

УДК 577.3

# Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства

Ю. А. Книрель<sup>1\*</sup>, А. П. Анисимов<sup>2</sup><sup>1</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47<sup>2</sup> Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, Московская область, п. Оболенск

\*E-mail: knirel@ioc.ac.ru

Поступила в редакцию 01.06.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Приведены данные о составе и строении углеводной части (олигосахарида кора) и липидного компонента (липида А) различных форм липополисахарида (ЛПС) – одного из важных факторов патогенности чумного микроба *Yersinia pestis*. Рассмотрены функции и биологическая значимость генов биосинтеза ЛПС, биологические свойства ЛПС штаммов различных внутривидовых групп *Y. pestis* и их мутантов, включая вклад ЛПС в устойчивость бактерий к факторам врожденного иммунитета насекомых-переносчиков и млекопитающих-носителей. Особое внимание уделено температурозависимым вариациям структуры ЛПС, их генетическому контролю и роли в патогенезе чумы. Эволюционный аспект рассмотрен на основе сопоставления строения и генетики ЛПС чумного микроба и других энтеробактерий, в том числе других видов йерсиний. Обсуждаются перспективы создания живых противочумных вакцин на основе штаммов *Y. pestis* с генетически модифицированным ЛПС.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** липополисахарид, липид А, чума, *Yersinia pestis*, иммунный ответ, антибиотикоустойчивость.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** КАМП – катионные антимикробные пептиды; ЛПС – липополисахарид; НЧС – нормальная человеческая сыворотка; Ara4N – 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабиноза; Gal – галактоза; Glc – глюкоза; GlcN, GlcNAc – глюкозамин, *N*-ацетилглюкозамин; DD-Нер, LD-Нер – *D*-глицеро-, *L*-глицеро-*D*-манногептоза; Kdo – 3-дезоксид-*D*-манно-окт-2-улозоновая кислота; Ko – *D*-глицеро-*D*-тало-окт-2-улозоновая кислота; PEtN – фосфоэтанолламин; UndP, UndPP – ундекапентилфосфат, дифосфат.

## ВВЕДЕНИЕ

Несомненный и значительный прогресс в изучении химического строения, биосинтеза и биологической роли липополисахарида (ЛПС) как одного из факторов патогенности возбудителя чумы – бактерии *Yersinia pestis* – достигнут за последнее десятилетие, начиная с того времени, когда теракты 11 сентября 2001 г. стимулировали всесторонние исследования особо опасных патогенов – потенциальных агентов биотерроризма.

Род *Yersinia* входит в семейство Enterobacteriaceae. В отличие от других представителей этого семейства, в том числе от двух энтеропатогенных йерсиний – *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, вызывающих хронические кишечные инфекции, – бактерии *Y. pestis* не способны длительное время существовать во внешней среде. Чумной микроб циркулирует в природных очагах, включающих популяции более 200 видов грызунов-носителей (сусликов, сурков,

песчанок, полевок, пищух и других) и насекомых-переносчиков (более 80 видов блох) [1–5]. Высокая летальность чумы у грызунов является условием непрерывной трансмиссии *Y. pestis* в природе.

Внутри вида *Y. pestis* имеются варианты, различающиеся как генотипически, так и фенотипически [5, 6]. Штаммы основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis*, относящиеся к биоварам *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *intermedium*, вирулентны для человека и морских свинок. Предполагается, что штаммы каждого из первых трех биоваров были причиной трех пандемий чумы. Недавно было предложено объединить во второй подвид *Y. pestis* subsp. *microtus* штаммы биоваров *altaica*, *caucasica*, *hissarica*, *ulegeica*, *talassica*, *xilingolensis*, *ginghaiensis* и *angola*, высоко-вирулентные для своих грызунов-носителей (различных видов полевок рода *Microtus*) и белых мышей, но авирулентные для морских свинок и человека [6, 7]. Данная терминология уже используется [8], и в на-

стоящем обзоре мы будем следовать этому варианту внутривидовой классификации возбудителя чумы.

Заражение людей чумой происходит в основном через укусы блох, а также контактным путем – через поврежденную кожу и слизистые оболочки или при вдыхании аэрозолированных респираторных выделений животных или людей с легочной формой инфекции [2–5]. У человека чума протекает как острое инфекционное заболевание, проявляющееся в тяжелейшей интоксикации, лихорадке, поражении лимфатических узлов, легких и других внутренних органов, часто осложняющееся сепсисом [4].

Высокая патогенность *Y. pestis* в значительной степени определяется уникальной способностью бактерий преодолевать защитные механизмы млекопитающих и насекомых, обеспечивая тем самым свое выживание в течение всего трансмиссионного цикла [2–4]. Важный вклад в эту особенность чумного микроба вносит ЛПС, или эндотоксин – основной компонент внешней мембраны клеточной стенки, образующий наружный слой ЛПС-фосфолипидного бислоя. Липидная часть ЛПС, так называемый липид А, служит якорем, удерживающим ЛПС в мембране, а его углеводная цепь направлена в сторону окружающей среды. Многие патогенные бактерии, включая *Y. pestis*, формирующие колонии шероховатой формы, продуцируют ЛПС R-типа, углеводная часть которого ограничивается олигосахаридом (от пентасахарида и выше), называемым кором. В ЛПС S-типа, который характерен для большинства бактерий, образующих гладкие колонии, присутствует также полисахаридная цепь (O-антиген), построенная из повторяющихся олигосахаридных звеньев, а кор является промежуточной областью между O-антигеном и липидом А.

Биосинтез O-антигена и области кора-липид А протекает по независимым друг от друга, но сходящимся путям [9]. Начальные стадии – синтез липида А, присоединение к нему компонентов кора и сборка на ундекапrenoльном носителе повторяющегося звена O-антигена – осуществляются на цитоплазматической стороне внутренней мембраны. Затем следует трансмембранный перенос, и последующие стадии (полимеризация повторяющегося звена по наиболее распространенному у энтеробактерий O-антиген-полимераза-зависимому пути, возможные дальнейшие модификации в области кора-липид А и O-антигене и соединение обеих частей в единую молекулу) происходят уже на периплазматической стороне мембраны.

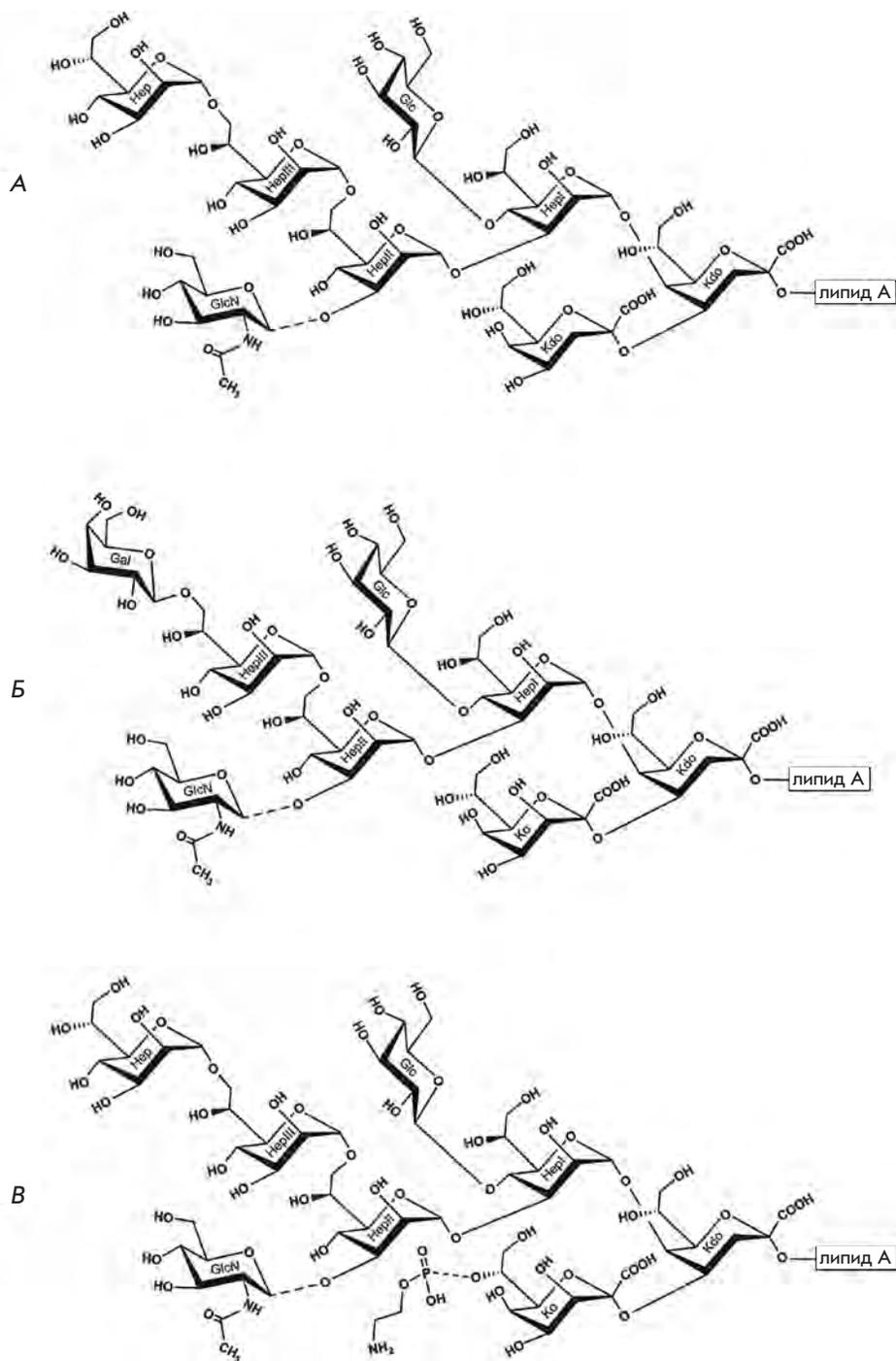
ЛПС играет важную роль в устойчивости бактерий к антибиотикам, комплементу и другим защитным системам организма хозяина и, таким образом, яв-

ляется одним из факторов патогенности грамотрицательных бактерий. Тонкая структура углеводной части ЛПС определяет специфичность взаимодействия бактериальной клетки с другими биологическими системами, включая иммунную систему и бактериофаги. Липид А ответствен за большинство физиологических эффектов, вызываемых ЛПС в организме животных и человека. Молекулярные механизмы этих эффектов у млекопитающих включают активацию специализированных клеток хозяина, таких, как моноциты и макрофаги, через белковый толл-подобный рецептор TLR4 при участии ЛПС-связывающего белка и корецепторов CD14 и MD-2. Активированные клетки секретируют окись азота, вазоактивные липиды и биоактивные медиаторы – провоспалительные цитокины. В низких концентрациях цитокины необходимы для запуска системы врожденного иммунитета хозяина, однако их избыточная продукция вызывает септический (эндотоксический) шок.

Недавно были опубликованы обзоры, посвященные структурным особенностям ЛПС чумного микроба [10] и иммунологическим свойствам его антигенов, включая ЛПС [11]. В настоящем обзоре представлены новейшие сведения по химическому составу и строению, генетике и биосинтезу ЛПС *Y. pestis*, а также о биологической роли ЛПС, рассматриваемой через призму его структурных особенностей. Обсуждаются возможные пути использования накопленных о ЛПС данных в практике здравоохранения.

### ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И СТРОЕНИЕ

Липополисахарид *Y. pestis* построен из короткой углеводной (олигосахаридной) цепи, присоединенной к липиду А [10, 12, 13]. В ней выделяется консервативный пентасахаридный фрагмент, называемый внутренним кором, который характерен для всех диких штаммов энтеробактерий. Он включает три остатка *L*-глицеро-*D*-манно-гептозы (LD-Нер) и два остатка 3-дезоксид-*D*-манно-окт-2-улозоновой кислоты (кетодезоксиоктоновой кислоты, Kdo) (рис. 1). Во внутренний кор йерсиний, как и некоторых других энтеробактерий (*Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*) [14], входит также остаток *D*-глюкозы, присоединенный к первому от липида А остатку гептозы (LD-НерI). Перечисленные бактерии образуют группу с так называемым несальмонельным типом кора, тогда как в коре сальмонельного типа вместо остатка глюкозы в том же положении LD-НерI находится фосфат, дифосфат или дифосфоэтанолламин [14]. Внутренняя область кора служит рецептором большинства бактериофагов, специфичных к ЛПС *Y. pestis*, включая фаг ФА1122 группы Т7 [15, 16], используемый Центрами контроля и предотвраще-

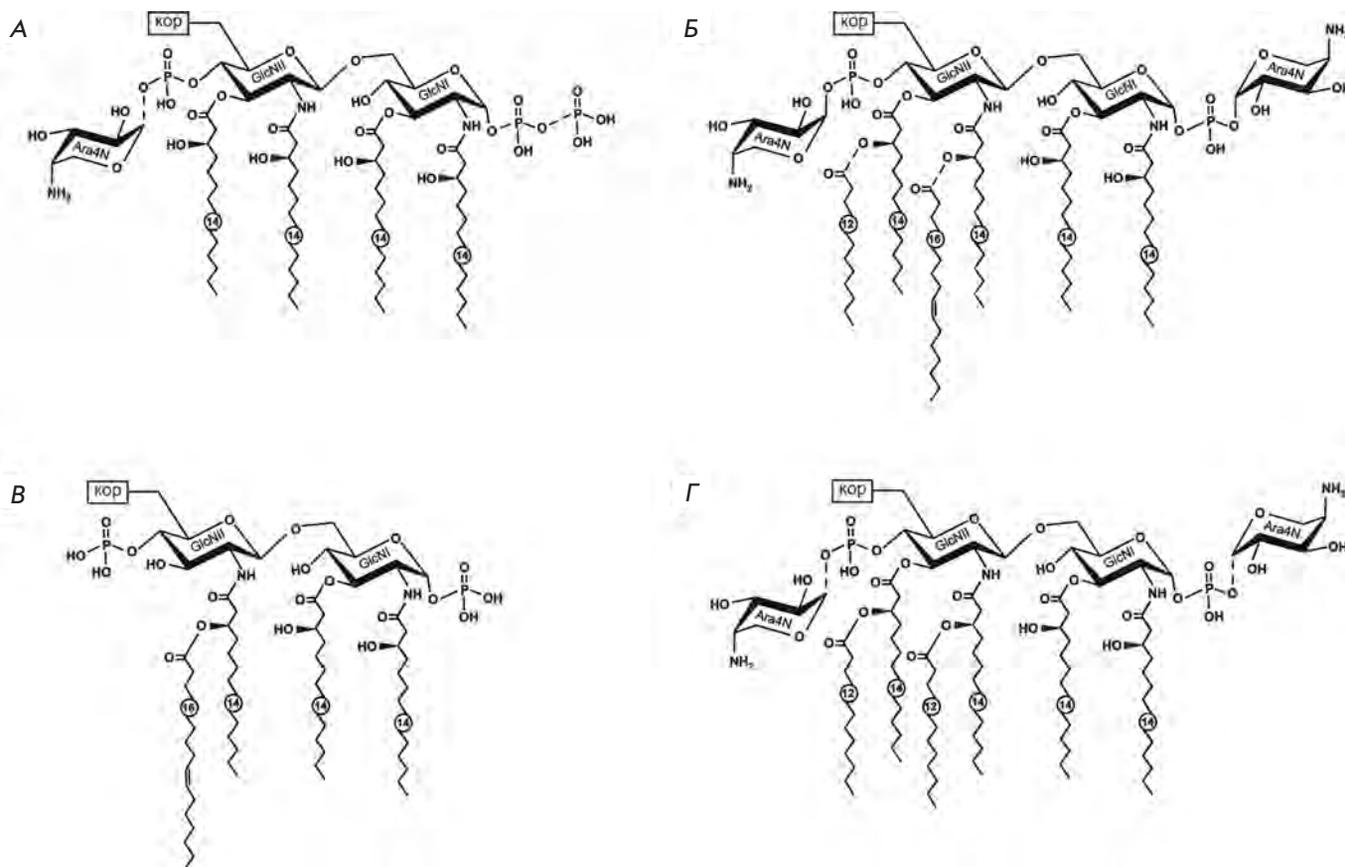


**Рис. 1.** Структурные варианты кора ЛПС *Y. pestis* [10, 12, 13, 17]. А – DD-Нер + Kdo-гликоформа, синтезируемая как основной вариант при 37°C и как один из четырех вариантов при 20–28°C. Б – Gal + Kdo-гликоформа, продуцируемая как один из четырех вариантов при 20–28°C; одновременно с ней присутствуют гликоформы DD-Нер + Kdo, DD-Нер + Kdo и Gal + Kdo. В – Гликоформа DD-Нер + KdoPEtN, синтезируемая при 6°C (присутствует также Gal + Kdo-гликоформа, лишенная PEtN). Пунктирными линиями обозначено нестехиометрическое замещение. Глицин, присутствующий на остатке LD-НерI в ряде штаммов, не показан.

ния заболеваний США для фагодиагностики *Y. pestis*. Гликозидная связь остатка Kdo, находящегося на восстанавливающем конце внутреннего кора, соединяет кор с липидом А.

Строение ЛПС *Y. pestis* варьирует в зависимости от внешних условий; оно детально изучено на препаратах, выделенных из бактерий, культивируемых при различных температурах, которые имитируют условия их существования в теле теплокровных

млекопитающих (37°C), пойкилотермных насекомых (20–28°C) и животных в период зимней спячки (6°C). Полный внутренний кор синтезируется обоими подвидами *Y. pestis*, культивируемыми при температуре как 20–28°C, так и 37°C. Однако описанная структура является единственной (или практически единственной) гликоформой только при 37°C (рис. 1А), тогда как при понижении температуры остаток Kdo в боковой цепи частично заменяется его изостери-



**Рис. 2.** Структурные варианты липида А *Y. pestis*. А – Тетраацильная форма, синтезируемая штаммами дикого типа при 37°C [10, 12, 23, 25]. Показан один из вариантов; в других вариантах дифосфатная группа может находиться в положении 4', а Ara4N-1-фосфатная – в положении 1, и каждая из этих групп может быть заменена Ara4N-1-дифосфатной группой [25]. Б – Гексаацильная форма [10, 12, 20, 23]; и В – тетраацильная форма [17], синтезируемые штаммами дикого типа при 20–28°C и 6°C соответственно. Г – Гексаацильная форма, синтезируемая рекомбинантным штаммом *Y. pestis*, несущим ген *lpxL Escherichia coli*, как при 37°C, так и при 26°C [27]. Пунктирными линиями обозначено нестехиометрическое замещение.

ческим 3-гидроксильным производным – остатком *D*-глицеро-*D*-мало-окт-2-улозоновой кислоты (Ко) [12] (рис. 1Б,В). При 6°C доминирует Ко-содержащая гликоформа [17].

Как таковой внешней олигосахаридной области, присутствующей в коре сальмонельного типа, у *Y. pestis* нет, но внутренняя область декорирована несколькими характерными для йерсиний моносахаридами и неуглеводными заместителями. Так, наиболее удаленный от липида А остаток гептозы (LD-НерIII) несет на себе остаток *D*-глицеро-*D*-манно-гептозы (DD-Нер) либо *D*-галактозы, причем первый характерен для высокотемпературных вариантов ЛПС (рис. 1А), а при обычной и пониженной температуре синтезируются оба возможных варианта [12] (рис. 1А,Б). Штаммы некоторых биоваров (*caucasica*, *altaica*) неосновного подвида *Y. pestis* subsp. *microtus*

не способны включать DD-Нер в ЛПС, и в высокотемпературных формах ЛПС этих бактерий большая часть остатков LD-НерIII не несет моносахаридного заместителя [12, 18, 19].

Центральный остаток гептозы (LD-НерII) замещен остатком *N*-ацетил-*D*-глюкозамина, который присутствует в нестехиометрическом количестве. Один из гептозных остатков (по неопубликованным данным авторов LD-НерI) может быть частично ацилирован глицином, содержание которого снижается с повышением температуры культивирования [12]. При 6°C остатки Ко нестехиометрически фосфорилированы фосфоэтаноломином (PEtN) [17] (рис. 1В). В некоторых штаммах PEtN присутствует также при 25°C [18, 19].

Липид А *Y. pestis* имеет типичную для энтеробактерий углеводную основу из двух 1,4'-бисфосфори-

лированных остатков глюкозамина, которые ацилированы четырьмя остатками 3-гидроксимиристата, называемыми первичными ацильными группами. Два остатка присоединяются по аминогруппам, два других – по гидроксильным группам остатков глюкозамина (рис. 2А). Вторичные ацильные остатки – лаурат и пальмитолеат – присоединяются по гидроксильным группам первичных жирных кислот на остатке глюкозамина, несущем олигосахарид кора (GlcNII) [12, 20] (рис. 2Б). В липиде А *Y. pestis* KIM6+ обнаружен дополнительный ацильный остаток – деканоат, положение которого неизвестно [21, 22].

Содержание различных ацилированных форм липида А в значительной степени зависит от условий культивирования: при 20–28°C это смесь тетраацильной, пентаацильной и гексаацильной форм; часто наблюдается также триацильная форма. Повышение температуры приводит к уменьшению степени ацилирования липида А. Так, при 37°C пальмитолеат не присоединяется и соответственно гексаацильная форма не синтезируется, а пентаацильная форма с лауратом представлена лишь в небольшом количестве [12, 18, 21, 23].

Высокотемпературная тетраацильная форма (так называемый липид IV<sub>A</sub>) содержит четыре первичных остатка 3-гидроксимиристата (рис. 2А), тогда как при пониженной температуре (6°C) наряду с гексаацильной продуцируется другая тетраацильная форма с тремя остатками 3-гидроксимиристата, один из которых несет пальмитолеат [17] (рис. 2Б). Еще одна особенность ЛПС *Y. pestis* – индуцируемое «холодным шоком» окисление одной или двух ацильных групп [17]; какие именно жирные кислоты окисляются и какие гидроксильные производные при этом образуются, не установлено.

Фосфатные группы липида А гликозилированы остатками катионного моносахарида – 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозы (Ara4N). В низкотемпературных вариантах ЛПС гликозилирование обеих фосфатных групп приближается к стехиометрическому (рис. 2Б), а в высокотемпературных формах содержание Ara4N снижается [12, 21] и наблюдается дополнительное фосфорилирование одной из освобождающихся фосфатных групп с образованием дифосфата [18, 19, 24, 25] (рис. 2А). В тетраацильном липиде А бактерий, выращенных при 37°C, дифосфатная группа может находиться в любом из двух возможных положений, а в пентаацильном варианте ее присутствие подтверждено в положении 4', но не исключено также в положении 1 [25]. По приблизительной оценке, основанной на данных масс-спектрометрического анализа, общее содержание дифосфата в тетраацильной форме составляет 5–6%. Как и монофосфатные группы, дифосфатные группы

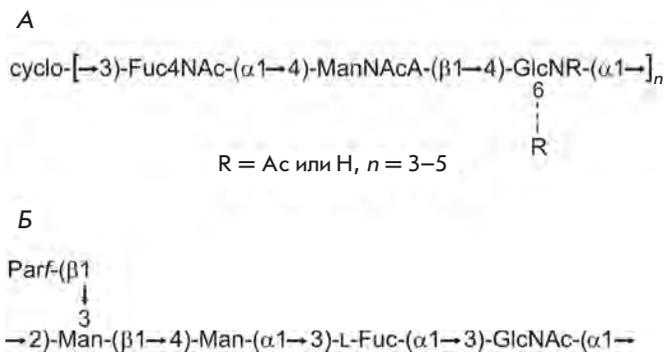


Рис. 3. Структура полисахаридных антигенов *Y. pestis* (А) и *Y. pseudotuberculosis* O:1b (Б). А – Циклическая форма общего энтеробактериального антигена *Y. pestis* [26]. Остаток глюкозамина N-ацелирован на ~50% и 6-О-ацелирован на ~20%; n = 4 (основной вариант), 3 или 5 (минорные варианты). Б – Пентасахаридное повторяющееся звено O-антигена *Y. pseudotuberculosis* O:1b [28]. В геноме *Y. pestis* присутствует нефункциональный генный кластер биосинтеза этого полисахарида [29]. Par – 3,6-дидезокси-D-рибо-гексоза (паратоза). Все моносахариды имеют D-конфигурацию; паратоза находится в фуранозной форме, остальные моносахариды – в пиранозной.

в обоих положениях липида А могут быть частично гликозилированы Ara4N [25]. ЛПС с остатком PEtN в коре, продуцируемый при 6°C, не содержит Ara4N в липиде А [17].

Одна из особенностей *Y. pestis*, отличающих эту бактерию от других йерсиний, – отсутствие в ЛПС полисахаридной цепи – O-антигена. В то же время, как и другие энтеробактерии, *Y. pestis* продуцирует общий энтеробактериальный полисахаридный антиген, построенный из трисахаридных повторяющихся звеньев, включающих по одному остатку N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc), 2-ацетамидо-2-дезоксид-D-маннуриновой кислоты (ManNAcA) и 4-ацетамидо-4-дезоксид-D-фукозы (Fuc4NAc), причем остаток GlcNAc частично O-ацелирован и частично N-дезацелирован. Из двух известных форм этого полисахарида – линейной, присоединенной к фосфолипиду или липиду А, и безлипидной циклической – у *Y. pestis* детально охарактеризована циклическая форма [26] (рис. 3А).

### ГЕНЕТИКА И БИОСИНТЕЗ

Синтез тетраацильного бисфосфорилированного предшественника липида А энтеробактерий (липид IV<sub>A</sub>) у *Y. pestis* очевидно происходит так же, как у наиболее изученных в этом отношении бактерий *E. coli* и *Salmonella enterica* [9]. Гомологи генов

*E. coli*, кодирующих ферменты позднего ацилирования липида А – миристоилтрансферазу LpxM (MsbB), пальмитолеилтрансферазу LpxP и пальмитоилтрансферазу PagP, но не лауроилтрансферазу LpxL (HtrB), идентифицированы в геноме *Y. pestis* [22, 30–32].

Функциональные гены *lpxM* и *lpxP* участвуют в синтезе гексаацильного липида А *Y. pestis* (рис. 4). Уровень их экспрессии возрастает при снижении температуры культивирования с 37 до 21°C, а мутант по обоим генам независимо от температуры синтезирует такой же тетраацильный липид А, сходный с липидом IV<sub>A</sub> (рис. 2А), что и штаммы дикого типа *Y. pestis* при 37°C [22]. В то же время уровень транскрипции остается низким при всех условиях, и температурная зависимость каталитической активности ферментов или другие посттранскрипционные эффекты также могут влиять на картину ацилирования липида А.

Ацилтрансфераза LpxM *E. coli* может использовать в качестве субстрата как миристан, так и лаурат, но ее активность выше с миристаном, который и присоединяется к 3-гидроксимиристану в положение 3' GlcNII. Этому предшествует перенос на 3-гидроксимиристан в положении 2' GlcNII вторичной ацильной группы – лаурата при 30–42°C при катализе LpxL [9] или пальмитолеата при температуре «холодного шока» (12°C) с участием LpxP [35]. Гомологи LpxM и LpxP *Y. pestis* переносят лаурат и пальмитолеат на остатки 3-гидроксимиристана в положениях 3' и 2' GlcNII соответственно. При этом собственно температурный контроль, по-видимому, наблюдается только для LpxP, переносящего пальмитолеат в положение 2' GlcNII до присоединения вторичной ацильной группы в положение 3' (лаурата у *Y. pestis* или миристана у *E. coli*), а активность LpxM не зависит от температуры. Вследствие отсутствия гена *lpxL* у *Y. pestis* при повышенной температуре 3-гидроксимиристан в положении 2' остается незамещенным, что снижает эффективность переноса лаурата с участием LpxM и приводит к синтезу в основном тетраацильной формы липида А и лишь незначительного количества пентаацильной формы. Подтверждением этому служит продукция рекомбинантным штаммом *Y. pestis* KIM5-рLpxL, несущим ген *lpxL* *E. coli*, гексаацильной формы липида А с двумя вторичными остатками лаурата как при 37°C, так и при 26°C [27] (рис. 2Г).

Ацилтрансфераза PagP *E. coli* и *S. enterica* переносит пальмитат из положения sn-1 глицерофосфолипида [36], что отличает ее от ранних и других поздних ацилтрансфераз, использующих в качестве донора субстрат, связанный с ацилпереносящим белком. Кроме того, пальмитоилирование липида А проис-

ходит не на внутренней, а на внешней мембране [36]. Пальмитоилированные формы липида А характерны также для *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* [19–21], однако у диких штаммов *Y. pestis* они не обнаружены, несмотря на присутствие в геноме гомолога *pagP*, идентичного на 99% гену *Y. pseudotuberculosis* [31, 36]. Причиной этого является инактивация данного гена в результате замены одного нуклеотида, что приводит к превращению кодона триптофана-200 в стоп-кодон [31].

Гены синтеза и переноса Ara4N входят в состав оперона *arn* (*pmrHFJKLM*) [9, 37]. Донором Ara4N для ее присоединения к фосфатным группам липида А является ундекаprenилфосфатное (UndP) производное, синтезируемое с участием Ara4N-трансферазы ArnC (PmrF), а перенос Ara4N на липид А, катализируемый продуктом гена *arnT* (*pmrK*), происходит на периплазматической стороне внутренней мембраны [38]. Для наиболее эффективного присоединения Ara4N требуется полностью достроенный внутренний кор, тогда как присутствие или отсутствие удаленных от липида А моносахаридов кора (GlcNAc, Gal и DD-Нер) на этот процесс практически не влияет [32–34]. Как и у *E. coli* и *S. enterica*, оперон *arn* *Y. pestis* находится под контролем двухкомпонентных систем передачи сигнала PhoP/PhoQ и PmrA/PmrB [21, 39], однако механизм регулирования системой PhoP/PhoQ у *Y. pestis* отличается, в частности, тем, что происходит без участия белка PmrD, отсутствующего у этой бактерии [39].

Синтез олигосахарида кора *E. coli* начинается с присоединения к липиду IV<sub>A</sub> двух остатков Kdo, катализируемого бифункциональной Kdo-трансферазой WaaA (рис. 4А), причем перенос Kdo предшествует позднему ацилированию липида А [9]. Дальнейшая сборка кора происходит на полностью ацилированном липиде А, после чего следует перенос ЛПС, состоящего из кора и липида А, через внутреннюю мембрану с помощью ABC-транспортера MsbA. В то же время трансмембранный перенос не нуждается ни в олигосахаридах кора, ни даже в остатках Kdo (Ко), так как ЛПС, полностью лишенный кора (т.е. фактически липид А), экспрессируется в Kdo-дефектных мутантах *E. coli* [40, 41] и *Y. pestis* [32, 33, 42].

У *E. coli*, *S. enterica* и ряда других энтеробактерий гены биосинтеза кора группируются в определенной области хромосомы, образуя кластер *waa* [9]. В геноме *Y. pestis* обнаружены два кластера (*waaI* и *waaII*) с четырьмя и двумя гомологами генов *waa* и один кластер с двумя генами *wab*, которые также кодируют ферменты биосинтеза кора [32–34] (рис. 4Б).

В кластер *waaI*, содержащий большинство генов синтеза внутреннего кора, входят гены Kdo-



ственно. При помощи программы BLAST показано, что у штаммов неосновного подвида *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* Pestoides F и *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *xilingolensis* 91001 ген *wabC* содержит мутации, приводящие к нарушению синтеза соответствующего белка [32]; по-видимому, аналогичные мутации присутствуют и в других DD-Нер-дефектных штаммах *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* и bv. *altaica*. Экспрессия гена *wabD* и/или активность фермента WabD являются температурозависимыми, и перенос Gal при повышенной температуре происходит неэффективно. Неспособность мутанта по гену *rhoP* включать в кор Gal показывает, что галактозилрование контролируется двухкомпонентной системой передачи сигнала PhoP/PhoQ [44]. В то же время присоединение DD-Нер не требует функциональной системы PhoP/PhoQ.

Как уже отмечалось, при пониженной температуре терминальный остаток Kdo частично заменяется остатком Ko. Последний синтезируется путем окисления 3-дезоксигруппы Kdo с помощью уникальной  $Fe^{2+}/\alpha$ -кетоглутарат/ $O_2$ -зависимой Kdo-3-гидроксилазы (KdoO) [45]. Ее субстратная специфичность не изучена, но, учитывая, что KdoO является периферическим мембранным белком, можно предположить, что 3-гидроксилирование Kdo происходит на цитоплазматической стороне внутренней мембраны после присоединения двух остатков Kdo к липиду A. Молекулярный механизм регулирования температурозависимого содержания Ko в коре остается неизвестным.

Гомологи генов трансферазы EptB (YhjW), переносящей PEtN с фосфатидилэтанолamina на Kdo [32, 33, 46], и фосфатазы LpxT (YeiU), переносящей фосфат с UndPP на липид A с образованием дифосфата [32, 33, 47], также обнаружены в геноме *Y. pestis* [32, 33]. Эти гены, как и ген *kdoO*, кодирующий Kdo-3-гидроксилазу, а также гены поздних стадий синтеза липида A (ацилирования и гликозилирования Ara4N) распределены по хромосоме в виде единичных некластеризованных генов. Ген ацилтрансферазы, участвующей в переносе глицина на остаток LD-НерI, до настоящего времени в геноме *Y. pestis* не найден.

Внутри вида *Y. pestis* гомология белков, участвующих в биосинтезе ЛПС, составляет 100% (за исключением гена *wabC*, мутантного у ряда представителей неосновного подвида чумного микроба; см. выше), а внутри рода *Yersinia* – 98–100% [32, 33], что хорошо согласуется с высокой степенью подобия строения кора и липида A ЛПС различных йерсиний [19, 20]. У отдаленно родственных бактерий гомология белков WaaA, WaaC, WaaE, WaaF, EptB, LpxM, LpxP и ArnT составляет более 70%. В то же время у ферментов WaaQ, WabC, WaaL и KdoO она не превышает 64%,

а уникальная для йерсиний галактозилтрансфераза WabD гомологична гликозилтрансферазам других бактерий не более чем на 43%. Высокая гомология большинства белков биосинтеза ЛПС *Y. pestis* и бактерий из различных филогенетических групп в сочетании с диспергированным расположением соответствующих генов в хромосоме чумного микроба свидетельствуют о многоэтапной горизонтальной передаче этих генов в геном прародителя йерсиний.

В геноме *Y. pestis* обнаружен нефункциональный генный кластер O-антигена [29, 48], который на уровне нуклеотидной последовательности на 98.9% идентичен кластеру O-антигена *Y. pseudotuberculosis* O:1b [29] (структура O-антигена приведена на рис. 3B). Таким образом, *Y. pseudotuberculosis* O:1b считается наиболее вероятным клоном-прародителем *Y. pestis*. Из 17 биосинтетических генов, идентифицированных в генном кластере O-антигена O:1b, пять в кластере *Y. pestis* инактивированы за счет инсерций или делеций. Среди них гены синтеза нуклеотид-активированных производных L-фукозы и 3,6-дидезокси-D-рибогексозы (паратозы) – предшественников компонентов O-антигена, без которых его синтез становится невозможным. Интересно, что, в то время как 16 генов в кластерах двух бактерий идентичны на 99–100%, ген *wzx* идентичен только на 90.4%. Продукт этого гена – флиппаза Wzx, служащая у *Y. pseudotuberculosis* для трансмембранного переноса UndPP-связанного повторяющегося пентасахаридного звена O-антигена. После утраты этой функции флиппаза *Y. pestis* очевидно изменилась, специализировавшись на переносе через внутреннюю мембрану единичного UndPP-связанного остатка GlcNAc, который затем с помощью лигазы WaaL присоединяется к кору ЛПС в то же самое место, в котором у *Y. pseudotuberculosis* находится полисахаридный O-антиген.

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЧУМЫ

Важную роль в исходе инфекционных заболеваний играет продукция макрофагами и другими клетками иммунной системы ключевых провоспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухолей  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) – основной медиатор септического шока (эндотоксемии), развивающегося под действием ЛПС. Как и у других грамотрицательных бактерий, у *Y. pestis* цитокининдуцирующая активность ЛПС, которая передается через клеточный рецептор TLR4, определяется строением липида A [49]. Так, продукция ФНО- $\alpha$  макрофагальными клеточными линиями мыши и человека значительно уменьшается со снижением степени ацилирования липида A, в частности, с отсутствием гексаациль-

ной формы и существенным снижением содержания пентаацильной формы [18, 23]. Эти структурные изменения липида А наблюдаются при повышении температуры культивирования бактерий от 21–28°C до 37°C, моделирующем переход от температурных условий в теле пойкилотермных блох (< 30°C) к условиям в теле теплокровных млекопитающих (37°C) [21, 23, 32, 33]. По ФНО- $\alpha$ -индуцирующей активности при 25°C ЛПС мутантов с нокаутом гена *lpxM* занимают промежуточное положение между ЛПС родительских штаммов, выращенных при 25 и 37°C, что хорошо коррелирует со степенью ацилирования липида А [50].

Ограниченная биологическая активность высоко-температурной низкоацилированной формы ЛПС *Y. pestis* может играть важную роль в преодолении бактериями защитных механизмов теплокровных животных. В то время как система врожденного иммунитета эффективно стимулируется высокоацилированными формами ЛПС, низкоацилированные формы рецептором TLR4 не распознаются и соответственно не активируют врожденный иммунитет по MD-2-TLR4-зависимому пути. Более того, в опытах с макрофагальными клеточными линиями человека [51] и дендритными клетками [52] ЛПС из клеток *Y. pestis*, выращенных при 37°C, вел себя как антагонист, активно подавляющий TLR4-зависимый провоспалительный ответ. Значение этой особенности ЛПС как фактора патогенности чумного микроба получило убедительное подтверждение при изучении рекомбинантного штамма *Y. pestis* KIM5-pLpxL, несущего ген *lpxL* *E. coli* [27]. ЛПС этого штамма, имеющий «неприродный» гексаацильный липид А (рис. 2Г), при всех температурных условиях, в том числе и при 37°C, значительно эффективнее стимулировал передачу сигнала через TLR4 и индукцию цитокинов (ФНО- $\alpha$ , интерлейкинов-6 и -8), чем ЛПС штаммов дикого типа.

Интересно, что рекомбинантный штамм *Y. pestis* KIM5-pLpxL оказался неспособным вызывать бубонную чуму у мышей, несмотря на то, что другие факторы патогенности, такие, как система секреции третьего типа, устойчивость к бактерицидному действию нормальной сыворотки и активность протеазы Pla, затронуты не были. Эти результаты являются хорошей иллюстрацией того, что активная (эндотоксичная) форма ЛПС играет также положительную роль для хозяина, обеспечивая быстрое распознавание патогена и активацию системы врожденного иммунитета на самых ранних стадиях инфекции. Опыты на мышцах показали, что аттенуированные штаммы *Y. pestis* с иммуностимулирующей формой ЛПС могут рассматриваться как прототип новой эффективной живой вакцины против чумы [27, 53].

Отметим, что выработка более высокоацилированных низкотемпературных форм ЛПС не является необходимым условием выживания *Y. pestis* в кишечнике блох. Так, двойной *lpxP/lpxM*-мутант с тетраацильным липидом А колонизировал пищеварительный тракт и блокировал преджелудок блохи *Xenopsylla cheopis* столь же эффективно, как и штамм дикого типа, отличающийся высоким уровнем экспрессии гексаацильного липида А в организме блох [22].

Уменьшение степени ацилирования липида А при повышении температуры культивирования [22] или инактивации гена *lpxM* [20] умеренно или незначительно снижало летальную токсичность препаратов ЛПС на модели мышей, сенсibilизированных актиномицином Д. Неспособность *lpxM*-мутанта штамма дикого типа *Y. pestis* 231 синтезировать гексаацильный липид А не сказывалась на его вирулентности, тогда как аналогичная мутация у аттенуированного вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ уменьшала его способность вызывать летальную инфекцию у мышей и морских свинок [49, 54]. Существенно, что снижение вирулентности *lpxM*-мутанта вакцинного штамма сопровождалось значительным повышением его протективной активности против бубонной чумы по сравнению с исходным вакцинным штаммом [49, 54]. Этот феномен, по видимому, обусловлен плейотропными эффектами мутации, включая изменения в биосинтезе и характере экспонирования основных иммунореактивных антигенов клеточной поверхности бактерий [55]. Если различие между мышьиными и человеческими рецепторами ЛПС не нивелирует эти различия, инактивация гена *lpxM* может быть использована для создания живой противочумной вакцины с пониженной реактогенностью.

При увеличении температуры культивирования *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* от 26 до 37°C проницаемость наружной мембраны для гидрофобного агента *N*-фенил-1-нафтиламина возрастала, коррелируя с уменьшением числа и, как следствие, с увеличением подвижности ацильных цепей ЛПС [56]. Отсутствие лаурата и пальмитолеата делало двойной *lpxP/lpxM*-мутант чувствительным к детергенту дезоксихолату, но не сказывалось на его устойчивости к гидрофобным антибиотикам рифампину и ванкомицину [22]. Противоречивые данные получены также с катионными антимикробными пептидами (КАМП) – одним из важных факторов врожденного иммунитета: снижение степени ацилирования не влияло на устойчивость к полимиксину В, но увеличивало чувствительность с цекаропину А [22].

Напротив, устойчивость к КАМП отчетливо связана с содержанием Ara4N в ЛПС *Y. pestis*. Такая

корреляция, характерная также для *S. enterica* и некоторых других бактерий [37], объясняется электростатическим отталкиванием КАМП катионным моносахаридом, препятствующим связыванию молекулы антибиотика с отрицательно заряженными (например, фосфатными) группами на внешней мембране. На модели полимиксина В показана высокая устойчивость штаммов *Y. pestis* дикого типа с содержанием Ara4N в ЛПС, близким к стехиометрическому (два остатка Ara4N в молекуле), которое достигается при культивировании бактерий при 20–28°C. Соответственно падение устойчивости к КАМП коррелирует с заметным снижением содержания Ara4N при повышении температуры до 37°C [21, 57]. Мутанты с нокаутом генов *galU* пути синтеза Ara4N [58], *arnT* [32–34], кодирующему Ara4N-трансферазу, или *phoP* [21, 44], регулирующему присоединение Ara4N к липиду А, чувствительны к КАМП независимо от температуры культивирования. Роль Ara4N подтверждается также заметным увеличением содержания этого моносахарида в ЛПС бактерий, культивируемых при 37°C в присутствии полимиксина В [12]. Увеличение содержания Ara4N в ЛПС и, как следствие, устойчивости *Y. pestis* к КАМП при снижении температуры культивирования носит, несомненно, адаптационный характер. Высокая устойчивость к полимиксину В при температуре, свойственной организму насекомых, возможно связана с бóльшим вкладом КАМП в защитные механизмы врожденного иммунитета насекомых по сравнению с млекопитающими, у которых помимо КАМП имеется система комплемента.

Определенный вклад в устойчивость к КАМП может вносить и другой катионный компонент ЛПС – глицин [57], находящийся в коре, тогда как незаряженные компоненты кора, по-видимому, существенной роли не играют. Повышение чувствительности к полимиксину В, наблюдавшееся в серии мутантов с нокаутом генов гликозилтрансфераз с уменьшающимся кором, связано, скорее всего, с одновременным снижением содержания Ara4N в липиде А из-за неэффективности переноса Ara4N на молекулы ЛПС с недостроенной углеводной частью [32–34].

Кор ЛПС играет существенную роль в устойчивости *Y. pestis* к комплемент-опосредованному бактерицидному действию нормальной сыворотки крови [32–34], еще одному важному компоненту системы врожденного иммунитета. Штаммы дикого типа *Y. pestis* subsp. *pestis* устойчивы к действию нормальной человеческой сыворотки (НЧС) как при 25°C, так и при 37°C [57]. Практически так же устойчивы мутанты *waaL*, *wabC*, *wabD* и *arnT*, лишенные терминальных заместителей кора GlcNAc, DD-Нер, Gal

или катионного моносахарида Ara4N соответственно. Напротив, мутанты с недостроенной внутренней областью кора высокочувствительны к НЧС [32–34]. Молекулярный механизм участия кора пока не выяснен; возможно оно опосредуется влиянием ЛПС на правильность фолдинга и тем самым на функциональную активность белка наружной мембраны Ail (OmpX) [59], играющего ключевую роль в устойчивости *Y. pestis* к сыворотке [59, 60]. Изучение рекомбинантного штамма *E. coli*, несущего ген *ompX* *Y. pestis*, и трех его мутантов с укороченным кором выявило, что размер кора ЛПС влияет не только на устойчивость к НЧС, но и на такие OmpX-опосредованные факторы вирулентности, как адгезивность и инвазивность бактерий [60].

В отличие от штаммов основного подвида чувствительность штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* к действию НЧС не зависит от температуры, что коррелирует с отсутствием документированных случаев чумы у людей, вызванной штаммами этого биовара [57]. В то же время эти штаммы обладают устойчивостью к мышьиной сыворотке и, вероятно, к сыворотке своего основного хозяина – полевки обыкновенной, что обеспечивает их выживание в крови грызунов-носителей, необходимое для продолжения циркуляции в природных очагах. Единственная отличительная особенность ЛПС биовара *caucasica* – отсутствие в коре DD-Нер [12]. Однако штамм другого биовара неосновного подвида – *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *altaica* [57], ЛПС которого также лишен DD-Нер, столь же устойчив к бактерицидному действию НЧС, как и *wabC*-мутант основного подвида с DD-Нер-дефектным ЛПС [32–34]. Это указывает на то, что адаптационные изменения, сделавшие штаммы *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* чувствительными к НЧС, затронули не только ЛПС, но и другие факторы, вовлеченные во взаимодействие бактериальной клетки с системой комплемента.

Не сказываясь на скорости роста клеток *Y. pestis* [32, 33], уменьшение размера кора ЛПС влияет на образование *in vivo* биопленки – полисахаридсодержащей внеклеточной матрицы, а также на зависящее от этого процесса блокирование преджелудка блох [61]. Мутант *Y. pestis* KIM6+ с нокаутом гена *gmhA*, кодирующего один из ферментов пути биосинтеза LD-Нер, обладал пониженной способностью образовывать биопленку на кутикуле нематоды *Caenorhabditis elegans* и блокировать преджелудок *X. cheopis* при умеренном уменьшении уровня пленкообразования *in vitro* [61]. Этот очевидно непрямой эффект отсутствия большей части кора, включая гептозную область, может объясняться взаимодействием белков наружной мембраны, участвующих

в синтезе, процессинге или экспорте биопленки, с компонентами кора ЛПС.

Обнаружили существенное снижение вирулентности *Y. pestis* 231 у подкожно зараженных морских свинок при укорочении кора ЛПС до пяти моносахаридных остатков и утрату вирулентности как для морских свинок, так и для мышей при дальнейшем уменьшении кора ЛПС до трех моносахаридов [32, 33]. Однако наблюдение велось в течение 21 дня, и нельзя исключить, что продолжение эксперимента привело бы к генерализации инфекции, ведущей к гибели животных в поздние сроки. Атенуирование мутантов вирулентного штамма *Y. pestis* CO92 с укороченным кором отмечено также на мышах линии BALB/c, а отсутствие кора у мутантов по гену *yrbH* пути синтеза Kdo или гену Kdo-трансферазы *waaA* делало их полностью авирулентными [15]. Эти данные прямо указывают на исключительно важную роль ЛПС в вирулентности чумного микроба, так как столь же полное аттенуирование штаммов *Y. pestis* отмечается только при потере основных компонентов системы секреции типа III [4], генного кластера синтеза и рецепции сидерофора йерсиниобаكتина [4] или генов, кодирующих липопротеин NlpD [62].

Биологическая значимость температурозависимых вариаций моносахаридного состава кора – замены терминальных остатков Kdo и DD-Нер на остатки Ко и Gal соответственно при снижении температуры окружающей среды от 37 до 28°C и ниже – остается невыясненной. Можно предположить, что гидроксильное Kdo при понижении температуры (т.е. превращение Kdo в Ко) служит компенсацией уменьшения гидрофильности ЛПС в результате ацилирования гидроксильных групп первичных жирнокислотных остатков, также происходящего при низких температурах.

Ответ (возможно не единственный) на интригующий вопрос о том, что, кроме тривиальной энергетической выгоды, приобрел чумной микроб, избавившись от необходимости синтезировать О-антиген, получен при изучении активатора плазминогена Pla *Y. pestis* – белка наружной мембраны семейства омптинов с функциями протеазы/адгезина. Превращая плазминоген в плазмин – ключевой фермент фибринолиза – и разрушая циркулирующий ингибитор плазмина  $\alpha_2$ -антиплазмин, Pla вызывает неконтролируемый протеолиз тканей, способствуя распространению *Y. pestis* в макроорганизме, и играет важную роль в патогенезе чумы. Исследование активности Pla *Y. pestis* в рекомбинантных штаммах *Y. pseudotuberculosis* с различным уровнем экспрессии О-антигена показало, что О-антиген стерически затрудняет взаимодействие Pla с высокомолекулярным субстратом, препятствуя тем самым как активации

плазминогена, так и инактивации  $\alpha_2$ -антиплазмина [63, 64]. Это позволило сделать вывод о том, что потеря О-антигена, необходимая для повышения ферментативной активности Pla, усилила инвазивность *Y. pestis*. С другой стороны, активность Pla зависит от специфического взаимодействия с фосфатными группами липида А [65] и требует наличия ЛПС с кором, содержащим не менее двух остатков LD-Нер [32, 66]. Такая необычная ЛПС-зависимость может объясняться тонкими конформационными изменениями в активном центре омптина в результате связывания с ЛПС [67].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопоставление данных о строении, биосинтезе и биологическим свойствам ЛПС *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* показывает, что наиболее значимые события на пути формирования *Y. pestis*, связанные с изменением структуры ЛПС, – инактивация генного кластера О-антигена и гена *pagP*, а также потеря гена *lpxL*, приведшие к синтезу R-формы ЛПС с короткой углеводной цепью и утрате способности продуцировать высокоацилированные формы липида А при 37°C. Эти изменения играют важную роль в патогенезе чумы, являясь существенной частью стратегии преодоления бактерией защитных механизмов хозяина. Так, отсутствие полисахаридной цепи обеспечивает функционирование такого важного фактора патогенности *Y. pestis*, как активатор плазминогена, а опосредованное температурой уменьшение степени ацилирования ЛПС, приводящее к снижению цитокининдуцирующей способности, считается одним из механизмов предотвращения распознавания патогена иммунной системой хозяина на ранних стадиях инфекции. Эти данные согласуются с представлением о том, что патоадаптация *Y. pestis* к новой экологической нише включала утрату функциональности ряда генов, необходимых для сапрофитного существования [36, 68]. Закрепившиеся у представителей биоваров неосновного подвида *Y. pestis* subsp. *microtus* bv. *caucasica* и bv. *xilingolensis* мутации по гену *wabC*, кодирующему DD-Нер-трансферазу, могут быть элементом дальнейшей редукционной внутривидовой микроэволюции в ходе адаптации *Y. pestis* к циркуляции в популяциях определенных видов полевок.

В то же время многие особенности ЛПС, включая температурозависимые вариации структуры как кора, так и липида А, унаследованы *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis* без заметных изменений. Возможно, что некоторые из них, такие, как фосфорилирование PEtN, гликозилирование Ara4N и окисление Kdo в Ко, не имеют принципиального значения для нового способа существования чумного микро-

ба, а необходимы лишь для нормального функционирования наружной мембраны, достигаемого путем придания ей определенной гидрофильности и заряда. С другой стороны, они могут вносить свой вклад в патогенез чумы, способствуя оптимальному приспособлению *Y. pestis* к существованию на разных этапах своего жизненного цикла в значительно отличающихся условиях в организмах хозяев-млекопитающих и переносчиков-насекомых. Уникальный феномен чумного микроба и чумы как раз и может быть обусловлен синергическим действием унаследованных и вновь приобретенных факторов патогенности, в том числе связанных с ЛПС.

Таким образом, полученные в последние годы данные свидетельствуют о том, что ЛПС является полифункциональным фактором патогенности *Y. pestis*, играющим ключевую роль в адаптационной изменчивости чумного микроба. Однако следует отметить, что даже в случае обнаружения корреляции между структурой ЛПС и свойствами бактериальной культуры, точное биологическое значение различных модификаций ЛПС нельзя считать окончательно установленным, так как культивирование бактерий в лабораторных условиях не может точно воспроизводить условия *in vivo*. Выявление детального строения ЛПС, синтезируемого бактериями в организмах блохи и теплокровного хозяина, позволило бы подобрать для дальнейших лабораторных исследований условия *in vitro*, которые позволят получить формы

ЛПС, характерные для данного инфицированного животного.

Выявление структурно-функциональных взаимосвязей ЛПС *Y. pestis* открывает новые пути к разработке эффективных живых чумных вакцин на основе аттенуированных штаммов с пониженной реактогенностью. Перспективным представляется подход, основанный на генно-инженерной модификации ЛПС *Y. pestis*, предполагающей снижение степени ацилирования липида А. Способность избежать распознавание защитной системой хозяина на самом раннем этапе внедрения позволяет аттенуированному штамму с мутантным ЛПС быстро размножиться, но отсутствие одного из основных факторов патогенности вследствие мутации, использованной для аттенуации, не дает инфекции генерализоваться. В дальнейшем это обеспечивает эффективную выработку антител к основным антигенам чумного микроба и формирование приобретенного иммунитета. Альтернативным подходом в терапии чумы может стать создание эффективных и высокоселективных антимикробных препаратов нового поколения на основе высокоаффинных олигонуклеотидных лигандов. Выяснение генетического контроля ключевых этапов биосинтеза ЛПС, вмешательство в которые нарушает функционирование внешней мембраны и ослабляет действие других факторов вирулентности, позволит предложить новые молекулярные мишени для таких антибиотиков. ●

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Супотницкий М.В., Супотницкая Н.С. Очерки истории чумы. М.: Вузовская книга, 2006. Кн. 1. 468 с.; Кн. 2. 696 с.
2. Анисимов А.П. // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 2002. № 3. С. 3–23.
3. Анисимов А.П. // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 2002. № 4. С. 3–11.
4. Perry R.D., Fetherston J.D. // Clin. Microbiol. Rev. 1997. V. 10. P. 35–66.
5. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. // Clin. Microbiol. Rev. 2004. V. 17. P. 434–464.
6. Платонов М.Е. Молекулярно-генетическое изучение разнообразия и микроэволюции *Yersinia pestis*: Дис. ... канд. мед. наук. Оболensk: ГИЦ ПМБ, 2010. 142 с.
7. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., et al. // PLoS ONE. 2009. V. 4. P. e6000.
8. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zöller L., Wölfel R., Le Flèche P., Scholz H.C. // PLoS ONE. 2012. V. 7. P. e30624.
9. Raetz C.R.H., Whitfield C. // Annu. Rev. Biochem. 2002. V. 71. P. 635–700.
10. Knirel Y.A., Dentovskaya S.V., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z., Kocharova N.A., Anisimov A.P. // J. Endotoxin Res. 2006. V. 12. P. 3–9.
11. Бывалов А.А., Оводов Ю.С. // Биоорган. химия. 2011. Т. 37. С. 452–463.
12. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Fursova N.K., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., et al. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 1731–1743.
13. Vinogradov E.V., Lindner B., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Holst O., Gremyakova T.A., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 775–777.
14. Holst O. Endotoxin in Health and Disease. N.Y.: Marcel Dekker, 1999. P. 115–154.
15. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez-Prada C.M., Nikolich M.P. // PLoS ONE. 2011. V. 6. P. e25486.
16. Kiljunen S., Datta N., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Knirel Y.A., Bengoechea J.A., Holst O., Skurnik M. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 4963–4972.
17. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Shaikhutdinova R.Z., Senchenkova S.N., Kocharova N.A., Holst O., Pier G.B., Anisimov A.P. // Carbohydr. Res. 2005. V. 340. P. 1625–1630.
18. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Шайхутдинова Р.З., Кондакова А.Н., Быстрова О.В., Линднер Б., Книрель Ю.А., Анисимов А.П. // Биохимия. 2008. Т. 73. С. 237–246.
19. Knirel Y.A., Kondakova A.N., Bystrova O.V., Lindner B., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. // Adv. Sci. Lett. 2008. V. 1. P. 192–198.
20. Aussel L., Thérissod H., Karibian D., Perry M.B., Bruneteau

- M., Caroff M. // *FEBS Lett.* 2000. V. 465. P. 87–92.
21. Rebeil R., Ernst R.K., Gowen B.B., Miller S.I., Hinnebusch B.J. // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 52. P. 1363–1373.
22. Rebeil R., Ernst R.K., Jarrett C.O., Adams K.N., Miller S.I., Hinnebusch B.J. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 1381–1388.
23. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H., Lindner B., Matsuura M. // *Infect. Immun.* 2002. V. 70. P. 4092–4098.
24. Jones J.W., Shaffer S.A., Ernst R.K., Goodlett D.R., Tureček F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 12742–12747.
25. Jones J.W., Cohen I.E., Tureček F., Goodlett D.R., Ernst R.K. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010. V. 21. P. 785–799.
26. Vinogradov E.V., Knirel Y.A., Thomas-Oates J.E., Shashkov A.S., Lvov V.L. // *Carbohydr. Res.* 1994. V. 258. P. 223–232.
27. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., et al. // *Nat. Immunol.* 2006. V. 7. P. 1066–1073.
28. Kondakova A.N., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Dentovskaya S.V., Shashkov A.S., Anisimov A.P., Knirel Y.A. // *Carbohydr. Res.* 2009. V. 344. P. 2421–2423.
29. Skurnik M., Peippo A., Ervelä E. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 37. P. 316–330.
30. Дентовская С.В., Шайхутдинова Р.З., Книрель Ю.А., Иванов С.Л., Анисимов А.П. // *Молекул. генетика, микробиология и вирусология.* 2006. № 2. С. 3–8.
31. Bishop R.E. // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 57. P. 900–912.
32. Дентовская С.В., Анисимов А.П., Кондакова А.Н., Быстрова О.В., Линднер Б., Светоч Т.Э., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Книрель Ю.А. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. С. 989–1005.
33. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Kondakova A.N., Lindner B., Shaikhutdinova R.Z., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Knirel Y.A. *The Challenge of Highly Pathogenic Microorganisms – Mechanism of Virulence and Novel Medical Countermeasures.* Dordrecht: Springer, 2010. P. 77–87.
34. Knirel Y.A., Dentovskaya S.V., Bystrova O.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Lindner B., Pier G.B., Anisimov A.P. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. V. 603. P. 88–96.
35. Carty S.M., Sreekumar K.R., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 9677–9685.
36. Bishop R.E., Gibbons H.S., Guina T., Trent M.S., Miller S.I., Raetz C.R. // *EMBO J.* 2000. V. 19. P. 5071–5080.
37. Gunn J.S., Lim K.B., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S.I. // *Mol. Microbiol.* 1998. V. 27. P. 1171–1182.
38. Trent M.S., Ribeiro A.A., Doerrler W.T., Lin S., Cotter R.J., Raetz C.R.H. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 43132–43144.
39. Winfield M.D., Latifi T., Groisman E.A. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 14765–14772.
40. Meredith T.C., Aggarwal P., Mamat U., Lindner B., Woodard R.W. // *ACS Chem. Biol.* 2006. V. 1. P. 33–42.
41. Reynolds C.M., Raetz C.R. // *Biochemistry.* 2009. V. 48. P. 9627–9640.
42. Tan L., Darby M. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 6599–6600.
43. Pacinelli E., Wang L., Reeves P.R. // *Infect. Immun.* 2002. V. 70. P. 3271–3276.
44. Hitchen P.G., Prior J.L., Oyston P.C., Panico M., Wren B.W., Titball R.W., Morris H.R., Dell A. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 44. P. 1637–1650.
45. Chung H.S., Raetz C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 510–515.
46. Reynolds C.M., Kalb S.R., Cotter R.J., Raetz C.R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 21202–21211.
47. Touze T., Tran A.X., Hankins J.V., Mengin-Lecreulx D., Trent M.S. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 67. P. 264–277.
48. Prior J.L., Parkhill J., Hitchen P.G., Mungall K.L., Stevens K., Morris H.R., Reason A.J., Oyston P.C.F., Dell A., Wren B.W., Titball R.W. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2001. V. 197. P. 229–233.
49. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. // *Nature.* 2009. V. 458. P. 1191–1195.
50. Anisimov A.P., Shaikhutdinova R.Z., Pan'kina L.N., Feodorova V.A., Savostina E.P., Bystrova O.V., Lindner B., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., et al. // *J. Med. Microbiol.* 2007. V. 56. P. 443–453.
51. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H., Saito S., Kawahara K. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2010. V. 17. P. 49–55.
52. Telepnev M.V., Klimpel G.R., Haithcoat J., Knirel Y.A., Anisimov A.P., Motin V.L. // *J. Infect. Dis.* 2009. V. 200. P. 1694–1702.
53. Sun W., Six D., Kuang X., Roland K.L., Raetz C.R.H., Curtis R. III. // *Vaccine.* 2011. V. 29. P. 2986–2998.
54. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P., Sayapina L.V., Motin V.L., Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Lindner B., Kondakova A.N., et al. // *Vaccine.* 2007. V. 25. P. 7620–7628.
55. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P., Kuznetsov O.V., Konnov N.P., Sayapina L.V., Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Ageev S.A., Lindner B., et al. // *Vaccine.* 2009. V. 27. P. 2240–2250.
56. Bengoechea J.A., Brandenburg K., Seydel U., Díaz R., Moriyón I. // *Microbiology.* 1998. V. 144. P. 1517–1526.
57. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Shaikhutdinova R.Z., Balakhonov S.V., Lindner B., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Holst O., et al. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. P. 7324–7331.
58. Klein K.A., Fukuto H.S., Pelletier M., Romanov G., Grabenstein J.P., Palmer L.E., Ernst R., Bliska J.B. // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. P. 653–662.
59. Bartra S.S., Styer K.L., O'Bryant D.M., Nilles M.L., Hinnebusch B.J., Aballay A., Plano G.V. // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. P. 612–622.
60. Kolodziejek A.M., Schnider D.R., Rohde H.N., Wojtowicz A.J., Bohach G.A., Minnich S.A., Hovde C.J. // *Infect. Immun.* 2010. V. 78. P. 5233–5243.
61. Darby C., Ananth S.L., Tan L., Hinnebusch B.J. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. P. 7236–7242.
62. Tidhar A., Flashner Y., Cohen S., Levi Y., Zauberman A., Gur D., Aftalion M., Elhanany E., Zvi A., Shafferman A., et al. // *PLoS ONE.* 2009. V. 4. P. e7023.
63. Kukkonen M., Suomalainen M., Kyllonen P., Lahteenmaki K., Lang H., Virkola R., Helander I.M., Holst O., Korhonen T.K. // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 51. P. 215–225.
64. Pouillot F., Derbise A., Kukkonen M., Foulon J., Korhonen T.K., Carniel E. // *Microbiology.* 2005. V. 151. P. 3759–3768.
65. Suomalainen M., Lobo L.A., Brandenburg K., Lindner B., Virkola R., Knirel Y.A., Anisimov A.P., Holst O., Korhonen T.K. // *Infect. Immun.* 2010. V. 78. P. 2644–2652.
66. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2007. Т. 93. С. 49–51.
67. Eren E., Murphy M., Goguen J., van den Berg B. // *Structure.* 2010. V. 18. P. 809–818.
68. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M., Georgescu A.M., Vergez L.M., Land M.L., Motin V.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 13826–13831.