

Т.И. Карпова, Б.И. Маракуша, Т.П. Сапенко, И.С. Тартаковский, J.A. Vazquez-Boland, С.А. Ермолаева

Эффект конститутивной активности генов патогенности на вирулентность *Listeria monocytogenes*

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи
РАМН
Ветеринарный факультет, Университет Бристоля, Великобритания

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, PrfA, вирулентность, экспериментальный листериоз

Широко-распространенная в окружающей среде грам-положительная бактерия *Listeria monocytogenes* вызывает у людей тяжелое заболевание, известное под названием листериоз. Заражение листериями связано преимущественно с употреблением в пищу контаминированных продуктов питания. Тяжесть клинических манифестаций (бактеремии, менингиты, аборты) и высокая летальность, достигающая в эпидемических вспышках 25-35%, ставит *L. monocytogenes* на одно из важнейших мест среди возбудителей пищевых инфекций, не смотря на то, что частота встречаемости листериоза существенно уступает сальмонеллезам и кампилобактериозам (для обзора см. [2; 13]).

Попадая в организм человека с контаминированными продуктами, *L. monocytogenes*, в отличие от большинства других возбудителей пищевых инфекций, не задерживается надолго в кишечнике, а через кровяное русло быстро распространяется во внутренние органы, прежде всего печень и селезенку. Генерализация инфекции связана с размножением внутри этих органов и дальнейшей диссеминацией листерий, в ходе которой они способны преодолевать гематоэнцефалический и плацентарный барьеры, приводя к развитию, соответственно, менингитов, менингоэнцефалитов, и абортов и мертворождений.

Развитие листериозной инфекции обуславливается способностью *L. monocytogenes* к внутриклеточному паразитизму. Попав в клетку-хозяин путем фагоцитоза, листерия быстро разрушает фагосомальную мембрану и выходит из фагосомы в цитоплазму, где эффективно размножается. После выхода в цитоплазму *L. monocytogenes* индуцирует образование вокруг себя оболочки из актиновых микрофиламентов, которые затем перестраиваются в форме кометообразного хвоста. В результате наращивания этого хвоста за счет непрерывной полимеризации F-актина *L. monocytogenes* перемещается внутри клетки-хозяина, а достигнув цитоплазматической мембраны, способна индуцировать образование выпячивания, псевдоподоподобной структуры. Когда такая структура достигает соседней эукариотической клетки, она индуцирует собственный захват, и, в результате, бактерия оказывается внутри соседней клетки, окруженная двойной мембраной. Лизис двойной мембраны и последующий выход в цитоплазму

являются началом нового цикла инфекции [для обзора см. 2; 13]. Таким образом, характерной чертой внутриклеточного размножения листерий является распространение из одной клетки-хозяина в другую без покидания внутриклеточного пространства.

Ряд секретируемых и поверхностных бактериальных белков необходим на разных стадиях инфекционного процесса. К ним относятся белки InlA и InlB, необходимые в процессе инвазии; гемолизин листерий, листериолизин О (ЛЛО); две фосфолипазы класса Ц, специфичная к фосфатидил-инозитолу (PI-PLC), и широкого спектра действия (PC-PLC); актин-полимеризующий белок ActA). Гены, кодирующие перечисленные факторы патогенности, формируют несколько оперонов на хромосоме *L. monocytogenes*.

Координированная экспрессия генов патогенности достигается благодаря активности белка PrfA, полностью или частично контролирующего инициацию транскрипции всех перечисленных генов через связывание с их промоторными областями [10]. Белок PrfA относится к CRP-Fng семейству регуляторов транскрипции и имеет значительную степень гомологии с прототипом этого семейства, регулятором генов катаболизма в *E. coli* CRP [8]. Для регуляторных белков данного семейства характерна возможность существования в двух функциональных состояниях: активном и неактивном [9]. Для PrfA существование активного и неактивного состояния вначале было предположено, а затем были представлены экспериментальные доказательства [5]. Когда PrfA находится в неактивном состоянии, экспрессия генов патогенности практически полностью прекращается [5; 11]. PrfA может быть переведен в конститутивно активную форму в результате единичной аминокислотной замены, в результате чего уровень экспрессии контролируемых PrfA генов увеличивался в 100-1000 раз [6; 11; 12; 14].

При выращивании *L. monocytogenes* *in vitro* на богатых питательных средах активность PrfA дикого типа репрессирована, и соответственно, уровень продукции факторов патогенности низкий, вплоть до не выявляемого [1; 6]. Ранее нами были установлены условия, которые позволяют перевести PrfA в активную форму при выращивании *in vitro*: эти условия включают добавление в среду культивирования некоторых адсорбентов (например, активированного угля) [1; 4; 11]. Механизм репрессии активности PrfA до конца не изучен, однако имеющиеся данные предполагают, что он

связан с секрецией самими листериями продукта, названного нами авторепрессором, присутствие которого в среде культивирования негативно влияет на активность PrfA [5]. Присутствие адсорбента необходимо для устранения авторепрессора из среды культивирования. Уровень продукции факторов патогенности штаммом дикого типа, выращенным в активирующих условиях, сравним с уровнем, демонстрируемым штаммом, несущим PrfA с заменой Gly145Ser и аналогичными мутациями [6; 11].

Значительный интерес представляет собой вопрос о роли негативной регуляции активности PrfA в процессе инфекции. Ряд методических подходов был использован для сравнительного анализа уровня экспрессии факторов патогенности *in vivo* и *in vitro*. Существенное увеличение экспрессии всех PrfA регулируемых генов в процессе инфицирования культур эукариотических клеток наблюдалось при выделении суммарной РНК внутриклеточных бактерий [3]. Изучение в изменении уровня активности гена *actA* на разных этапах взаимодействия с клеткой-хозяином у отдельных бактерий было проведено путем наблюдения с помощью электронного микроскопа флуоресценции репортерного белка Gfp (green fluorescent protein из *Aequorea victoria*), ген которого был помещен под промотор P_{actA} [7]. Эта работа продемонстрировала, что активность отдельных генов зависит от компартмента клетки-хозяина, в котором находится бактерия. Т.к. ген *actA* находится под контролем PrfA, приведенные данные свидетельствуют в пользу того, что активность PrfA подвергается негативной регуляции и в процессе инфекции. Можно предположить, что штаммы, у которых негативная регуляция невозможна, например, из-за конститутивной активности PrfA в результате мутации, будут отличаться по своим вирулентным свойствам от штаммов дикого типа. Изучение этих различий и было проведено в данной работе.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. В работе были использованы штаммы *L. monocytogenes* P14 и P14A [22]. *L. monocytogenes* культивировали на среде Brain Heart Infusion (Difco), при 37°C с ротацией при 185 об/мин.

Определение гемолитической и лецитиназной активности. Гемолитическую активность в супернатанте ночной культуры *L. monocytogenes* определяли по лизису 5%

взвеси эритроцитов человека в 0.15M NaCl, и выражали в произвольных единицах, соответствующих последнему из двухкратных разведений супернатанта, в котором был замечен лизис. Лецитиназную активность в супернатанте ночной культуры *L. monocytogenes* определяли по гидролизу 0,7 % эмульсии фосфатидилхолина (ICN) в буфере, содержащем 2 % дезоксихолат натрия, 0.15 M NaCl и 1мМ ZnCl₂, и выражали в произвольных единицах, соответствующих OD₅₇₅x10, где OD₅₇₅ – это поглощение при длине волны 575 нм реакционной смеси после инкубирования при 37°C в течение 24 часов. Лецитиназную активность при выращивании на агаризованной среде, содержащей в качестве источника лецитина желток куриного яйца, определяли по появлению помутнения, связанного с гидролизом лецитина как описано в [6].

Определение вирулентности. Мыши линии BALB/c весом 14-16 г. были заражены внутрибрюшинно суспензией клеток *L. monocytogenes* в 0.15M NaCl, полученных из экспоненциальной культуры, выращенной в среде ВНИ при 37°C и хранящейся при -70°C в 10% глицерине до момента использования. Непосредственно перед заражением суспензия клеток *L. monocytogenes* была дважды отмыта от глицерина в 0.15M NaCl, и концентрация была определена высевом соответствующих разведений на плотную среду ВНИ. Для определения LD₅₀ животные были заражены суспензией бактериальных клеток (по 0.5 мл) в дозах 10⁴ – 10⁸ КОЕ/мышь. Наблюдение проводилось в течение 14 дней. Для определения динамики размножения во внутренних органах группа мышей была инфицирована тем же способом, сублетальной концентрацией клеток *L. monocytogenes* 4x10⁴ КОЕ/мышь, выбранной на основе опытов по определению LD50. В день заражения, а также на 1,4,5,7 и 10-е сутки группы из 3-4 мышей усыпляли с помощью эфира, готовили суспензии печени и селезенки асептически вскрытых животных в 5 мл 0.15M NaCl. Далее делали высевы на ВНИ агар последовательных 10-кратных разведений для подсчета КОЕ.

Результаты и обсуждение

*Характеристика регуляции экспрессии факторов патогенности у штаммов *L. monocytogenes*, использованных в работе.*

В данной работе был использован штамм *L. monocytogenes* P14A, имеющий замену Gly145Ser в результате спонтанной мутации, и, соответственно, отличающийся от

родительского штамма P14 только данной заменой [11]. Для характеристики регуляции экспрессии факторов патогенности у использованных в данной работе штаммов мы провели сравнение уровня продукции двух секретируемых факторов патогенности *L. monocytogenes*, экспрессия которых контролируется PrfA, листериолизина O (ЛЛО), и фосфолипазы широкого спектра действия PC-PLC. Уровень продукции определяли по энзиматической активности, характерной для этих белков: гемолитической активности, проявляемой ЛЛО, и лецитиназной активности, результатом действия PC-PLC. При выращивании в жидкой среде ВНІ лецитиназная активность у штамма дикого типа не выявлялась, в то время как активность мутантного штамма P14А достигала 25 условных единиц (рис.1А, Б). Приблизительно той же величины достигала лецитиназная активность штамма дикого типа, выращенного в активирующих условиях, в присутствии 0.2% активированного угля (среда ВНІС) (рис.1А). Уровень гемолитической активности штамма P14А превышал уровень гемолитической активности штамма дикого типа более чем в 10 раз (рис. 1А, Б). Выращивание в среде ВНІС приводило к 30-кратному увеличению уровня гемолитической активности у штамма P14, но лишь незначительно влияло на штамм P14А (рис. 1А). Таким образом, продукция факторов патогенности штаммом дикого типа P14 подвергалась негативной регуляции, зависящей от внешних условий, в то время как продукция факторов патогенности штаммом P14А являлась конститутивной.

То, что замена Gly145Ser приводит к конститутивной активности PrfA, было также документировано в работах других групп, т.к. по невыясненным причинам практически все спонтанные мутанты *L. monocytogenes*, гиперпродуцирующие факторы патогенности, имеют именно эту мутацию [11; 12]. В экспериментах по защите от действия нуклеаз и по измерению электрофоретической подвижности ДНК было, в частности, показано, что очищенный мутантный белок PrfA (Gly145Ser) в 10-12 раз более активно по сравнению с PrfA дикого типа связывается с промоторной областью гена *hly*, кодирующего ЛЛО [14]. Взятые вместе, полученные данные и результаты работ других групп подтверждают, что белок PrfA с заменой Gly145Ser отличается конститутивной активностью, а

использованный нами штамм P14A характеризуется конститутивной продукцией факторов патогенности.

Влияние конститутивной экспрессии факторов патогенности на вирулентность L. monocytogenes на модели внутрибрюшинного заражения мышей

Вирулентные свойства штаммов с функциональными изменениями в результате замен в последовательности PrfA изучались преимущественно на моделях культур эукариотических клеток. Было установлено, что замены, приводящие к увеличенной продукции факторов патогенности *in vitro*, увеличивают инвазивность, т.е. эффективность интернализации бактерий путем фагоцитоза [12]. Дальнейшие, после первичной инфекции, начальные этапы внутриклеточного размножения штаммов, конститутивно экспрессирующих факторы патогенности, по-видимому, схожи с поведением штамма дикого типа, что, предположительно, объясняется индукцией активности PrfA внутри клетки. Сообщалось, однако, что конститутивная активность PrfA приводит к увеличению цитотоксичности листерий, что может указывать на то, что негативная регуляция активности PrfA имеет место при внутриклеточном размножении, предохраняя целостность клетки-хозяина.

Модель экспериментального заражения мышей отличается от культуры клеток прежде всего тем, что уровень размножения бактерий определяется не только вирулентными свойствами бактериального штамма, но и иммунным ответом макроорганизма. Оценка вирулентности путем определения дозы эффективного заражения LD₅₀ отражает равнодействующую этих двух сил. Ранее нами было показано, что штамм NG602, конститутивно продуцирующий факторы патогенности в результате аминокислотной замены Leu140Phe в PrfA, не отличается по LD₅₀, определенной на модели внутрибрюшинного заражения мышей, от родительского штамма NCTC 10527 [6]. Однако описанный в цитируемой работе штамм NG 602 был получен в результате химического мутагенеза и, возможно, нес дополнительные мутации, влияющие на вирулентность. Использование в данной работе спонтанной мутации гарантировало одинаковый генетический материал у мутантного и штамма дикого типа.

Штаммы *L. monocytogenes* P14 и P14A были введены внутривенно мышам линии BALB/c в концентрациях от 10^4 до 10^8 КОЕ с десятикратным интервалом для определения эффективной дозы летального заражения LD₅₀. Расчет LD₅₀ по методу Reed и Muench показал, что для штамма дикого типа P14 она составляла $10^{5.2}$ ($1,6 \times 10^5$) КОЕ/мышь, а для штамма с конститутивной экспрессией факторов патогенности $10^{4.8}$ (6×10^4) КОЕ/мышь, т.е. приблизительно в 3 раза меньше. Таким образом, конститутивная продукция факторов патогенности, связанная с мутациями в последовательности PrfA, приводит лишь к незначительному 2-3х кратному изменению в летальной дозе заражения при инфекции мышей. Безусловно, эти данные говорят в пользу того, что активность PrfA дикого типа увеличивается в процессе инфекции, что было продемонстрировано при изучении процесса инфицирования культур эукариотических клеток [12]. Вместе с тем, было установлено, что введение штамма P14A приводило к заметно более выраженному развитию инфекционного процесса. Смерть при заражении одинаковыми дозами в присутствии мутантного штамма наступала в среднем на двое суток раньше (рис. 2).

Для получения большей информации о характере инфекционного процесса было проведено определение динамики размножения штаммов *L. monocytogenes* P14 (дикий тип) и P14A (конститутивный продуцент) в органах мышей при заражении сублетальными дозами. Существенное отличие по этой характеристике между двумя штаммами было отмечено в первые сутки (рис. 3А). Количество бактерий штамма с конститутивной экспрессией P14A во внутренних органах было существенно выше: в селезенке в 33 раза, а в печени в 14 раз. Полученные данные предполагают, что конститутивная экспрессия факторов патогенности позволяет бактериям более эффективно проникать во внутренние органы на начальных этапах инфекции. Спустя трое суток, к концу четвертого дня после заражения, количество бактерий обоих штаммов в этих органах практически сравнялось (рис.3 Б, В). Однако для штамма P14A наблюдалась более быстрая элиминация возбудителя. Если в печени мышей, зараженных штаммом дикого типа, P14, в течение 4-7х суток выявлялось стабильное количество бактерий, порядка 5×10^6 КОЕ, то число бактерий штамма P14A в печени зараженных животных уменьшалось, начиная с 5-х суток, а полная элиминация был достигнута уже на 10е сутки.

Итак, полученные результаты демонстрируют, что конститутивная экспрессия факторов патогенности *L. monocytogenes* приводит к более быстрой диссеминации возбудителя во внутренние органы на начальных этапах инфекции. Это явление коррелирует с наблюдаемой *in vitro* большей инвазивностью таких штаммов и, по-видимому, свидетельствует о том, что активация PrfA и, соответственно, увеличение количества PrfA-зависимых бактериальных рецепторов, опосредующих начальное взаимодействие с клеткой хозяином, достигается не непосредственно при попадании в макроорганизм, а, видимо, только после вхождения *L. monocytogenes* в эукариотическую клетку. Ускорение первичного заражения внутренних органов, возможно, сопровождается некоторым ускорением размножения в них штамма с конститутивной экспрессией факторов патогенности, что в сумме приводит к более ранней гибели животных при заражении летальными дозами.

Определение динамики размножения листерий во внутренних органах при заражении мышей сублетальными дозами выявило существенно более раннюю элиминацию из пораженной печени штамма с конститутивной экспрессией факторов по сравнению со штаммом дикого типа. Одно из возможных объяснений наблюдаемого явления, это повышенная цитотоксичность, которая была описана у штаммов *L. monocytogenes* с конститутивной экспрессией факторов патогенности [12]. Способность к внутриклеточному и межклеточному перемещению позволяет листериям размножаться внутри эукариотических тканей, переходя непосредственно из одной клетки-хозяина в другую, что связано с ролью эукариотической клетки как оптимальной экологической ниши для *L. monocytogenes* в макроорганизме. В эукариотической клетке *L. monocytogenes*, с одной стороны, имеет условия для размножения в цитоплазме, а с другой, защищена от гуморального иммунного ответа. Быстрое разрушение клетки-хозяина приводит к выходу *L. monocytogenes* во внеклеточное пространство, где она, по-видимому, не может размножаться и подвергается быстрому уничтожению элементами иммунной системы. Ранее был описан ряд механизмов, используемых *L. monocytogenes* для предохранения от разрушения клетку-хозяин. Большинство из них направлены на уменьшение цитотоксичности основного мембрано-разрушающего фактора листерий,

листериолизина О (ЛЛО) и фосфолипаз. К таким механизмам, в частности, относятся: нахождение оптимума ферментативной активности ЛЛО при кислых рН (ниже 6.0), наблюдаемых в фагосоме, но не в цитоплазме; отсутствие секреции фосфолипазы PC-PLC при рН выше 6.5; уменьшение срока жизни ЛЛО в цитоплазме из-за присутствия в последовательности так называемого PEST-сигнала, специфически узнаваемого хозяйскими протеазами [13].

В изучаемой нами системе, однако, оба штамма обладали полным набором одинаковых мембрано-разрушающих ферментов, и, следовательно, все наблюдаемые различия в развитии инфекционного процесса были связаны только с различиями в регуляции экспрессии факторов патогенности. В работах *in vitro* нами было продемонстрировано, что экспрессия факторов патогенности *L. monocytogenes* подвергается негативной авторегуляции: в ходе роста культуры листерии продуцируют вещество, присутствие которого в среде приводит к репрессии генов патогенности через угнетение активности PrfA [1; 4; 5]. Мы предполагаем, что этот механизм функционирует и *in vivo*, выключая продукцию факторов, в том числе мембрано-разрушающих ЛЛО, PI-PLC и PC-PLC, при увеличении концентрации внутриклеточных бактерий. Другими словами, негативная регуляция активности PrfA, «отключенная» у штамма с мутацией Gly145Ser, направлена на предохранение целостности клетки-хозяина, тем самым обеспечивая более длительное сохранение бактерий в органах хозяина. Мы предполагаем, что обнаруженный нами феномен отрицательной авторегуляции служит основным регуляторным механизмом, модулирующим активность PrfA в процессе инфекции, и возможно, является основой для длительной персистенции возбудителя в макроорганизме. В настоящее время в нашей лаборатории проводится дальнейшая работа по проверке этой гипотезы.

Благодарности. Работа была поддержана РФФИ и INTAS (гранты 02-04-49506 и 2000-0471, соответственно). С.А.Е. благодарит за поддержку Региональный Фонд поддержки отечественной медицины.

Список литературы.

1. Ермолаева С.А., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. Изменение уровня экспрессии факторов патогенности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий. Мол.Ген.Микробиол.Вирусол. 2000:17-19
2. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. Москва, Медицина для всех, 2002
3. Bubert A., Sokolovic Z., Chun S.K. et al. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian cells. 1999.Mol. Gen. Genet. 261: 323-336
4. Ermolaeva S.A., Belyi Yu.F., Tartakovskii I.S. Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 1999; 174:137-41
5. Ermolaeva S., Novella S., Vega Y. et al. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. Mol. Microbiol. 2004, 52: 601-611
6. Ermolaeva S.A., Varfolomeeva N.A., Belyi Yu.F., Tartakovskii I.S. Isolation and characterization of a *Listeria monocytogenes* mutant strain hyperproducing virulence factors. FEMS Microbiol. Lett. 1997, v.150, p.189-195
7. Freitag N.E., & Jakobs K.E. Examination of *Listeria monocytogenes* intracellular gene expression by using the green fluorescent protein of *Aequorea victoria*. 1999. Infect. Immun. 67: 1844-1852
8. Lampidis R., Gross R., Sokolovic Z., et al. The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. 1994. Mol. Microbiol. 13:141-151
9. Lloyd G., Belyaeva T., Rhodius V., et al. Bacterial gene regulatory proteins: organization and mechanism of action, p.123-140. In: Molecular Microbiology. S.J.W.Busby, C.M.Thomas, N.L.Brown (eds.). 1998. NATO ASI Series. Series H: Cell Biology, V. 103, Springer-Verlag, Berlin
10. Mengaud J., Dramsi S., Gouin E., et al. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. 1991. Mol. Microbiol. 5: 2273-2283

11. Ripio M.T., Dominguez-Bernal G., Lara M. et al. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. 1997. *J. Bacteriol.* 179: 1533-1540
12. Shetron-Rama L.M., Mueller K., Bravo J.M. et al. Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants with high-level in vitro expression of host-cytosol-induced gene products. *Mol. Microbiol.* 2003, 48:1537-1551
13. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. 2001. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 584-640
14. Vega Y., Dickneite C., Ripio M.T., et al. Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. 1998. *J. Bacteriol.* 180: 6655-6660

Резюме

Т.И. Карпова, Б.И. Маракуша, Т.П. Сапенко, И.С. Тартаковский, J.A. Vazquez-Boland, С.А. Ермолаева

Эффект конститутивной активности генов патогенности на вирулентность *Listeria monocytogenes*

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи РАМН
Ветеринарный факультет, Университет Бристоля, Великобритания

Для корреспонденции: Ермолаева Светлана Александровна
НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи РАМН
Тел. (095) 193-63-71

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, PrfA, вирулентность, экспериментальный листериоз

Эффект конститутивной экспрессии факторов патогенности на вирулентность факультативного внутриклеточного паразита *Listeria monocytogenes* был изучен на модели внутрибрюшинного заражения мышей. Конститутивная экспрессия была вызвана единичной аминокислотной заменой в последовательности центрального регулятора транскрипции генов патогенности PrfA. Эффективная доза летального заражения LD₅₀ для штамма с конститутивной экспрессией факторов патогенности была в три раза ниже, чем для изогенного штамма дикого типа. При одинаковых дозах заражения этот штамм приводил к смерти животных на 1-2 дня раньше. Подсчет бактерий, высеянных их печени и селезенки зараженных животных, показал, что конститутивная экспрессия факторов патогенности приводит к ускорению диссеминации бактерий в организме животного в течение первых двадцати четырех часов. Однако конститутивная экспрессия является причиной более ранней элиминации бактерий из внутренних органов на поздних этапах инфекции. Более быстрая диссеминация мутантных бактерий, по-видимому, является следствием более высокой инвазивности, продемонстрированной на культурах эпителиальных клеток. Ускоренная элиминация из внутренних органов может быть обусловлена нарушениями цикла внутриклеточного размножения листерий, связанными с невозможностью модулирования уровня экспрессии генов патогенности.

Summary

Key words: *Listeria monocytogenes*, PrfA, virulence, listeriosis

The effect of virulence factor constitutive expression on virulence of facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* was studied on the model of the mouse intraperitoneal infection. Constitutive expression was due to a single amino acid substitution in the transcriptional factor PrfA, the master-regulator of *L. monocytogenes* virulence genes. The effective lethal dose (LD₅₀) was 3 times less for the strain with constant production of virulence factors. This strain brought about the death of animals one-two days earlier than the wild type being applied at the equal dose. The bacterial counting in livers and spleens demonstrated that constant virulence factor production resulted in faster accumulation during the first 24 hours, however it caused more rapid bacterial elimination from the organs during late stages of infection. Faster deep tissues dissemination of the mutant bacteria was consistent with their higher invasiveness on the model of epithelial cell cultures. Rapid elimination might be a consequence of the break down of an intracellular multiplication cycle of *L. monocytogenes* due to a failure to modulate the virulence gene expression.

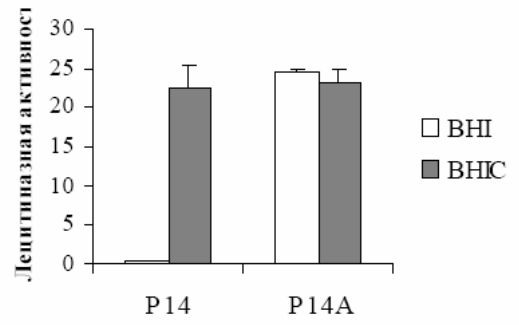
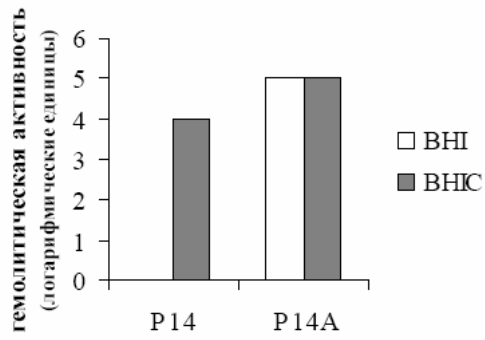
Подписи к рисункам.

Рис. 1. Характеристика продукции основных факторов патогенности штаммами *L. monocytogenes* P14 и P14A. А – уровень накопления ЛЛО и РС-PLC в культуральной жидкости, измеренный по гемолитической и лецитиназной активностям, соответственно. *L. monocytogenes* выращивали в течение 16 часов в среде ВНИ или, для индукции регулона патогенности, в среде ВНИ, дополненной 0,2 % активированного угля (ВНИС). Б – гемолитическая и лецитиназная активность штаммов P14 и P14A на агаризованных средах, содержащих кровь и желток куриного яйца, соответственно. Гемолитическая активность проявляется по появлению просветления вокруг штриха культуры в результате разрушения эритроцитов; лецитиназная – по появлению помутнения, вызванного появлением водонерастворимых продуктов гидролиза лецитина.

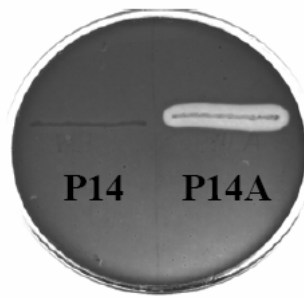
Рис. 3. Динамика падежа мышей при заражении штаммами P14 и P14A. Заражение проводилось дозами, указанными на рисунке. Исходное количество мышей в каждой группе (4 мыши) принято за 100%.

Рис. 3. Динамика накопления *L. monocytogenes* во внутренних органах мышей. А – количество КОЕ в печени и селезенке через 24 часа после заражения. Б – размножение в печени в течение 10 суток после заражения. В – размножение в селезенке.

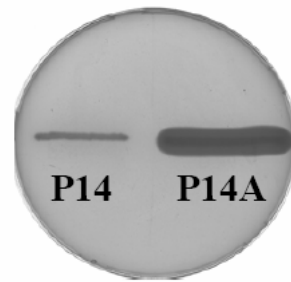
А



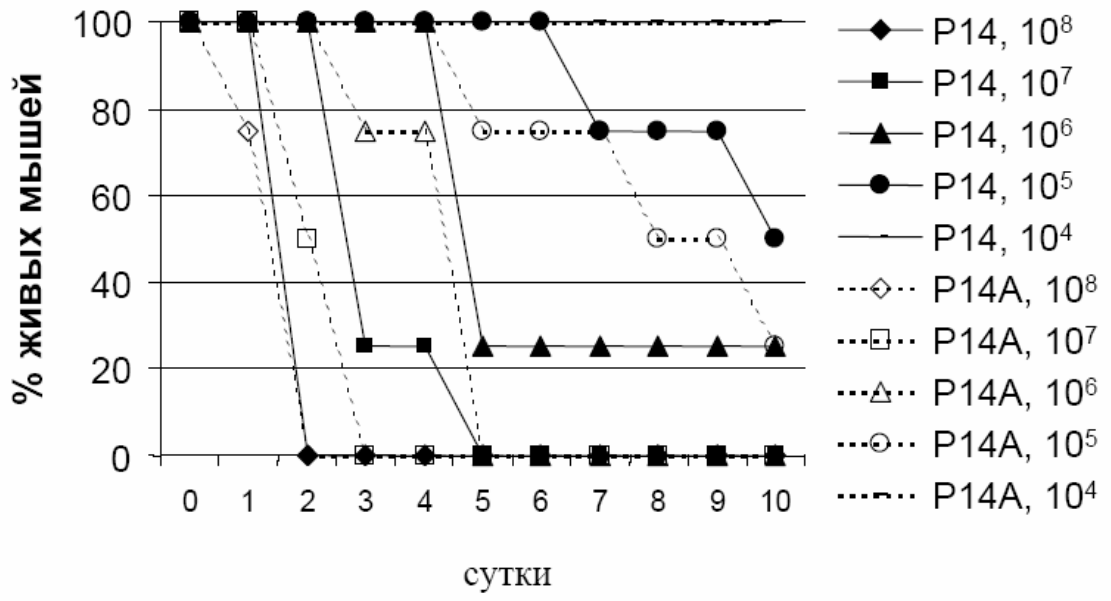
Б



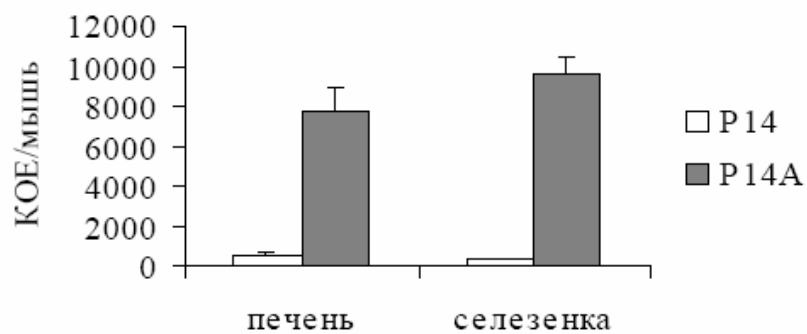
Гемолитическая активность



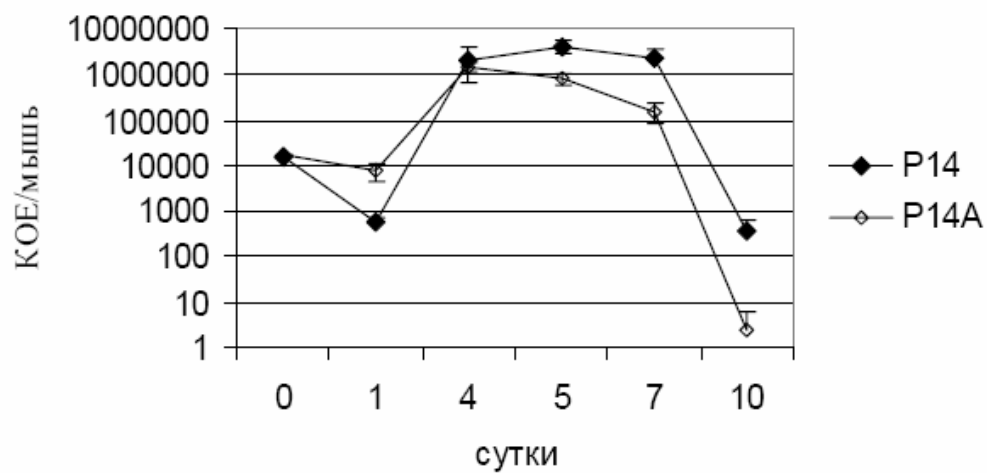
Лецитиназная активность



А



Б



В

