

45. Munoz F.M., Campbell J.R., Atmar R.L. et al. Influenza A virus outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999, 18 (9): 811-815.
46. Neu N., Plaskett T., Hutcheon G. et al. Epidemiology of human metapneumovirus in a pediatric long-term care facility. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2012, 33 (6): 545-550. doi: 10.1086/665727.
47. Nichols W.G., Erdman D.D., Han A. et al. Prolonged outbreak of human parainfluenza virus 3 infection in a stem cell transplant outpatient department: insights from molecular epidemiologic analysis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2004, 10 (1): 58-64.
48. Palomino M.A., Larranaga C., Avendano L.F. Hospital-acquired adenovirus 7h infantile respiratory infection in Chile. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000, 19 (6): 527-531.
49. Park H.Y., Lee E.J., Ryu Y.W. et al. Epidemiological investigation of MERS-CoV spread in a single hospital in South Korea, May to June 2015. *Euro. Surveill.* 2015, 20 (25): 1-6.
50. Qiu S., Li P., Liu H. et al. Whole-genome sequencing for tracing the transmission link between two ARD outbreaks caused by a novel HAdV serotype 7 variant, China. *Sci. Rep.* 2015, 5: 13617. doi: 10.1038/srep13617.
51. Sanchez M.P., Erdman D.D., Torok T.J. et al. Outbreak of adenovirus 35 pneumonia among adult residents and staff of a chronic care psychiatric facility. *J. Infect. Dis.* 1997, 176 (3): 760-763.
52. Sidler J.A., Haberthur C., Dumoulin A. et al. A retrospective analysis of nosocomial viral gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2012, 31: 1233-1238.
53. Valenti W.M., Menegus M.A., Hall C.B. et al. Nosocomial viral infections: I. Epidemiology and significance. *Infect. Control.* 1980, 1 (1): 33-37.
54. Valley-Omar Z., Nindo F., Mudau M. et al. Phylogenetic exploration of nosocomial transmission chains of 2009 Influenza A/H1N1 among children admitted at Red Cross War Memorial Children's Hospital, Cape Town, South Africa in 2011. *PLoS One.* 2015, 10 (11): e0141744. doi:10.1371/journal.pone.0141744.
55. Vincent A., La Scola B., Forel J.M. et al. Clinical significance of a positive serology for mimivirus in patients presenting a suspicion of ventilator-associated pneumonia. *Crit. Care Med.* 2009, 37 (1):111-118. doi:10.1097/CCM.0b013e318192fa8b.
56. Voirin N., Barret B., Metzger M.H., Vanhems P. Hospital-acquired influenza: a synthesis using the Outbreak Reports and Intervention Studies of Nosocomial Infection (ORION) statement. *J. Hosp. Infect.* 2009, 71 (1): 1-14. doi: 10.1016/j.jhin.2008.08.013.
57. von Linstow M.L., Høgh M., Høgh B. Clinical and epidemiologic characteristics of human bocavirus in Danish infants: results from a prospective birth cohort study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008, 27 (10): 897-902. doi:10.1097/INF.0b013e3181757b16.
58. Wald T.G., Shult P., Krause P. et al. A rhinovirus outbreak among residents of a long-term care facility. *Ann. Intern. Med.* 1995, 123 (8): 588-593.

Поступила 17.06.19

Контактная информация: Захарова Ю.А.,  
620000, Екатеринбург, ул. Летняя, 23, п.т. (343)261-99-47

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*М.Н.Бойченко, Е.О.Кравцова, В.В.Зверев*

## **МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПАРАЗИТИЗМА БАКТЕРИЙ**

Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Алгоритм внутриклеточного паразитирования бактерий не зависит от того, является ли бактерия абсолютным или внутриклеточным паразитом. В зависимости от локализации бактериальной репликативной ниши внутриклеточные паразиты делятся на цитозольные и вакуолярные. Бактерии родов *Rickettsia*, *Shigella*, *Chlamydia* и вид *Listeria monocytogenes* используют в процессе внутриклеточного паразитирования аппарат полимеризации актина клетки хозяина. Эти бакте-

рии обладают эффекторными белками, домены которых идентичны эффекторным белкам клетки хозяина. У бактерий рода *Shigella* в этом процессе активное участие принимают эффекторные белки третьего типа секреторной системы (Т3СС). *Listeria monocytogenes* в отличие от других цитозольных бактериальных внутриклеточных паразитов обладает двумя формами паразитирования: цитозольным и вакуолярным. У бактерий рода *Brucella* в создании репликативной ниши внутри клетки решающую роль выполняют эффекторные белки четвертого типа секреторной системы (Т4СС), которые также участвуют в модуляции врожденного иммунного ответа

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 61—72

Ключевые слова: *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, актиновая подвижность, репликативная ниша, Т3СС, Т4СС, внутриклеточный паразитизм

*M.N.Boichenko, E.O.Kravtsova, V.V.Zverev*

## MECHANISM OF INTRACELLULAR BACTERIAL PARASITISM

Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Algorithm of intracellular bacterial parasitism does not depend on if bacterium is obligate or facultative intracellular parasite. Depending on replicative niche's localization intracellular bacterial parasites are divided onto cellular and vacuolated. *Rickettsia* spp., *Shigella* spp., *Chlamydia* spp. and *Listeria monocytogenes* use cell's machinery of actin polymerization during process of their intracellular parasitism. These bacteria possess some of effector's proteins which contain domains identical to effector proteins from the host cell. *Shigella* spp. T3SS and autotransporter protein IscA provide this process together with spreading bacteria intra colonic epithelium. In contrast other intracellular bacterial parasites, *Listeria monocytogenes* switches from dissemination in cytosol to persist in vacuole. In case of *Brucella* spp. the leading role in the creation of a replicative niche and in the modulation of the innate immune response is played by effector proteins of fourth type secretory system (T4SS).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 61—72

Key words: *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, actin —based movement, replicative niche, T3SS, T4SS, intracellular parasitism

Молекулярный механизм внутриклеточного паразитирования бактерий в последнее время значительно привлекает внимание исследователей. В основе этого внимания лежит ряд факторов. Те бактерии, которые являются внутриклеточными паразитами, вызывают хронические персистирующие инфекции, заболевания, вызванные ими, протекают как в латентной форме с реактивацией, так и в форме бактерионосительства. Их паразитизм внутри клетки ограничивает доступ к ним лекарственных препаратов, что требует разработку новых антибактериальных средств для лечения этой группы заболеваний.

Следует отметить, что в развитии внутриклеточного паразитизма бактерий важную роль играют открытые в конце XX века неклассические факторы патогенности — секреторные системы, которые присутствуют главным образом у грамотрицательных бактерий. Секреторные системы представляют собой структурные белковые образования, пролегающие от внутренней цитоплазматической мембраны с формированием канала, проходящего через периплазматическое пространство и наружную мембрану. Их функцией является доставка синтезированных бактериальной клеткой веществ (эффекторов) в клетку чувствительного организма. Типы секреторных систем различаются по строению и функциональной значимости. Типы 3(Т4СС), 4(Т4СС) и 6 (Т6СС) имеют шприцеобразную форму и принимают значительное участие в процессе внутриклеточного паразитирования бактерий [1,2].

Как известно, внутриклеточные паразиты подразделяются на абсолютные, которые не способны существовать вне клетки (риккетсии, хламидии и коксии), и факультативные. Это подразделение связано с особенностями метаболизма бактериальной клетки. А вот характер взаимодействия с эукариотической клеткой не зависит от метаболической особенности бактерий, и внутриклеточных паразитов подразделяют на 2 большие группы: цитозольные и вакуолярные.

Для того, чтобы существовать внутри клетки, бактериальный паразит должен создать внутри нее репликативную нишу. Для этого он должен обладать следующими стратегиями: способностью активировать полимеризацию клеточного актина, в результате чего бактерия получает возможность проникать в клетку, которая не является профессиональным фагоцитом, путем «незаконного фагоцитоза», а также распространяться по межклеточному пласту; способностью формировать внутри клетки содержащую бактерию-паразит вакуоль, а для этого быть способной разрушать или модулировать эндосомальный каскад и ингибировать продвижение активных форм кислорода и азота; способностью противостоять факторам врожденного иммунитета.

При одном варианте как факультативные, так и облигатные паразиты формируют свою нишу в вакуоле, которая начинает диссоциировать от эндосомо-лизосомального пути созревания. Таких внутриклеточных паразитов называют вакуолярными. К ним относятся бактерии родов *Salmonella*, *Brucella*, *Coxiella*, *Legionella*, *Chlamydia* [1].

Альтернативная стратегия предполагает убежание бактерии из эндоцитарной вакуоли для того, чтобы использовать цитозоль клетки-хозяина в качестве сайта-репликации. Таких бактерий называют цитозольными внутриклеточными паразитами. К ним относятся рассмотренные ранее бактерии родов *Francisella*, *Shigella* [2], а также *Listeria*, *Rickettsia* [2,5]. Эта группа бактерий использует клеточный аппарат полимеризации актина как механизм межклеточного распространения и иммунного избегания [26,31]. Актиновый цитоскелет клетки представляет ключевую мишень для внутриклеточных бактериальных паразитов. Особенностью цитозольных паразитов является то, что они, инвазируя нефагоцитирующие клетки, выбегают из фагосомы в цитозоль, где полимеризуют актиновые филаменты для сборки на своей поверхности актинового хвоста, который обеспечивает развитие феномена актиновой подвижности (АП), способствует распространению микроба через цитозоль, направляя его распространение в соседние клетки [31].

Этот процесс состоит из нескольких этапов [26].

1. После интернализации в клетку хозяина бактерии попадают в образованную мембраной клетки фагосому.

2. Через 30-60 минут фагосома разрушается бактериальными факторами, предоставляя микробу доступ в цитозоль.

3. В цитозоле клетки хозяина цитозольные паразиты реплицируются и декорируются актиновыми филаментами клетки хозяина.

4. Рекрутирование клеточного актина является результатом полимеризации актиновых мономеров поверхностными белками бактерии. Актиновые филаменты организуются в хвостоподобные структуры и вызывают продвижение бактерий через цитоплазму к межклеточному соединению.

5. Происходит формирование выпячивания в соседнюю клетку, окруженного двойной цитоплазматической мембраной, которое в соседней клетке преобразуется в вакуоль. Бактериальные ферменты разрушают вакуоль, освобождая микроб, позволяя ему инфицировать следующие клетки.

Для развития актиновой подвижности необходим процесс нуклеации актина, т.е. сборка актиновых филаментов: димеров или тримеров. Этот процесс стимулируется в клетке белками нуклеаторами, к которым относятся Agr и формин.

Arp (actin related protein) представляет комплекс, состоящий из 7 белков [7], у которого белки Arp2/Arp3 (Arp2/3) обладают структурным подобием мономеру актина [7]. Arp2/3 стимулируют полимеризацию актина со стороны материнского филамента, образуя структуру Y-ветвистой формы, которая служит первой субъединицей нового актинового филамента.

Сам по себе Arp2/3 не способен вызвать сборку актина. Для этого требуется его активация факторами, способствующими нуклеации [14]. Одним из них является белок неврологического синдрома Wiscott-Aldrich (WASP). Взаимодействуя с Arp2/3, WASP вызывает их конформационные изменения, делая комплекс способным для осуществления нуклеации [14].

Формин-протеин функционирует как димер, используя свои два домена FH1 и FH2 для стимуляции сборки линейных актиновых филаментов.

Рассмотрим механизмы паразитирования у некоторых цитозольных паразитов, к которым относятся шигеллы, риккетсии и листерии.

Попав в толстый кишечник, шигеллы не инвазируют его эпителиальные клетки с апикальной стороны, а проходят трансцитозом эпителиальный слой через М-клетки. Начальный контакт между шигеллой и эпителиальной клеткой толстого кишечника происходит в участке липидного «рафта», богатого холестерином участка мембраны, который находится на базальной стороне эпителиальной клетки толстого кишечника [46]. Этот контакт опосредован рецепторами CD44 и альфа5,бета1-интегрином. С этого момента начинают активно участвовать факторы патогенности шигелл, синтез которых связан с генами «островков патогенности», расположенных на крупной плазмиде вирулентности WR 100.

Важным фактором патогенности шигелл является третьего типа секреторная система (ТЗСС), синтез которой опосредуется 30-килобазным районом плазмиды pWR 100, обозначенным как район входа, «entry» район [39]. «Entry» район состоит из 2 оперонов: *mxi—spa*, которые кодируют структурный аппарат ТЗСС и оперон *ira/iprg*, гены которого имеют существенное значение для инвазии микроба в клетку, *ira/iprg* оперон включает *iprg*—гены, экспрессирующие шапероны, и *ira*-гены, которые экспрессируют траслокаторы, являющиеся компонентами транслоконового комплекса, образующего поры в мембране клетки-мишени, что позволяет проводить транслокацию эффекторных молекул. Процесс проникновения шигелл в клетку требует гликозилирование ЛПС, так как это способствует более эффективно-му контакту компонентов транслоконового комплекса ТЗСС с мембраной клетки. Белок транслоконового комплекса *IraB* опосредует адгезию микроба к базальной мембране эпителиальной клетки толстого кишечника через взаимодействие гликопротеинового рецептора CD44, который локализован в «рафт»-домене цитоплазматической мембраны эпителиальной клетки. Критичным компонентом ТЗСС, необходимым для инвазии в клетку, является белок *IraC*. Этот белок состоит из 3 районов: N-терминального, обладающего сигнальной последовательностью для связывания с шапероном, C-карбоксильного и центрального гидрофобного района, который взаимодействует с *IraB*. В результате этого взаимодействия происходит проникновение иглы ТЗСС в мембрану клетки, запуск реорганизации цитоскелета и микропиноцитоза. Белок *IraD* выступает подложкой комплекса *IraB-IraC*, он также участвует в процессе сморщивания мембраны клетки [40]. В процессе реорганизации цитоскелета клетки принимают участие Rho-ГТФаза и тирозинкиназа.

В сайте внедрения микроба происходит индукция полимеризации актина, что приводит к образованию массивного мембранного впячивания, которое охватывает микроб, образуя первичную вакуоль, в которой находится возбудитель. Этот процесс

требует активации малой Rho-ГТФазы, которая рекрутирует актин-нуклеирующий комплекс Arp2/Arp3 [7]. В процесс регуляции впячивания мембраны вовлечен также белок IpaA за счет его взаимодействия с белком клетки хозяина, винкулином, который связывает цитоскелет клетки с экстрацеллюлярным матриксом. Мутанты по *iра*—гену обладают в 10 раз сниженной инвазивной способностью [33]. В лизисе образованной первичной вакуоли принимает участие IpaB-IpaC комплекс, внедрение которого в вакуолярную мембрану является причиной ее лизиса. Это происходит через образование поры, которая приводит к дестабилизации вакуоли [40].

Цитоплазма эпителиальной клетки является главной репликативной нишей для шигелл. Главным бактериальным медиатором полимеризации актина является белок IscA (intracellular spread protein) [4,21]. IscA контролирует клеточные факторы, включая neuronal Wiskotts-Aldrich синдромный протеин и Arp2/Arp3 [18].

Белок IscA кодируется плазмидой вирулентности, но не является эффекторным белком ТЗСС. Он является представителем белков — аутотранспортёров IscA, состоит из 3 доменов: N-терминальной сигнальной последовательности, С-терминального домена, формирующего бета-цилиндрический канал, который формирует пору во внешней мембране бактериальной клетки, через которую через бета-цилиндрический канал на поверхность бактерии транспортируется N-терминальный домен и центральный альфа-домен [33]. Экспонированный в цитозоль клетки-хозяина IscA активирует N-WASP. В результате этого взаимодействия происходит быстрая сборка актинового ядра и разрастание актиновой сети в области локализации N-терминального домена белка IscA, что формирует проталкивающую силу для движения бактерии по клетке.

Когда бактерия достигает межклеточного контакта, происходит образование мембранного выпячивания, проникающего в соседнюю клетку [24]. Мембранное выпячивание подвергается преобразование в вакуоль-подобное выпячивание (ВПВ). ВПВ представляет образование, состоящее из двойной мембраны, окружающей бактериальную клетку, но остается связанным с клеткой, из которой произошло выпячивание [24]. Преобразование выпячивания в вакуоль происходит через коллапс «шеи» выпячивания. Плазматическая мембрана ВПВ богата тирозиновыми остатками, поэтому предполагается, что в процессе преобразования ВПВ в вакуоль принимает участие тирозинкиназа и фосфатидил инозитол-3киназа [2,24].

В процессе разрушения вторичной вакуоли, окруженной двойной цитоплазматической мембраной, что способствует «побегу» из нее шигелл, участвуют сама ТЗСС и ее эффекторные белки IscBVirA.

Дальнейшая внутриклеточная репликация, активная подвижность и сохранение шигелл внутри клеток зависят от эффекторной молекулы ТЗСС IscB [36], который защищает бактерию от узнавания и захвата механизмом самопереваривания (аутофагии). Самопереваривание — процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь ее лизосом, где подвергаются деградации.

На белке IscA имеется индуцирующий процесс аутофагии сайт узнавания [33], который маскируется IscB при участии шаперона IrgA для предупреждения заглатывания микроба везикулами аппарата аутофагии [36]. В ингибиции процесса самопереваривания участвует также белок VirA, обладающий цистеин протеазной активностью и способностью вызывать микротубулярную деградацию. После проникновения в соседнюю клетку повторяется новый цикл распространения шигеллы по клеточному пласту.

Бактерии рода *Rickettsia*, в отличие от шигелл, являются облигатными внутриклеточными паразитами, которые в организме человека преимущественно инфицируют эндотелий малых и средних сосудов [43]. Интернализация риккетсий в



клетку хозяина происходит, как предполагают, индуцированным фагоцитозом, в процессе которого принимают участие белки наружной мембраны риккетсий [43]. Оказавшись внутри внутриклеточной вакуоли, риккетсии разрушают ее мембрану, используя гемолизин и фосфолипазу D. Для дальнейшей диссеминации через эндотелий риккетсии используют актиновую подвижность, однако молекулярный механизм ее развития отличается от такового у шигелл [2].

Наиболее детально этот процесс изучен у риккетсий, входящих в группу клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ). На поверхности бактериальной клетки риккетсий группы КПЛ имеется белок RickA, обладающий аминокислотным подобием WASP. Он способен стимулировать Acp2/3-зависимую полимеризацию в системе *in vitro*.

Помимо RickA на поверхности клетки риккетсий группы КПЛ имеется еще белок Sca2, который участвует в нуклеации актина [23,28]. Этот белок обладает аминокислотным подобием белку формину [23]. Подобно форминовому белку Sca2 нуклеирует сборку линейных актиновых филаментов. Это предполагает, что риккетсии группы КПЛ используют формин-подобные свойства Sca2 для первичного механизма движения как внутри клетки, так и между клетками.

Наличие на поверхности микробной клетки риккетсий группы КПЛ двух белков, способных стимулировать полимеризацию актина, привело к предположению, что они действуют в клетке на разных стадиях инфекционного процесса. RickA связан с индукцией реорганизации актина цитоскелета клетки в период интернализации риккетсий [23]. На примере *R. parkeri* из группы КПЛ было показано, что в период раннего времени инфекционного процесса экспрессируется RickA, полимеризуя короткие закругленные актиновые хвосты Acp2/3-зависимым механизмом [22,38]. В дальнейшем Sca2 начинает вызывать полимеризацию длинного прямого актинового хвоста.

Интересным циклом внутриклеточного паразитирования обладают бактерии рода *Listeria*. *L. monocytogenes* обладает способностью сохраняться и реплицироваться как в фагоцитарных, так и в нефагоцитарных клетках [16]. Поверхностные белки микроба: интерналины А и В (nlA,B) служат лигандами для рецепторов клетки хозяина для лигандо-рецепторного взаимодействия, опосредующего захват бактерии рецептор — опосредованным эндоцитозом [16]. Оказавшись в вакуоли внутри клетки, *L. monocytogenes* секретирует холестерин-зависимый листериолизин О (LLO), обладающий двойной функцией: ингибцией развития фагосомы и образовании поры в мембране вакуоли. Используя листериолизин совместно с двумя фосфолипазами С, *L. monocytogenes* разрушает мембрану вакуоли и выбегает в цитоплазму клетки хозяина [5,16]. Микроб реплицируется в цитозоле и приобретает актиновую подвижность, используя актиновый цитоскелет клетки хозяина. В цитоплазме клетки происходит индукция поверхностного белка ActA, который, имитируя хозяйский фактор нуклеации актина, активирует Acp2/3 [6], индуцируя сборку актина в форме «актинового хвоста», напоминающего комету [32]. Актиновая подвижность дает возможность микробу распространяться из клетки в клетку через образование мембранного впячивания из первично инфицированной клетки в соседнюю, формируя двух-мембранную вакуоль, из которой микроб «убегает» и инициирует новый цикл [5,32]. *L. monocytogenes*, как показали последние исследования, обладает двумя формами паразитирования: цитозольным и вакуолярным.

После нескольких дней паразитирования в цитозоле бактерии резко прекращают продукцию ActA и захватываются в листерии содержащую вакуоль. В этой вакуоле происходит переход микроба в так называемое живое, но не культивируемое состояние (VBNC). В этом состоянии бактерии не удается обнаружить, используя рутинные методы культивирования [30]. При использовании модели мышинных

макрофагов в системе *in vitro* было показано, что при обработке инфицированных листериями клеток высокими дозами гентамицина происходил запуск образования VBNC с отбором бактериальных клеток в некультивированной форме [30]. Такой двойной цикл внутриклеточного паразитирования *L.monocytogenes* должен способствовать бессимптомному носительству этого микроба, что может быть очень опасным для беременных, а также сохранению микроба в организме-хозяина при проведении антибиотикотерапии.

Вакуолярные паразиты после проникновения в клетку сохраняются и размножаются в содержащих микробы вакуолях, избегая их слияния с лизосомой или изменяя окружение фаголизосомы. К ним относятся бактерии родов *Salmonella*, *Brucella*, *Coxiella*, *Chlamydia* [1]. Следует отметить, что процесс формирования фаголизосомы проходит через несколько стадий. Вскоре после проникновения микроба в клетку и формирования эндосомы наступает ранняя фаза, в течение которой связанная с ферментом ГТФазой RAB5 эндосома приобретает маркерный белок EEA1. Поздняя эндосома теряет RAB5, приобретая ГТФазу RAB7, лизосомо-ассоциированные гликопротеины LAMP1 и LAMP2 и вакуолярную АТФазу, которая проталкивает протоны в развивающуюся фагосому для понижения рН. В финале фагосома сливается с лизосомальными участками, приобретая катепсины и гидролазы, вакуолярная АТФаза понижает рН до 4,5 [1,9]. Стратегия внутриклеточного паразитизма направлена или на разрушение эндосомального каскада и ограничения созревания фагосомы на ранней стадии для избегания слияния с лизосомой, или изменения состояния фаголизосомы в случае слияния фагосомы с лизосомой, что реализуется у этой группы бактерий.

Рассмотрим, что происходит в процессе паразитирования внутри клетки у бактерий рода *Brucella*. Бруцеллы, возбудители бруцеллеза, проникают в организм человека через дыхательные пути, пищеварительный тракт и конъюнктиву. Бруцеллы не обладают ТЗСС, в процессе проникновения в организм прикрепляются к клеткам слизистой, связываясь с рецепторами, содержащими сиаловую кислоту и сульфатные остатки [15,42]. Связывание способствует активации ГТФазы, которая стимулирует сигнальный каскад, приводящий к реорганизации цитоскелета клетки, в результате мембрана клетки располагается вдоль поверхности бактерии. Интернализация бруцеллы в клетку происходит по zipper-подобному механизму (механизму молнии) [1]. После проникновения в фагоцитарную и нефагоцитарную клетки бруцеллы оказываются внутри мембранного образования, называемого содержащей бруцеллы вакуоли (БСВ) или (BCV). БСВ начинает продвигаться по эндосомальному пути, приобретая ранние и поздние эндосомальные мембранные маркеры, внутри нее происходит понижение рН до 4,5. На этом этапе внутриклеточного цикла она получает название эндосомальной БСВ (эБСВ). Несмотря на приобретение маркеров поздней эндосомы, ассоциированных с лизосомой мембранных протеинов 1 и 2 (LAMP1,2), которые контролируют слияние с лизосомой, эБСВ избегает слияния с лизосомой [9,20].

Под влиянием низкого рН начинается активация VirB оперона, синтезирующего Т4СС, через которую в клетку хозяина через мембрану эБСВ поставляются эффекторные молекулы для модуляции клеточных функций и биогенеза БСВ. Т4СС бруцелл не требуется микробу для инвазии в клетку, но необходима для пролонгированной персистенции. Т4СС секретирует 15 эффекторных молекул, которые обеспечивают внутриклеточную персистенцию бруцелл. Эффекторные белки Т4СС участвуют в модификации внутриклеточного трафика, ограничивая слияние БСВ с лизосомой, а также способствуют выработке относительно низкого уровня

иммунного ответа, сигнального узнавания врожденного иммунитета [9]. Благодаря активности эффекторов T4CC eБСВ начинает терять эндосомальные маркеры с сопутствующим поддерживающим взаимодействием со структурами эндоплазматического ретикулума (ЭР), приобретая его мембранные маркеры, что показывает переход eБСВ в репликативную eБСВ. Эти структурные и функциональные изменения коррелируют с началом бактериальной репликации [15]. Следует отметить, что репликация внутриклеточных вакуолярных паразитов может происходить в узких и объемных вакуолях. У бруцелл вакуолярная мембрана окружает каждую бактерию, и репликация микроба сопровождается растяжением вакуолярной мембраны при делении, вызывая «инкапсулирование» каждого потомка, формируя узкую вакуоль [9,15]. Объемные вакуоли содержат 2 и более бактерии, окруженные единой мембраной. Вслед за бактериальной репликацией наступает добавочная стадия внутриклеточного цикла бруцеллы — стадия захвата рБСВ серповидо подобными мембранными структурами, которая приводит к образованию мультимембранной вакуоли, напоминающую аутофагосому. Эта ремодулированная рБСВ получила название аутофаговой БСВ (аБСВ). Ее образование связано с выделением бактерии из инфицированной клетки и окончанием внутриклеточного цикла [9].

VirB оперон, кодирующий у бруцелл T4CC, состоит из 12 генов и расположен во 2 хромосоме. Он высоко консервативен у всех видов рода *Brucella*. T4CC секретирует 15 эффекторных молекул, которые обеспечивают внутриклеточную персистенцию бруцелл. Мутанты бруцелл, дефицитные по T4CC, хотя и способны инвазировать клетки хозяина, но не способны поддерживать внутриклеточный жизненный цикл и устанавливать репликативную нишу [29]. В биогенезе рБСВ принимают участие такие эффекторные молекулы T4CC, как RicA, необходимый для установления ЭР-производной репликативной БСВ, вырабатывая точное взаимодействие с органеллами секреторных путей; VspB регулирует биогенез рБСВ и внутриклеточную репликацию; SerA регулирует эБСВ трафик [9,10]. По мнению Delevoe C. et al. [12], T4CC требуется для выработки относительного низкого уровня иммунного ответа, сигнального узнавания врожденного иммунитета, играя, таким образом, решающую роль в ингибции врожденного иммунитета хозяина. Следует отметить, что присутствие в липиде А ЛПС бруцеллэлонгированных молекул жирных кислот приводит, как к уменьшению токсичности эндотоксина, так и к понижению врожденного иммунного ответа, вследствие того, ЛПС служит слабым агонистом для TLR4 [41]. В добавок к этому бруцеллы вырабатывают иммунорегуляторные факторы, которые супрессируют иммунный ответ. В ингибции врожденного иммунитета принимают участие эффекторные молекулы T4CC VceC, VtrA.

Эффекторный белок VceC участвует в активации ответа на неправильно свернутый белок [9]. VtrA содержат TIR (toll-interleukinreceptor) домен. VtrA действует на клеточный сигнальный адапторный белок MyD88 [8], вызывая ингибцию сигнального каскада узнавания клетки хозяина, приводя к нарушению TLR опосредованной продукции провоспалительных факторов [9,29,37,45,47].

Рассмотрим поведение еще одного представителя вакуолярных паразитов, который, в отличие от бруцелл, является абсолютным внутриклеточным паразитом. Это бактерии рода *Chlamydia*. Все хламидии обладают бифазным циклом развития, при котором они из экстрацеллюлярной инфекционной формы элементарного тельца (ЭТ) при попадании в клетку хозяина переходят в метаболически активное ретикулярное тельце (РТ) [19]. Трансформация ЭТ в РТ осуществляется внутри инфицированной хламидией клетке хозяина в образованной мембранной вакуоле, которую называют включением [11,17].



ЭТ и РТ хламидий морфологически и функционально различны. ЭТ способны сохраняться в экстрацеллюлярном пространстве, благодаря отличительному строению внешней мембраны, которая в два раза толще внешней мембраны других грамотрицательных бактерий. Это связано с присутствием во внешней мембране сети перекрестно связанных дисульфидными связями белков, образующих внешнемембранный комплекс, который обеспечивает резистентность ЭТ к осмотическому давлению и ригидность, необходимых для их внеклеточного жизненного цикла [25].

Несмотря на то, что ЭТ считаются метаболически неактивными, они содержат избыток белков, которые могут быть использованы при «взрыве» метаболической активности в случае проникновения в клетку хозяина и дифференцировке в РТ [44]. В процессе конвертации ЭТ в РТ внешнемембранный комплекс уменьшается в размерах, обеспечивая текучесть мембраны, что является необходимым условием для репликации РТ. РТ делятся бинарным делением. Внутри включения происходит накопление РТ, после чего наступает их реконверсия в инфекционное ЭТ. Реконверсия протекает в несколько стадий — от ранней до поздней [34]. Инфекционные ЭТ выделяются затем из клетки путем ее лизиса или выдавливания из включения [34]. Как ЭТ, так и РТ обладают третьего типа секреторной системой.

ЭТ содержит функционально активную ТЗСС, и активация секреции эффекторных молекул наступает быстро при контакте с клеткой хозяина и выключается после дифференцировки РТ в ЭТ [26].

В связи с ограниченной метаболической активностью ЭТ, секреторный аппарат и эффекторы, требуемые для процесса инвазии хламидии в клетку хозяина, должны быть упакованы в процессе конечной стадии реконверсии РТ в ЭТ [11]. Эффекторные молекулы хламидийной ТЗСС можно разделить на две категории: Тагр — связанный с процессом инвазии транслокационный актин, рекрутирующий фосфопротейн [48]; Inc класс эффекторов, которые опосредуют ключевые этапы взаимодействия хламидий с клеткой хозяина [3].

Контакт с клеткой хозяина, благодаря секреции ТЗСС, индуцирует ремодулирование актина, в результате чего происходит быстрая интернализация микроба [19]. Тагр секретируется в течение 1 минуты после контакта микроба с клеткой и подвергается фосфорилированию клеточными киназами. Фосфорилированный Тагр участвует в процессе нуклеации актина, который необходим для входа микроба в клетку. Этот процесс протекает с вербовкой регуляторов актина, в частности, белков семейства Wiskott-Aldrich [27,31]. Тагр синтезируется на поздней стадии конверсии РТ в ЭТ и быстро упаковывается в ЭТ [48].

После внедрения ЭТ в клетку включение начинает диссоциироваться от канонического эндосомасомального пути и передвигается к перинуклеарной области, при этом перехватывая материал из мультивезикулярных телец, липидных капель, эндоплазматического ретикула [11]. Для создания благоприятного взаимодействия паразит-хозяин хламидиям, как и другим вакуолярным внутриклеточным паразитам [1], необходимо манипулировать мембранным трафиком. Внутриклеточное обитание хламидий требует предотвращения слияния включения с лизосомой. В то же время, происходит продвижение слияния включения с другими компонентами клетки, такими как экзоцитарные везикулы, и слияния включений друг с другом для обеспечения сильного «бактериального удара». Такое слияние включений друг с другом обозначается как гомотипное [17]. В этих процессах ведущая роль принадлежит большой группе эффекторов ТЗСС, входящих в семейство Inc белков [11], которые способны связываться с мембраной включения. Inc белки являются участниками как гомотипного слияния, так и опосредованного SNARE белком мемб-

ранного слияния. SNARE представляет большую группу белков эукариотической клетки, ответственных за внутриклеточное слияние мембран [35]. Inc белки состоят из 40–60 аминокислотных остатков двудольным гидрофобным доменом с включенными в центре гидрофильными остатками. Гидрофобные домены транспортируются через T3CC в мембрану включения [11]. У хламидий обнаружены Inc белки, обладающие SNARE-подобными доменами. В частности, *C.trachomatis* кодирует 3 Inc белка со SNARE-подобными доменами [13]. IncA обладает двумя гомологичными SNARE — N-терминальным и C-терминальным, которые работают независимо в процессе мембранного слияния, но оба они требуются для гомотипного слияния. C-терминальный необходим для осуществления IncA олигомеризации и слияния множества включений в одно.

Обобщая изложенный материал, можно сделать заключение, что алгоритм поведения бактерии-паразита внутри клетки не зависит от того, является ли бактериальный внутриклеточный паразит абсолютным или факультативным. Обращает на себя внимание тот факт, что многие внутриклеточные бактериальные паразиты обладают структурами, которые имитируют структуры клетки хозяина. Тем самым, эти структуры функционируют как функциональные блокаторы, приспособлявая клетку хозяина для своего существования в ней. К таким структурам относятся обнаруженные у хламидий Inc белки, обладающие SNARE-подобными доменами [13]; эффекторный белок T4CC бруцелл, VtpA, который содержит TIR (toll interleukin receptor) домен [9]; белок Sca2, обладающий аминокислотным подобием белку формину у риккетсий [23]; белок RickA, обладающий аминокислотным подобием с WASP у риккетсий [38]. Эволюционное происхождение таких структур представляет интересный вопрос, который может быть разрешен в ходе дальнейших исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бойченко М.Н., Кравцова Е.О., Волчкова Е.В. и др. Некоторые молекулярные механизмы паразитирования бактерий внутри цитоплазмы клетки хозяина. Инфекционные болезни. 2018, 16(2): 92-97.
2. Бойченко М.Н., Кравцова Е.О., Волчкова Е.В., Белая О.Ф. Некоторые вопросы молекулярного патогенеза внутриклеточного паразитизма бактерий. Инфекционные болезни. 2017, 15(4):71-75.
3. Bastidas R.J., Elwell C., Engel J., Valdivia R.H. Chlamydial intracellular survival strategies. Cold Spring Harb. Perspec. Med. 2013, 3: a010256.
4. Bernardini M.L., Mounier J., dHauteville H. et al. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, 86:3867-3871.
5. Bierene H., Milohanic E., Kortebi M. To be cytosolic or vacuolar. The double life of *Listeria monocytogenes*. Front Cell Infection Microbiol. 2018, 9:136. doi: 10.3389/fcimb.2018.00136.
6. Campbell-Valois F.X., Sachse M., Sansonetti P.J., Parsot C. Escape of actively secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3- positive vacuoles formed during cell-to-cell spread is facilitated by IcsB and VirA. MBio. 2015, 6: e02567-e2514. doi:10.1128/mBio.02567-14.
7. Campellone K.G., Welch M.D. A molecular arms race: cellular control of action assembly. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010, 11: 237-251. doi:10.1038/nrm2867.
8. Castaneda-Roldan E.I., Avelino-Flores F., Dall'Agnoli M. et al. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. Cell Microbiol. 2004, 6:435-445.
9. Celli J., de Chastellier C., Franchini D.-M. et al. *Brucella* evades macrophages killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J. Exp. Med. 2003, 198: 545-556.
10. Dai V., Li Z. Conserved type III secretion system exerts important roles in *Chlamydia trachomatis*. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2014, 7(9): 5404-5414.
11. De Barsey M., Jamet A., Filopon D. et al. Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. Cell Microbiol. 2011, 13:1044-1058.

12. Delevoeye C., Nilges M., Dehoux P. et al. SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoSPathog.* 2008, 4: e1000022. doi:10.1371/journal.ppat.1000022.
13. Derivery E., Gautreau A. Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays* 2010, 32:119-131. doi:10.1002/bies.200900123.
14. Dohmer P.H., Valguanera E., Czibener C., Ugalde J.E. Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival. *Cell Microbiol.* 2014, 16:396-410. doi:10.3389/fcimb.2006.00079.
15. Dumoux M., Clare D.K., Sabibil H.R., Hayward R.D. Chlamydiae assemble a pathogen synapse to hijack the host endoplasmic reticulum. *Traffic*.2012, 13: 1612-1627.
16. Egile C., Loisel T.P., Laurent V. et al. Activation of the CDC42 effector N-WASP by Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J.Cell.Biol.* 1999, 146:1319-1332.
17. Elwell C., Mirrashidi K., Engel J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016 Jun; 14(6): 385-400. doi:10.1038/micro.2016.30.
18. Figueiredo P., Ficht Th. et al. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis. *Am. J. Pathol.* 2015, 185(6);1505-1517.
19. Goldberg M.B., Barzu O., Parsot C., Sansonetti P.J. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a Shigella flexneri protein involved in intracellular movement. *J.Bacteriol.* 1993, 175:2189-2196.
20. Gouin E., Egile C., Dehoux P. et al. The RickA protein of Rickettsia conorii activates the Arp2/3 complex. *Nature.* 2004, 427: 29. doi:10.1038/nature02318.
21. Haglund C.M., Choe J.E., Skau C.T. et al. Rickettsia Sca2 is a bacterial formin-like mediator of actin-based motility. *Nat. Cell Biol.* 2010, 12:10578-1063. doi: 10.1038/ncb2109.
22. Herve Agaisse. Molecular and Cellular Mechanisms of Shigella flexneri Dissemination. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2016, 6:29.
23. Huang Z., Chen M., Li K. et al. Cryo-electron tomography of Chlamydia trachomatis gives a clue to the mechanism of outer membrane changes. *J. Electron. Microsc. (Tokyo).* 2010, 59: 237-241.
24. Ireton K. Molecular mechanisms of cell-cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Open Biol.* 2013 Jul; 3(7) 130079. doi: 10.1098/rsob.130079.
25. Jiwani S., Ohr R.J., Fischer E.R. et al. Chlamydia trachomatis Tarp cooperates with the Arp2/3 complex to increase the rate of actin polymerization. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 2012, 420: 816-821.
26. Kleba B., Clark T.R., Lutter E.I. et al. Disruption of the Rickettsia rickettsii Sca2 autotransporter inhibits actin-based motility. *Infect. Immun.* 2010, 78:2240-2247. doi:10.1128/IAI.00100-10.
27. Kohler S., Foulongne V., Ouahrani-Bettache S. et al. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucellaisuis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99:15711-15716.
28. Kortebi M., Milohanec E., Mitchell G. et al. Listeria monocytogenes switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cell *Plos.Pathog.* 2017, nov 30; 13(11)e 1006734. doi: 10.1371/journal.ppat1006734.
29. Lamason R.L., Welch M.D. Actin-based motility and cell-to-cell spread of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017 Feb; 35: 48-57. doi:10.1016/j.mib.2016.11.007.
30. Lambrechts A., Gevaert K., Cossart P. et al. Listeria comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends Cell Biol.* 2008,18: 220-227.
31. Mattock E., Biocker A.J. How do the virulence factors of Shigella work together to cause disease? *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017,7:64.
32. Nans A., Ford C., Hayward R.D. Host-pathogen reorganization during host cell entry by Chlamydia trachomatis. *Microbes Infect.* 2015. Nov-Dec 17 (11-12): 727-731. doi:10.1016/Jmicr.2015.08.004.
33. Nickel W., Weber T., McNew J.A. et al. Content mixing and membrane integrity during membrane fusion driven by pairing of isolated v-SNAREs and t-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96:12571-12576. doi:10.1073/pnas.96.22.12571.
34. Ogawa M.T., Yoshimori T., Suzuki T. et al. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science.* 2005, Feb4, 307(5710):727-731. doi:10.1126/science/1106036.
35. Rana R.R., Zhang M., Spear A.M. et al. Bacterial TIR-containing proteins and host innate immune system evasion. *Med. Microbiol. Immunol.* 2013, 202:1-10.
36. Reed S.C.O., Lamason R.I., Risca V.I. et al. Rickettsia actin-based motility occurs in distinct phases mediated by different actin nucleators. *Curr. Biol.* 2014, 24: 98-103.

37. Roehrich-Doenitz A.D. Regulation of Type III Secretion Hierachy in *Shigella flexneri*. Ph.D.thesis. University of Bristol, 2013.
38. Roehrich-Doenitz A.D., Guillosoou E., Blocker A.J., Martinez-Argudo I. *Shigella* IpaD has a dual role: signal transduction from type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Mol. Microbiol.* 2013, 87:690-706. doi:10.1111/mmi.12124.
39. Rolan H.G. Tsohis R.M. Inactivation of the Tipe IV system reduces the Th1 polyrasation of immune responses to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immunol.* 2008, Jul, 76(7):3207-3213. doi:10.1128/IAI.00203-08.
40. Rossetti C.A., Drake K.L., Adams L.G. Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2012, 14:756-767.
41. Salcedo S.P., Marchesini M.I., Degos C. et al. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future Microbiol.* 2013, Oct. 8(10):1265-1288. doi:10.2217/fmb.13.102.
42. Saka H.A. et al. Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol. Microbiol.* 2011, 82: 1185-1203.
43. Lepidi H. et al. BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013, 3:28.
44. Schroeder G.N., Hilbi H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by Type III Secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, Jan; 21(1):134-156.
45. Snyder G.A., Deredge D., Waldhuber A. et al. Crystal structures of the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the *Brucella* protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry. *J. Biol. Chem.* 2014, 289:669-679.
46. Wang J., Zhang Y., Yu P., Zhong G. Immunodominant regions of *Chlamydia trachomatis* Type III secretion effector proteins, Tarp. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17: 1371-1376.
47. Weber M., Faris R. Subversion of the endocytic and secretory pathways by bacterial effector proteins. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2018, 6:1. doi. 10.3389/fcell.2018.00001.
48. West N.P., Sansonetti P., Mounier J. et al. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science.* 2005, 307,1313-1318. doi:10.1126/science.1108472.

Поступила 31.05.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*М.П.Костинов<sup>1,2</sup>, А.М.Костинов<sup>3</sup>, Д.В.Пахомов<sup>1</sup>, В.Б.Полищук<sup>1</sup>, А.М.Костинова<sup>4</sup>, А.Д.Шмитько<sup>1</sup>, А.А.Тарасова<sup>5</sup>*

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПНЕВМОКОККОВОЙ ВАКЦИНЫ У ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ И ИММУНОКОМПРОМЕНТИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова; <sup>2</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; <sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова; <sup>4</sup>ГНЦ Институт иммунологии, Москва; <sup>5</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, Н. Новгород

В статье приведён анализ многочисленных научных исследований, выполненных в России, по применению пневмококковой полисахаридной вакцины у иммунокомпетентных и иммунокомпроментированных пациентов. Новыми являются данные по оценке влияния вакцины на клинико-иммунологические аспекты при конкретной патологии у детей, что позволяет раскрыть механизмы, взаимосвязанные с эффективностью вакцинации.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 72—83

Ключевые слова: пневмококковая полисахаридная вакцина, пневмококковая инфекция, вакцинация