



Система секреции 4-го типа у *Clostridioides difficile*: структурные особенности и её роль как фактора патогенности

Сорокина Ю.В.[✉], Белый Ю.Ф.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Clostridioides difficile — грамположительный микроорганизм, вызывающий поражения стенки кишечника человека, которые проявляются клинически в виде антибиотикоассоциированной диареи и псевдомембранозного колита. Проблема инфекции *C. difficile* не теряет актуальности, а с распространением внутрибольничных вспышек и появлением внебольничных форм растёт потребность в новых видах её профилактики и лечения. Патогенез инфекции *C. difficile* связан с продукцией бактериями токсинов и большой группы иных белков, благоприятствующих размножению патогена в тканях макроорганизмов и его распространению в популяции людей. Исходя из исследований последних лет можно заключить, что высокой вирулентности *C. difficile* способствуют мобильные генетические элементы. Важнейшими компонентами этих элементов являются системы секреции 4-го типа (СС4Т), впечатляющее разнообразие которых среди грамположительных микроорганизмов вообще и *C. difficile* в частности говорит об их высокой эволюционной и, следовательно, медицинской значимости. Дальнейшее изучение состава и строения СС4Т позволит расширить понимание механизмов развития соответствующих инфекций и наметить патогенетически обоснованные подходы к профилактике и лечению заболеваний, вызываемых *C. difficile*. С другой стороны, ключевые компоненты секреторного аппарата патогена могут быть использованы для биоинформационного анализа и поиска новых адаптивных кластеров в геноме высоковирулентных штаммов.

Ключевые слова: система секреции 4-го типа, факторы патогенности, *Clostridioides difficile*, конъюгативные транспозоны, антибиотикоустойчивые штаммы

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Сорокина Ю.В., Белый Ю.Ф. Система секреции 4-го типа у *Clostridioides difficile*: структурные особенности и её роль как фактора патогенности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(4):345–353.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-386>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rpsjli>

Review

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-386>

Type 4 secretion system in *Clostridioides difficile*: Structural features and its role as a pathogenicity factor

Julya V. Sorokina[✉], Yury F. Belyi

Gamaleya Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Clostridioides difficile is a gram-positive microorganism causing damage to the human intestinal wall, clinically manifesting as antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. *C. difficile* infection remains a serious problem; the increasing frequency of nosocomial outbreaks and the emergence of community-acquired forms heighten the need for new prevention and treatment methods. The pathogenesis of *C. difficile* infection is associated with the toxins produced by bacteria and a large group of proteins promoting the replication of the pathogen in host tissues and its spread in the human population. Recent studies show that mobile genetic elements play a key role in the high virulence of *C. difficile*. Type 4 secretion systems (T4SS) are significant components of these ele-

ments; their impressive diversity among gram-positive microorganisms in general and in *C. difficile*, in particular, implies their high evolutionary and, consequently, medical significance. Further studies of the T4SS composition and structure will provide a deeper insight into mechanisms underlying the development of respective infections and will help outline pathogenically grounded approaches to prevention and treatment of diseases caused by *C. difficile*. On the other hand, the key components of the secretion machinery of the pathogen can be used in bioinformatic analysis and for searching new adaptive clusters in the genome of highly virulent strains.

Keywords: type 4 secretion system, pathogenicity factors, *Clostridioides difficile*, conjugative transposons, antibiotic-resistant strains

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Sorokina Ju.V., Belyi Yu.F. Type 4 secretion system in *Clostridioides difficile*: Structural features and its role as a pathogenicity factor. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(4):345–353.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-386>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rpsjli>

Введение

Clostridioides difficile — грамположительный подвижный спорообразующий микроорганизм, вызывающий поражения кишечника человека — антибиотикоассоциированную диарею и колиты разной степени тяжести [1–3]. Патогенность *C. difficile* определяется способностью возбудителя вырабатывать хотя бы один из двух гликозилирующих токсинов: TcdA и TcdB [4, 5], а также бинарный токсин (CDT), хотя роль последнего остаётся менее понятной [6–8]. Тяжесть течения заболевания, возможность развития его осложнений и переход в хронические формы, а также возникновение новых эндемичных штаммов зачастую связывают с дополнительными факторами, которые отвечают за адгезивные функции [9], спорообразование [10], формирование биоплёнок [11], модификацию клеточной стенки [12, 13] и транскрипцию [14–16]. Кроме этого, большую роль в патогенезе инфекции *C. difficile* играют белки систем чувства кворума (от англ. quorum-sensing) [17, 18], регулирующих, помимо прочего, уровень продукции токсинов [19], а большая группа генов резистентности к антибиотикам обуславливает беспрепятственное развитие инфекции при лечении заболевания антибактериальными препаратами [20–23].

Относительно недавно в геномах штаммов *C. difficile* были обнаружены нуклеотидные последовательности, предположительно кодирующие компоненты системы секреции 4-го типа (CC4T) [24]. Данный секреторный аппарат играет ключевую роль в патогенезе инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями *Agrobacterium tumefaciens* [25], *Legionella pneumophila* [26], *Helicobacter pylori* и др. [27]. В то же время связь CC4T с патогенезом заболеваний, вызываемых грамположительными возбудителями, только начинает привлекать внимание микробиологов [28–31]. Уже сейчас становится ясно, что изучение структуры и функции секретор-

ного аппарата этой группы бактерий представляется важным не только для расшифровки инфекционных процессов, но и для создания средств терапии и профилактики заболеваний [28, 30]. В нашем обзоре мы постарались раскрыть особенности организации CC4T *C. difficile* класса С, чтобы наметить направления и перспективы её дальнейших исследований.

Система секреции 4-го типа у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов

CC4T представляет собой многокомпонентную трансмембранную белковую структуру, которая участвует в доставке токсических эффекторов в клетку-мишень [25], горизонтальном транспорте мобильных генетических элементов (МГЭ) между микроорганизмами [23] и в обмене ДНК с внешней средой [27]. По строению секреторные аппараты 4-го типа разделяют на три класса: А, В и С (CC4T-А, CC4T-В, CC4T-С соответственно) [32, 33]. Последний встречается исключительно у грамположительных бактерий и входит в состав элементов конъюгативного переноса ДНК: плазмид, интегративных и конъюгативных элементов и островков патогенности [33–35].

Прототипом секреторного аппарата 4-го типа является CC4T-А грамотрицательного фитопатогена *A. tumefaciens* (рис. 1, а). Она получила название VirB/VirD4 и состоит из 12 субъединиц [25]. В её состав входят цитоплазматические АТФазы (VirD4, VirB4, VirB11), которые снабжают энергией транслокационный процесс и первыми связываются с эффекторными молекулами [36], компоненты комплексов внутренней (VirB3, VirB6, VirB8) и наружной (VirB7, VirB9, VirB10) мембран, формирующие трансмембранный канал [25], а также структурные белки пилей (VirB1, VirB2, VirB5) [37]. Такой секреторный аппарат успешно транспортирует в

растительную клетку фрагмент Ti-плазмиды, запускающий опухольные процессы в эукариотической клетке [25], и ряд вспомогательных белков [38, 39]. Обе группы молекул способствуют развитию опухолевидных образований у растений («галлов»), в которых в дальнейшем происходит пролиферация бактериальных клеток [25]. СС4Т-А связывают с вирулентностью не только фитопатогенов [40], но и патогенов человека. Так, у *Helicobacter pylori* эффекторные молекулы СС4Т-А запускают провоспалительный ответ в эпителиальных клетках желудка [41] и обуславливают неконтролируемое деление клеток хозяина [42].

В отличие от СС4Т-А *A. tumefaciens*, секреторные системы В-типа доставляют в эукариотические клетки-мишени преимущественно белковые эффекторы [43] и определяют патогенез таких заболеваний, как болезнь легионеров [26] и лихорадка Ку [44, 45]. Среди СС4Т-В граммотрицательных бактерий наиболее изученным является секреторный аппарат Dot/Icm у *L. pneumophila* — внутриклеточного патогена и возбудителя легионеллёза. Он участвует в транспорте свыше 300 эффекторных молекул, лишь небольшая часть которых охарактеризована. Последние участвуют в формировании специализированных «репликативных» фагосом в эукариотических клетках [46] и нарушают жизнедеятельность клетки-хозяина [47, 48], способствуя внутриклеточной пролиферации легионелл [49].

Конъюгативные СС4Т-С грамположительных микроорганизмов схожи по строению с вышеописанными системами и включают гомологи соответствующих субъединиц [33]. Так, плазида рIP501 *Enterococcus* sp. (рис. 1, б) содержит;

- релаксазу TraA (необходима для образования одноцепочечного фрагмента ДНК);
- гидролазу TraG (гомолог VirB1), которая должна разрушать связи в пептидогликане при формировании секреторного аппарата;
- белки, формирующие канал через клеточную стенку — TraL (гомолог VirB6), TraM и TraN (последние два — предположительно гомологи VirB8);
- АТФазы TraE и TraJ (гомологи VirB4 и VirD4, соответственно) [50–52].

Из-за отсутствия наружной мембраны у грамположительных микроорганизмов секреторный аппарат СС4Т-С может быть представлен так называемыми «минимизированными» структурами, образованными только 4–7 субъединицами [34, 35] вместо 12 у *A. tumefaciens* [25] или 27 у *L. pneumophila* [53].

Если у граммотрицательных бактерий СС4Т прочно ассоциируется с патогенезом инфекций, то в грамположительных бактериях этот тип секреторного аппарата преимущественно рассматривают в качестве участника конъюгативных процес-

сов и, как следствие, фактора распространения генов антибиотикоустойчивости (плазмиды рCW3 *Clostridium perfringens*, рIP501 *Enterococcus* sp. и др.) [51, 52, 54]. Однако можно предположить, что, по аналогии с секреторными системами *A. tumefaciens* и *H. pylori*, грамположительные бактерии способны использовать аппарат СС4Т как для доставки одноцепочечных молекул ДНК, так и для транслокации молекул, способствующих развитию инфекционных процессов, что уже подтверждается отдельными исследованиями. Обнаружено, что адгезины, секретируемые СС4Т-С плазмиды рCF10 *Enterococcus faecalis*, способствуют образованию биоплёнок и повышают вирулентность энтерококка [30]. Другим примером участия СС4Т-С в патогенезе инфекционных заболеваний являются данные о связи геномного островка патогенности Sp1 *Streptococcus suis* со вспышками синдрома токсического шока 1998 и 2005 гг. [55, 56]. В состав Sp1, который определяет адаптивные и вирулентные свойства стрептококка, входят гомологи только 4 генов СС4Т: *VirB1*, *VirB4*, *VirD4* и *VirB6* [56, 57]. Несмотря на простое строение, такая минимизированная секреторная система сохраняет свои функциональные свойства и не только вовлечена в конъюгативный перенос островка патогенности, но и непосредственно определяет вирулентность *S. suis* [28, 29]. Таким образом, секреция белковых факторов вирулентности и транслокация МГЭ СС4Т-С свидетельствуют в пользу участия данного аппарата в патогенезе инфекций, вызываемых грамположительными микроорганизмами, как это было показано ранее для граммотрицательных бактерий.

СС4Т-С у *C. difficile*

Несмотря на потенциальную значимость в патогенезе инфекции, СС4Т-С у *C. difficile* остаётся малоизученной [24, 58]. До сих пор не определён точный состав секреторного аппарата. Помимо ранее выделенных генов *VirD4*, *VirB6* и *VirB4* [24] с использованием биоинформационного анализа мы обнаружили ген, предположительно кодирующий гомолог VirB1 во всех трех конъюгативных транспозонах: CTn4, CTn2 и CTn5 (последние обозначены нами в данной статье CTn2/CTn5) [31]. В состав конъюгативной части оперонов CTn у *C. difficile* также входят гены метилтрансферазы, релаксазы, хеликазы и топоизомеразы. Вероятнее всего, они кодируют компоненты релаксосомы (рис. 1, б), необходимой для образования транспортируемых одноцепочечных молекул ДНК и её передачи секреторному аппарату, как это происходит при участии белка VirD2 *A. tumefaciens* [25] и релаксазы TraA плазмиды рIP501 [51]. Остаётся открытым вопрос о принадлежности к СС4Т-С продукта гена конъюгативного транспозона CD630_18580, который, согласно М. Bhattu и соавт. [34], является ортологом

адгезина рCF10 *E. faecalis* [30] и может, по аналогии с белком энтерококков, оказаться фактором вирулентности *C. difficile*.

Важнейшими компонентами СС4Т бактерий являются белки VirB4 и VirD4, принимающие участие в транслокации в качестве источника энергии для транспорта биомолекул. Обе АТФазы относятся к консервативным белкам секреторного аппарата [58, 59] и, как следствие, являются оптимальными объектами для таксономических исследований [60]. Так, филогенетический анализ последовательностей VirB4- и VirD4-подобных АТФаз позволяет достоверно определить, к какому семейству (А, В или С) относится СС4Т, включающая эти ферменты (рис. 2). Из-за различий в строении VirB4 и VirD4 *C. difficile* транспозонов СТn4 и СТn2/СТn5 оказываются в отдельных кладах, которые вместе с АТФазами островка патогенности *S. suis* формируют три таксономически важных группы внутри СС4Т-С, что может указывать на их различную функциональную значимость.

Единственная биохимическая работа, изучающая кластридиальный аппарат СС4Т и посвящённая данным белкам, была проведена недавно в нашей лаборатории [31]. Согласно нашим данным, оба фермента обладают Mg²⁺-зависимой АТФазной активностью, а максимальная скорость каталитической реакции достигается в присутствии ионов калия [31]. VirD4, но не VirB4 способна взаимодействовать с молекулами нуклеиновых кислот. Причём важную роль в этом взаимодействии играет трипофан-241, поскольку точечная замена W241A приводит к варианту белка, не способному адсорбировать ДНК [31]. VirB4 и VirD4 образуют олигомерные ферментативно-активные комплексы, а замена ключевых аминокислот в так называемых «Walker А» и «Walker В» мотивах, входящих в состав ферментативных доменов, не только снижает АТФазную активность, но и дестабилизирует олигомерный комплекс в целом [31]. Сходство обеих АТФаз с другими АТФазами СС4Т по аминокислотному строению (рис. 2), а также биохимическим и структурным особенностям [31] позволяет предположить, что данный секреторный аппарат способен транслоцировать белки, подобно системе секреции *S. suis* и *E. faecalis*. Однако эта гипотеза требует дополнительных подтверждений.

Наличие VirB4- и VirD4-подобных АТФаз у штамма 630 не является уникальным или единичным случаем. Для оценки частоты встречаемости АТФаз СС4Т-С среди представителей *C. difficile* оптимально подходят секвенированные аннотированные геномы, собранные до уровня хромосом. В базу данных NCBI для вида *C. difficile* на конец 2022 г. внесён 17 961 секвенированный геном¹,

92 из которых аннотированы и собраны до уровня хромосомы, а при исключении дублирующих вариантов установленным параметрам соответствуют 89 геномов (рис. 3). Половина таких геномов (45 штаммов) содержит АТФазы СС4Т-С в составе конъюгативных транспозонов, у остальных данные аминокислотные последовательности с помощью Blast-анализа не найдены [Сорокина и др., данные не опубликованы]. У 38 штаммов гены секреторного аппарата не повреждены (рис. 3), что может указывать на их функциональную активность. Только у *C. difficile* 630 присутствуют три варианта генов VirB4 и VirD4 АТФаз, расположенных в транспозонах СТn2, СТn4 и СТn5. В 10 геномах и *VirB4*, и *VirD4* найдены в 2 локусах (транспозонах), чаще всего каждый из генов представлен одной копией. Особую интересную для дальнейших исследований группу представляют АТФазы СС4Т, демонстрирующие низкую гомологию с АТФазами известных транспозонов СТn4 или СТn2/СТn5 (менее 80% идентичности). СС4Т-С, включающие подобные «новые» варианты АТФаз, практически не отличаются по организации от таковых у СТn4 или СТn2/СТn5, за исключением отдельных случаев появления между генами топоизомеразы и хеликазы гена с мотивами, свойственными белкам клеточной стенки (потенциальных факторов вирулентности) [61, 62]. Определить, насколько однородной является последняя группа при таком объёме выборки, не представляется возможным. В целом проведённый нами таксономический анализ позволяет не только выявить штаммы с АТФазами, принадлежащими к уже известным подгруппам (СТn4 или СТn2/СТn5), но и обнаружить совершенно новые варианты секреторного аппарата.

Выводы

Проблема инфекции *C. difficile* и в настоящее время не теряет актуальности, а с распространением внутрибольничных вспышек и появлением внебольничных форм растёт потребность в новых видах профилактики и лечения этого заболевания. Исходя из исследований последних лет можно заключить, что МГЭ способствуют высокой вирулентности *C. difficile*. Важнейшими компонентами МГЭ являются СС4Т, впечатляющее разнообразие которых среди грамположительных микроорганизмов вообще и *C. difficile* в частности говорит об их высокой эволюционной и, следовательно, медицинской значимости. Приспособленные вначале к переносу генов адаптивного ответа к неблагоприятным факторам среды, в дальнейшем СС4Т приобрели способность к осуществлению транспорта и белковых молекул — факторов вирулентности. Эти процессы убедительно показаны в работах по системам секреции патогенных грамотрицательных микроорганизмов. У грамположительных бактерий, в част-

¹ URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/1496/>

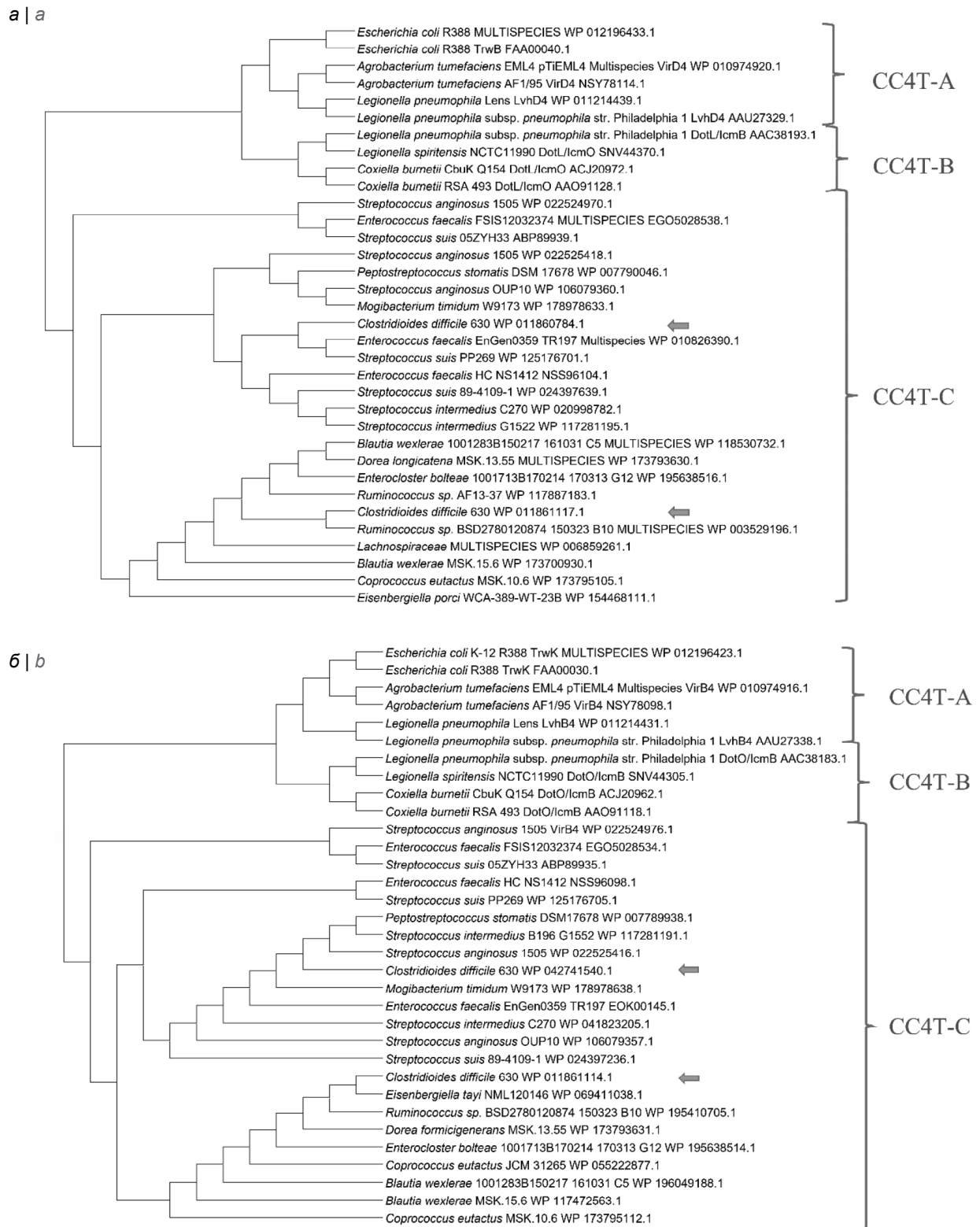


Рис. 2. Филогенетические деревья VirD4- (а) и VirB4-подобных (б) белков грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Зелёной стрелкой обозначены АТФазы СТn4, оранжевой — СТn2/5. Выравнивание проводили методом MAFFT и K-align, деревья строили по методу максимальной схожести по модели Blosum62 [31].

Fig. 2. Phylogenetic trees of VirD4- (a) and VirB4-like (b) proteins of gram-positive and gram-negative bacteria.

The green arrow indicates CTn4 ATPases; the orange arrow indicates CTn2/5. The alignment was performed using MAFFT and K-align tools; trees were constructed using the maximum likelihood method and the Blosum62 matrix [31].

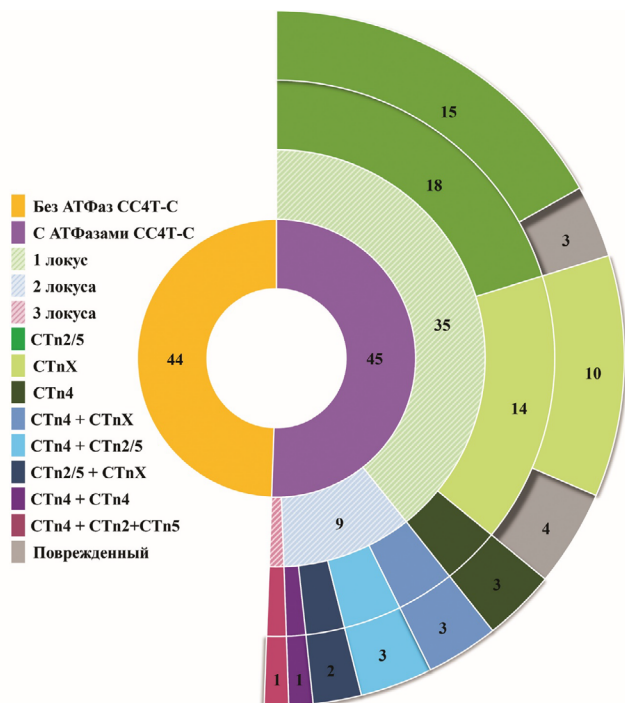


Рис. 3. Распределение VirB4 и VirD4 АТФаз СС4Т-С среди штаммов *C. difficile* с аннотированными геномами в базе данных NCBI.

АТФазы могли быть представлены в геноме в 1 (1 локус), 2 (2 локуса) или 3 (3 локуса) вариантах. В случае если аминокислотные последовательности были идентичны более чем на 87% WP_011861117.1 (VirD4_{СТn4}) и WP_011861114.1 (VirB4_{СТn4}), мы причисляли их к группе СТn4. Если обе последовательности были идентичны более чем на 87% WP_011860784.1 (VirD4_{СТn2/5}) и WP_042741540.1 (VirB4_{СТn2/5}), то их относили к группе СТn2/5. При меньших значениях АТФазы причисляли к группе СТnX. Повреждёнными считались аминокислотные последовательности без мотивов WalkerA или WalkerB, для которых доказано участие в формировании олигомерных комплексов и формирующего активного центра фермента.

Fig. 3. Distribution of VirB4 and VirD4 T4SS-C ATPases among *C. difficile* strains with annotated genomes in the NCBI database.

In genomes, ATPases could be present in 1 (1 locus), 2 (2 loci), or 3 (3 loci) variants. If amino acid sequences were more than 87% identical to WP_011861117.1 (VirD4_{СТn4}) and WP_011861114.1 (VirB4_{СТn4}), we assigned them to the СТn4 group. If both sequences were more than 87% identical to WP_011860784.1 (VirD4_{СТn2/5}) and WP_042741540.1 (VirB4_{СТn2/5}), they were assigned to the СТn2/5 group. At lower values, ATPases were assigned to the СТnX group. The amino acid sequences lacking Walker A or Walker B motifs, which participate in the formation of oligomeric complexes and constitute the active center of the enzyme, were seen as damaged.

ности у *C. difficile*, подобный тип участия МГЭ в патогенезе инфекционных заболеваний значительно менее изучен. Не определён состав секреторного аппарата, в который, помимо охарактеризованных АТФаз VirB4 и VirD4, а также белка трансмембранного канала VirB6, как мы предполагаем, входят гомолог VirB1, компоненты релаксомы и адгезины. Последние, будучи потенциальными факторами вирулентности, представляют особый интерес. Дальнейшая работа по изучению как состава и строения СС4Т-С в целом, так и её отдельных компонентов

может способствовать существенному прогрессу в понимании патогенеза соответствующих инфекций и разработке патогенетически обоснованных подходов к профилактике и лечению заболеваний, вызываемых *C. difficile*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Hall I.C., O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am. J. Dis. Child.* 1935;49(2):390.
DOI: <https://doi.org/10.1001/archpedi.1935.01970020105010>
- Riley T.V., Wymer V., Bamford V.W., Bowman R.A. *Clostridium difficile* in general practice and community health. *J. Hyg. (Lond.)*. 1986;96(1):13–7.
DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022172400062483>
- Guh A.Y., Mu Y., Winston L.G., et al. Trends in U.S. Burden of *Clostridioides difficile* infection and outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(14):1320–30.
DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1910215>
- Lyerly D.M., Saum K.E., MacDonald D.K., Wilkins T.D. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect. Immun.* 1985;47(2):349–52.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.47.2.349-352.1985>
- Orrell K.E., Melnyk R.A. Large clostridial toxins: mechanisms and roles in disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021;85(3):e0006421.
DOI: <https://doi.org/10.1128/mbr.00064-21>
- Popoff M.R., Rubin E.J., Gill D.M., Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect. Immun.* 1988;56(9):2299–306.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.56.9.2299-2306.1988>
- Aktorics K., Papatheodorou P., Schwan C. Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT) — a virulence factor disturbing the cytoskeleton. *Anaerobe*. 2018;53:21–9.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.001>
- Riedel T., Neumann-Schaal M., Wittmann J., et al. Characterization of *Clostridioides difficile* DSM 101085 with A–B–CDT+ phenotype from a late recurrent colonization. *Genome Biol. Evol.* 2020;12(5):566–77.
DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa072>
- Merrigan M.M., Venugopal A., Roxas J.L., et al. Surface-layer protein A (SlpA) is a major contributor to host-cell adherence of *Clostridium difficile*. *PLoS One*. 2013;8(11):e78404.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078404>
- Shen A. *Clostridioides difficile* spore formation and germination: new insights and opportunities for intervention. *Annu. Rev. Microbiol.* 2020;74(1):545–66.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-011320-011321>
- Taggart M.G., Snelling W.J., Naughton P.J., et al. Biofilm regulation in *Clostridioides difficile*: novel systems linked to hypervirulence. *PLOS Pathog.* 2021;17(9):e1009817.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009817>
- de la Riva L., Willing S.E., Tate E.W., Fairweather N.F. Roles of cysteine proteases Cwp84 and Cwp13 in biogenesis of the cell wall of *Clostridium difficile*. *J. Bacteriol.* 2011;193(13):3276–85. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00248-11>
- Coullon H., Candela T. *Clostridioides difficile* peptidoglycan modifications. *Curr. Opin. Microbiol.* 2022;65:156–61.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.11.010>
- McKee R.W., Harvest C.K., Tamayo R. Cyclic diguanylate regulates virulence factor genes via multiple riboswitches in *Clostridium difficile*. *mSphere*. 2018;3(5):e00423-18.
DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.00423-18>
- Buddle J.E., Fagan R.P. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*. 2023;14(1):2150452.
DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150452>

16. Androga G.O., Knight D.R., Hutton M.L., et al. *In silico*, *in vitro* and *in vivo* analysis of putative virulence factors identified in large clostridial toxin-negative, binary toxin-producing *C. difficile* strains. *Anaerobe*. 2019;60:102083. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.102083>
17. Lee A.S.Y., Song K.P. LuxS/autoinducer-2 quorum sensing molecule regulates transcriptional virulence gene expression in *Clostridium difficile*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;335(3):659–66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.131>
18. Okada Y., Okugawa S., Ikeda M., et al. Genetic diversity and epidemiology of accessory gene regulator loci in *Clostridioides difficile*. *Access Microbiol.* 2020;2(7):acmi.0.000134. DOI: <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000134>
19. Ahmed U.K.B., Shadid T.M., Larabee J.L., Ballard J.D. Combined and distinct roles of Agr proteins in *Clostridioides difficile* 630 sporulation, motility, and toxin production. *mBio*. 2020;11(6):e03190-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.03190-20>
20. Aguilar-Zamora E., Weimer B.C., et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in hospitalized patients from Mexico. *Front. Microbiol.* 2022;12:787451. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.787451>
21. Wen X., Shen C., Xia J., et al. Whole-genome sequencing reveals the high nosocomial transmission and antimicrobial resistance of *Clostridioides difficile* in a single center in China, a four-year retrospective study. 2021;10(1):e01322-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01322-21>
22. Darkoh C., Keita K., Odo C., et al. Emergence of clinical *Clostridioides difficile* isolates with decreased susceptibility to vancomycin. *Clin. Infect. Dis.* 2022;74(1):120–6. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa912>
23. Launay A., Ballard S.A., Johnson P.D., et al. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn1549 from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(3):1054–62. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.50.3.1054-1062.2006>
24. Zhang W., Cheng Y., Du P., et al. Genomic study of the type IVC secretion system in *Clostridium difficile*: understanding *C. difficile* evolution via horizontal gene transfer. *Genome*. 2017;60(1):8–16. DOI: <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0053>
25. Li Y.G., Christie P.J. The agrobacterium VirB/VirD4 T4SS: mechanism and architecture defined through *in vivo* mutagenesis and chimeric systems. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018;418:233–60. DOI: https://doi.org/10.1007/82_2018_94
26. Böck D., Hüsler D., Steiner B., et al. The polar *Legionella* Icm/Dot T4SS establishes distinct contact sites with the pathogen vacuole membrane. *mBio*. 2021;12(5):e0218021. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.02180-21>
27. Grohmann E., Christie P.J., Waksman G., Backert S. Type IV secretion in gram-negative and gram-positive bacteria: type IV secretion. *Mol. Microbiol.* 2018;107(4):455–71. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>
28. Zhao Y., Liu G., Li S., et al. Role of a type IV-like secretion system of *Streptococcus suis* 2 in the development of streptococcal toxic shock syndrome. *J. Infect. Dis.* 2011;204(2):274–81. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir261>
29. Zhong Q., Zhao Y., Chen T., et al. A functional peptidoglycan hydrolase characterized from T4SS in 89K pathogenicity island of epidemic *Streptococcus suis* serotype 2. *BMC Microbiol.* 2014;14:73. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-73>
30. Bhatti M., Cruz M.R., Frank K.L., et al. *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance), and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation, and virulence. *Mol. Microbiol.* 2015;95(4):660–77. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.12893>
31. Sorokina J., Sokolova I., Rybolovlev I., et al. VirB4- and VirD4-like ATPases, components of a putative type 4C secretion system in *Clostridioides difficile*. *J. Bacteriol.* 2021;203(21):e00359-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00359-21>
32. Backert S. Erratum to: Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2017;413:E1. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-75241-9_14
33. Zhang W., Rong C., Chen C., Gao G.F. Type-IVC secretion system: a novel subclass of type IV secretion system (T4SS) common existing in gram-positive genus *Streptococcus*. *PLoS One*. 2012;7(10):e46390. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046390>
34. Bhatti M., Laverde Gomez J.A., Christie P.J. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res. Microbiol.* 2013;164(6):620–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.03.012>
35. Wang J., Feng Y., Wang C., et al. Pathogenic *Streptococcus* strains employ novel escape strategy to inhibit bacteriostatic effect mediated by mammalian peptidoglycan recognition protein. *Cell. Microbiol.* 2017;19(7). DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12724>
36. Das A. Identification of a carboxy-terminal glutamine-rich domain in *Agrobacterium tumefaciens* coupling protein VirD4 required for recognition of T-Strand DNA and Not VirE2 as a substrate for transfer to plant cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2020;33(2):166–72. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi-04-19-0099-r>
37. Amro J., Black C., Jemouai Z., et al. Cryo-EM structure of the *Agrobacterium tumefaciens* T-pilus reveals the importance of positive charges in the lumen. *Structure*. 2023;31(4):375–84.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.str.2022.11.007>
38. Roushan M.R., de Zeeuw M.A.M., Hooykaas P.J.J., van Heusden G.P.H. Application of phiLOV2.1 as a fluorescent marker for visualization of *Agrobacterium* effector protein translocation. *Plant J.* 2018;96(3):685–99. DOI: <https://doi.org/10.1111/tj.14060>
39. Чумаков М.И., Мазиллов С.И., Гусев Ю.С., Волохина И.В. Исследование способности агробактериального белка VirE2 к образованию пор в мембранах. *Биологические мембраны*. 2010;27(5):449–54. Chumakov M.I., Mazilov S.I., Gusev Yu.S., Volokhina I.V. Study of the ability of agrobacterial protein VirE2 to form pores in membranes. *Biological Membranes*. 2010;27(5):449–54. EDN: <https://www.elibrary.ru/mvskun>
40. Дюбо Ю.В., Николайчик Е.А. Модификация вирулентных свойств *Pectobacterium atrosepticum* конъюгативной плазмидой рРА21А. *Молекулярная и прикладная генетика*. 2018;24:37–44. Dyubo Yu.V., Nikolaichik E.A. Modification virulent properties of *Pectobacterium atrosepticum* by conjugative plasmid PPA21A. *Molecular and Applied Genetics*. 2018;24:37–44. EDN: <https://www.elibrary.ru/hgoxko>
41. Pfannkuch L., Hurwitz R., Traulsen J., et al. ADP heptose, a novel pathogen-associated molecular pattern identified in *Helicobacter pylori*. *FASEB J.* 2019;33(8):9087–99. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.201802555r>
42. Zhang X., Li C., Chen D., et al. *H. pylori* CagA activates the NLRP3 inflammasome to promote gastric cancer cell migration and invasion. *Inflamm. Res.* 2022;71(1):141–55. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01522-6>
43. Allombert J., Jaboulay C., Michard C., et al. Deciphering *Legionella* effector delivery by Icm/Dot secretion system reveals a new role for c-di-GMP signaling. *J. Mol. Biol.* 2021;433(13):166985. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166985>
44. Beare P.A., Gilk S.D., Larson C.L., et al. Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. *mBio*. 2011;2(4):e00175-11. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00175-11>
45. Clemente T.M., Augusto L., Angara R.K., Gilk S.D. *Coxiella burnetii* actively blocks IL-17-induced oxidative stress in macrophages. *bioRxiv*. 2023;2023.03.15.532774. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.03.15.532774>

ОБЗОРЫ

46. Luo J., Wang L., Song L., Luo Z.Q. Exploitation of the host ubiquitin system: means by *Legionella pneumophila*. *Front. Microbiol.* 2021;12:790442.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.790442>
47. Тартаковская Д.И. Эукариотические мишени цитотоксической глюкозилтрансферазы *Legionella pneumophila*. *Инфекция и иммунитет.* 2012;2(1-2):325. Tartakovskaya D.I. Eukaryotic targets of cytotoxic glucosyltransferase *Legionella pneumophila*. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2012;2(1-2):325.
48. Levanova N., Steinemann M., Böhmer K.E., Schneider S., et al. Characterization of the glucosyltransferase activity of *Legionella pneumophila* effector SetA. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2019;392(1):69–79.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1562-9>
49. Liu L., Roy C.R. The *Legionella pneumophila* effector RavY contributes to a replication-permissive vacuolar environment during infection. *Infect. Immun.* 2021;89(12):e0026121.
DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00261-21>
50. Kurenbach B., Bohn C., Prabhu J., et al. Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its tra region. *Plasmid.* 2003;50(1):86–93.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(03\)00044-1](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(03)00044-1)
51. Abajy M.Y., Kopeć J., Schiwon K., et al. A type IV-secretion-like system is required for conjugative DNA transport of broad-host-range plasmid pIP501 in Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 2007;189(6):2487–96.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.01491-06>
52. Kohler V., Vaishampayan A., Grohmann E. Broad-host-range Inc18 plasmids: occurrence, spread and transfer mechanisms. *Plasmid.* 2018;99:11–21.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.06.001>
53. Durie C.L., Sheedlo M.J., Chung J.M., et al. Structural analysis of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm type IV secretion system core complex. *eLife.* 2020;9:e59530.
DOI: <https://doi.org/10.7554/elife.59530>
54. Revitt-Mills S.A., Watts T.D., Lyras D., et al. The ever-expanding tcp conjugation locus of pCW3 from *Clostridium perfringens*. *Plasmid.* 2021;113:102516.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2020.102516>
55. Tang J., Wang C., Feng Y., et al. *Streptococcal* toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med.* 2006;3(5):e151. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030151>
56. Li M., Wang C., Feng Y., et al. SalK/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS One.* 2008;3(5):e2080.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002080>
57. Li M., Shen X., Yan J., et al. GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2: T4SS-mediated transfer of 89K PAI in *S. suis* 2. *Mol. Microbiol.* 2011;79(6):1670–83.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07553.x>
58. Li N., Jia H., Yang H., et al. Preliminary screening of type IV secretion system in divergent geographic sources of *Clostridium difficile*. *Exp. Ther. Med.* 2017;14(5):4405–10.
DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5065>
59. Whitaker N., Berry T.M., Rosenthal N., et al. Chimeric coupling proteins mediate transfer of heterologous type IV effectors through the *Escherichia coli* pKM101-encoded conjugation machine. *J. Bacteriol.* 2016;198(19):2701–18.
DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00378-16>
60. Fernández-López R., Garcillán-Barcia M.P., Revilla C., et al. Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006;30(6):942–66.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00042.x>
61. Tulli L., Marchi S., Petracca R., et al. CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen: collagen binding protein of *Clostridium difficile*. *Cell. Microbiol.* 2013;15(10):1674–87.
DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12139>
62. Malik A., Shoombuatong W., Kim C.B., Manavalan B. GPAPred: The first computational predictor for identifying proteins with LPXTG-like motif using sequence-based optimal features. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;229:529–38.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.315>

Информация об авторах

Сорокина Юлия Валерьевна[✉] — н.с. отдела бактериальных инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, yv_sorokina@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0002-1869-742X>

Белый Юрий Федорович — д.м.н., рук. отдела бактериальных инфекций НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2312-1465>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 28.03.2023;
принята к публикации 15.07.2023;
опубликована 28.08.2023

Information about the authors

Julya V. Sorokina[✉] — researcher, Department of bacterial infections, Gamaleya Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, yv_sorokina@gamaleya.org, <https://orcid.org/0000-0002-1869-742X>

Yuriy F. Belyi — D. Sci. (Med.), Head. Department of bacterial infections, Gamaleya Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2312-1465>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 28.03.2023;
accepted for publication 15.07.2023;
published 28.08.2023