*, **14**, 677.
 55. Sun, Q., Lan, R., Wang, Y., Wang, J., Luo, X., Zhang, S., Li, P., Wang, Y., Ye, C., Jing, H., and Xu, J. (2011) Genesis of a novel *Shigella flexneri* serotype by sequential infection of serotype-converting bacteriophages SfX and SfI, *BMC Microbiol.*, **11**, 269.
 56. Stagg, R.M., Tang, S.S., Carlin, N.I., Talukder, K.A., Cam, P.D., and Verma, N.K. (2009) A novel glucosyltransferase involved in O-antigen modification of *Shigella flexneri* serotype 1c, *J. Bacteriol.*, **191**, 6612–6617.
 57. Thanweer, F., Tahiliani, V., Korres, H., and Verma, N.K. (2008) Topology and identification of critical residues of the O-acetyltransferase of serotype-converting bacteriophage, SF6, of *Shigella flexneri*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **375**, 581–585.
 58. Casjens, S., Winn-Stapley, D.A., Gilcrease, E.B., Morona, R., Kuhlewein, C., Chua, J.E., Manning, P.A., Inwood, W., and Clark, A.J. (2004) The chromosome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6: complete nucleotide sequence, genetic mosaicism, and DNA packaging, *J. Mol. Biol.*, **339**, 379–394.
 59. Sun, Q., Lan, R., Wang, Y., Wang, J., Xia, S., Wang, Y., Zhang, J., Yu, D., Li, Z., Jing, H., and Xu, J. (2012) Identification of a divergent O-acetyltransferase gene *oac_{1b}* from *Shigella flexneri* serotype 1b strains, *Emerg. Microbes Infect.*, **1**, e21.
 60. Sun, Q., Knirel, Y.A., Lan, R., Wang, J., Senchenkova, S.N., Shashkov, A.S., Wang, Y., Wang, Y., Luo, X., and Xu, J. (2014) Dissemination and serotype modification potential of pSFxv_2, an O-antigen PEtN modification plasmid in *Shigella flexneri*, *Glycobiology*, **24**, 305–313.
 61. Zhang, N., Lan, R., Sun, Q., Wang, J., Wang, Y., Zhang, J., Yu, D., Hu, W., Hu, S., Dai, H., Du, P., Wang, H., and Xu, J. (2014) Genomic portrait of the evolution and epidemic spread of a recently emerged multidrug-resistant *Shigella flexneri* clone in China, *J. Clin. Microbiol.*, **52**, 1119–1126.
 62. Ye, C., Lan, R., Xia, S., Zhang, J., Sun, Q., Zhang, S., Jing, H., Wang, L., Li, Z., Zhou, Z., Zhao, A., Cui, Z., Cao, J., Jin, D., Huang, L., Wang, Y., Luo, X., Bai, X., Wang, P., Xu, Q., and Xu, J. (2010) Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*, *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 419–426.
 63. Qiu, S., Wang, Z., Chen, C., Liu, N., Jia, L., Liu, W., Wang, L., Hao, R., Zhang, L., Wang, Y., and Song, H. (2011) Emergence of a novel *Shigella flexneri* serotype 4s strain that evolved from a serotype X variant in China, *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 1148–1150.

**O-ANTIGEN MODIFICATIONS PROVIDING
ANTIGENIC DIVERSITY OF *Shigella flexneri*
AND UNDERLYING GENETIC MECHANISMS****Y. A. Knirel^{1*}, Q. Sun², S. N. Senchenkova¹,
A. V. Perepelov¹, A. S. Shashkov¹, J. Xu²**¹ *N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr. 47, Moscow 119991, Russia; fax: +7(499)137-6148, E-mail: yknirel@gmail.com*² *National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, China CDC, P. O. Box 5, Changping, Beijing 102206, China; E-mail: sunqiangzheng@icdc.cn*

Received December 11, 2014

Revision received February 24, 2015

O-antigens (O-specific polysaccharides) of bacteria *Shigella flexneri*, a primary cause of shigellosis, are distinguished by enormous chemical modifications following the oligosaccharide O-unit assembly. The present review is devoted to structural, serological, and genetic aspects of these modifications, including O-acetylation and phosphorylation with phosphoethanolamine that have been identified recently. The modifications confer the host with specific immunodeterminants (O-factors or O-antigen epitopes), which accounts for the antigenic diversity of *S. flexneri* considered as a virulence factor of the pathogen. In total, 30 O-antigen variants have been recognized in these bacteria, the corresponding O-factors characterized using specific antibodies, and a significant extension of the serotyping scheme of *S. flexneri* on this basis is suggested. Multiple genes responsible for the O-antigen modifications and the resultant serotype conversions of *S. flexneri* have been identified. The genetic mechanisms of O-antigen diversification by acquisition of mobile genetic elements, including prophages and plasmids, followed occasionally by gene mobilization and inactivation, have been revealed. These findings further our understanding of the antigenicity and pathogenicity of *S. flexneri* and assist control of shigellosis.

Key words: *Shigella flexneri*, O-antigen, O-polysaccharide structure, serotype-converting bacteriophage, transposon, plasmid, serotyping