

С.А.Ермолаева, Ю.М. Романова, И.С.Тартаковский, А.Л.Гинцбург

Вклад системной регуляции экспрессии генов патогенности в вирулентность факультативных внутриклеточных паразитов

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи
РАМН

Среди бактерий, способных к внутриклеточному паразитизму, особняком стоит группа факультативных внутриклеточных паразитов, эффективно размножающихся как внутри эукариотической клетки, так и в объектах окружающей среды. Представители этой группы, распространенные практически повсеместно, отличаются экологической пластичностью и высокими адаптационными способностями, позволяющими им использовать разнообразные ресурсы и быстро перестраивать свой метаболизм в соответствии с изменением внешних условий. Последнее привело к развитию у представителей группы факультативных внутриклеточных паразитов сложных генетических систем регуляции, позволяющих включать и выключать экспрессию определенных групп генов, в том числе генов патогенности, в ответ на внешние сигналы. Изучение этих регуляторных систем, помимо фундаментального, представляет несомненный практический интерес, т.к. является основой разработки принципиально новых подходов контроля и борьбы с бактериальными инфекциями.

За последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в области изучения взаимоотношений внутриклеточных бактериальных паразитов и эукариотических клеток, выступающих в роли хозяев. На стыке микробиологии, молекулярной биологии и клеточной биологии возникло две новые науки: молекулярная микробиология и клеточная микробиология. Молекулярно-биологические методы, которые ранее использовались преимущественно для изучения лабораторных моделей, таких как *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*, активно применяются для изучения патогенных бактерий. С их помощью удалось получить огромное количество экспериментального материала, касающегося регуляции экспрессии факторов патогенности, причем не только в лабораторных условиях, но и непосредственно в процессе инфекции. Мощным инструментом для изучения поведения внутриклеточных паразитов стали культуры эукариотических клеток. Развитие методологической и экспериментальной базы позволяет проводить интенсивные исследования на новых бактериальных моделях, возбудителях недавно открытых

инфекций. Их изучение показало, что адаптация внутриклеточных паразитов основана на общих принципах, включающих координацию экспрессии факторов патогенности, эксплуатацию механизмов эукариотической клетки для собственных нужд, использование внутриклеточных ресурсов для размножения, однако осуществление этих принципов происходит по множеству оригинальных механизмов, специфических для каждого возбудителя. Данный обзор посвящен достижениям последних лет в области системной регуляции экспрессии факторов патогенности как способе адаптации факультативных внутриклеточных паразитов в процессе инфекции и базируется преимущественно на двух моделях, *Listeria monocytogenes* и *Legionella pneumophila*.

Процесс взаимодействия с эукариотической клеткой. Внутриклеточные паразиты попадают в клетку в результате фагоцитоза, общего процесса, который приводит к деградации содержимого фагосомы, если только фагоцитированная бактерия активно не изменяет его течение [20, 30]. Внутриклеточные паразиты разработали две взаимоисключающие стратегии, которые позволяют не только избежать эндосомально-лизосомального пути деградации, но и успешно размножаться, используя ресурсы клетки-хозяина. *L. monocytogenes* и *L. pneumophila* являются типичными представителями каждой из этих стратегий.

Характерной чертой процесса инфекции *L. monocytogenes* является быстрое разрушение фагосомы в результате активности мембрано-литических ферментов, порообразующего токсина листериолизина О и фосфолипаз (для обзора см [3, 22, 65]). Успешный выход из разрушенной фагосомы является ключевым событием, после которого *L. monocytogenes* находится в цитоплазме, где она эффективно размножается и перемещается. Аналогичную стратегию внутриклеточного размножения используют *Shigella flexneri* и облигатные паразиты, относящиеся к роду *Rickettsia* [33, 42]. Для внутриклеточного перемещения эти бактерии используют схожий механизм, эксплуатирующий фрагменты эукариотического цитоскелета, полимеризация которых

является движущей силой, позволяющей не только перемещаться внутри клетки, но и проникать в соседние. Перемещение из одной клетки в другую происходит, когда бактерия, достигнув цитоплазматической мембраны, продолжает движение, как бы «толкая» перед собой мембраны своей и соседней клеток [19, 58]. Этот процесс заканчивается образованием двойной фагосомы, внутренняя мембрана которой принадлежит старой клетке-хозяину, а внешняя – новой. Лизис двойной мембраны начинается новый цикл инфекции (для обзора см. [17, 18, 19, 33]). Таким образом, *L. monocytogenes* и другие бактерии со схожим внутриклеточным циклом, способны распространяться по тканям и органам макроорганизма, не покидая внутриклеточное пространство.

L. pneumophila использует противоположную стратегию: попав внутрь фагоцита, легионелла не разрушает фагосому, а преобразует ее в репликативную эндосому (РЭ) [4, 5, 37]. Специфические бактериальные продукты, природа которых до настоящего времени остается не установленной, тормозят процесс созревания фагосомы и предотвращают ее слияние с лизосомой [38]. Многочисленный ряд патогенных бактерий, включая *Mycobacterium spp.*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella spp* и других, также способны замораживать созревание фагосомы на разных стадиях и размножаться внутри РЭ [26, 49, 53]. Процесс размножения легионелл заканчивается, когда их концентрация внутри РЭ достигает некой критической величины [4, 37, 38]. Спустя короткий промежуток времени, наступает лизис РЭ и всей клетки-хозяина, освобожденные бактерии попадают в межклеточное пространство с тем, чтобы начать новый цикл инфекции [37, 63].

Процесс инфекции требует от факультативного внутриклеточного паразита синтеза белков, факторов патогенности, которые выполняют специфические функции, в большинстве случаев не находящие применения во внешней среде. С точки зрения экономии ресурсов конститутивная продукция факторов патогенности представляется недопустимой роскошью, поэтому большинство факультативных паразитов обладают

генетическими системами, репрессирующими экспрессию факторов патогенности при росте во внешней среде и включающими ее в процессе инфекции [21, 47]. Во многих случаях системная регуляция экспрессии факторов патогенности осуществляется на уровне инициации транскрипции, и включает участие регуляторного белка, который связывается с промоторными областями генов патогенности, включая или выключая их экспрессию в зависимости от внешних условий. Так, например, белки, необходимые для внутриклеточного паразитизма *L. monocytogenes*, кодируются хромосомными генами, образующими несколько оперонов, которые подвергаются координированной регуляции благодаря активности фактора транскрипции PrfA [44, 45, 48]. Связывание PrfA со специфической нуклеотидной последовательностью внутри промоторных областей генов патогенности необходимо для инициации их транскрипции. Интенсивность транскрипции зависит от концентрации PrfA и его функционального статуса, а специфическая активность отдельных оперонов определяется также вариациями в узнаваемой PrfA последовательности, что в сумме обеспечивает модуляцию уровня экспрессии факторов патогенности в зависимости от сигналов, получаемых клеткой из внешней среды [1, 10, 28, 66]. Помимо факторов патогенности, непосредственно вовлеченных во взаимодействие со структурами клетки-хозяина, под положительным контролем PrfA находятся гены, кодирующие утилизацию фосфорилированных углеводов, т.е. той формы углеводов, которая доступна внутри цитоплазмы эукариотической клетки, а также некоторые белки теплового шока [55, 57]. И, наоборот, экспрессия и активность самого PrfA зависит от доступности источников нефосфорилированных углеводов, а на продукцию факторов патогенности влияют общие внутрибактериальные системы, обеспечивающие ответ на условия стресса [29, 50]. Существование прямых и обратных связей делает систему регуляции экспрессии факторов патогенности подвижной и позволяет *L. monocytogenes* быстро адаптироваться к изменяющимся внешним условиям.

Возбудитель болезни легионеров, *L. pneumophila*, развивалась как паразит живущих в открытых водоемах амёб и реснитчатых простейших [6,31]. Большинство белковых факторов, необходимых для размножения в альвеолярных макрофагах, основной мишени легионелл, также необходимы для успешного паразитирования внутри простейших [5, 32]. Экспрессия *icm/dot* генов, кодирующих этих факторы, координируется с экспрессией флагелл, продукцией белков теплового шока, и такими фенотипическими признаками, как цитотоксичность, чувствительность к ионам Na^+ и осмолотерантность [13, 30]. Координация экспрессии связана с окончанием экспоненциальной фазы роста и осуществляется на уровне инициации транскрипции, что было предположено на основании определения уровня активности соответствующих промоторов и анализа их последовательностей, содержащих схожие сайты, могущие служить для связывания регуляторного белка [30]. Существенный вклад в координацию экспрессии детерминант патогенности легионелл вносит белок RpoS, σ -субъединица РНК-полимеразы, специфичная для транскрипции генов стационарной фазы и стрессовых условий разной природы [7]. Внутриклеточной сигнальной молекулой, координирующей активацию различных групп генов, включая гены патогенности, у *L. pneumophila* является гуанозин-3',5'-бипирофосфат (ppGpp), продукт белка RelA [35]. Накопление алармона ppGpp является следствием голодания по аминокислотам и приводит к развитию соответствующего адаптивного ответа, что характерно для целого ряда бактерий [14]. Искусственное увеличение внутриклеточной концентрации ppGpp приводит к активации продукции ряда факторов транскрипции, включая RpoS, и вызывает у *L. pneumophila* фенотипические проявления, координирующие с увеличением продукции факторов патогенности [35]. Таким образом, приведенные примеры показывают, что у факультативных внутриклеточных паразитов экспрессия факторов патогенности является системным адаптивным ответом на изменение внешних условий, тесно связана с общим

метаболизмом клетки и координируется преимущественно на уровне инициации транскрипции.

Индукция экспрессии факторов патогенности в начале инфекционного процесса

У многих бактерий гены патогенности полностью репрессированы во внешней среде, и их индукция наблюдается только при попадании в макроорганизм. Сигналом для такой индукции является изменение внешних условий, прежде всего значительный температурный сдвиг. Большинство патогенных бактерий отвечает на повышение температуры усилением транскрипции генов патогенности, имеющим, как правило, координированный характер [47]. Координация осуществляется за счет температурного контроля синтеза и/или активности принципиального регуляторного белка, контролирующего экспрессию других генов патогенности. Под контролем температуры могут находиться разные стадии синтеза белка-регулятора: транскрипция, трансляция, регуляция активности на посттрансляционном уровне. Например, у *S. flexneri* от температуры зависит структура ДНК промоторной области гена, кодирующего регуляторный белок VirB. При 37°C эта область становится недоступной для связывания репрессора, гистон-подобного белка H-NS, что приводит к увеличению экспрессии VirB и контролируемых им генов патогенности [64]. Более быстрый ответ на изменение температуры обеспечивается в том случае, если температурный контроль осуществляется на уровне регуляции активности уже синтезированного белка. У *S. typhimurium* от температуры зависит уровень мультимеризации белка TrpA и его способность связываться с регулируемыми промоторными областями [39].

У *L. monocytogenes* температурному регулированию подвергается инициация трансляции основного регулятора генов патогенности белка PrfA [40]. Наблюдаемая у *L. monocytogenes* при температурах ниже 30°C репрессия генов патогенности обуславливается отсутствием внутри клетки белка PrfA, необходимого для их транскрипции [54]. Однако, несмотря на отсутствие в клетке белка PrfA, транскрипция

гена *prfA* не прекращается при температурах ниже 30°C, и количество *prfA*-специфической мРНК не зависит от температуры. Было установлено, что нетранслируемая часть *prfA*-специфической мРНК образует вторичную структуру, препятствующую нормальному связыванию рибосомы, и, таким образом, предотвращает трансляцию белка PrfA. Эта структура становится нестабильной при повышении температуры, что позволяет практически мгновенно начать синтез PrfA при попадании бактерии в теплокровный организм [40].

Интересно отметить, что у *L. pneumophila*, жизненный цикл которой включает паразитирование внутри заселяющих природные водоемы амёб и реснитчатых простейших, значительная часть генов, необходимых в процессе инфекции, температурной регуляции не подвергается [61]. По-видимому, это связано с уже упоминавшимся фактом, что многие гены патогенности этого внутриклеточного паразита необходимы также для размножения внутри простейших.

Резкое изменение температуры и химического состава среды, характерное для перехода из внешней среды в теплокровный организм, сопряжено с развитием стрессового ответа в клетках бактерий. Белки стрессового ответа, продукция которых увеличивается в условиях теплового шока и других стрессовых ситуациях, являются высоко консервативными белками, обнаруженными как у прокариот, так и у эукариот. У факультативных внутриклеточных паразитов наблюдается увеличение продукции белков стрессового ответа в процессе инфекции, необходимое, по-видимому, для выживания внутри фагоцитов. Разные классы белков стрессового ответа вносят неодинаковый вклад в вирулентность у различных бактерий. Так, классические белки теплового шока GroES и DnaK, которые составляют основную массу бактериальных белков, синтезируемых при повышении температуры, необходимы для нормального процесса инфекции макрофагов внутриклеточным паразитам *S. typhimurium*, *Brucella suis* и *L. pneumophila*, но не *L. monocytogenes* [12, 36, 43].

В инфекции *L. monocytogenes* необходимо участие белков теплового шока, относящихся к другому классу, так называемому классу Hsp100/Clp АТФаз [29, 51, 59]. Clp (caseinolytic protein) белки состоят из нескольких субъединиц (для обзора см. [34]). Протеазная субъединица ClpP обладает неспецифической протеолитической активностью в отношении коротких пептидов. При связывании с АТФазной субъединицей (ClpC или ClpE) ClpP демонстрирует протеолитическую активность в отношении специфических мишеней, определяемых присоединившейся субъединицей. Clp белки оказывают комплексное воздействие на физиологию бактерий, влияя на рост при высоких температурах и в условиях осмотического шока, развитие компетентности, клеточное деление. Нарушение функции Clp белков в результате направленного мутагенеза существенно влияет на вирулентность *L. monocytogenes*. Делеция генов, кодирующих АТФазные субъединицы, увеличивает на четыре порядка летальную дозу заражения (LD₅₀) на модели листериоза мышей, а делеция гена, кодирующего протеолитическую субъединицу ClpP, приводит к авирулентности [29, 51, 59]. Отсутствие ClpP делает невозможным размножение *L. monocytogenes* внутри макрофагов, которые являются нормальной экологической нишей при установлении первичной инфекции [29]. Таким образом, Clp белки вовлечены в начальный адаптивный ответ внутриклеточного паразита *L. monocytogenes* во время развития инфекционного процесса.

У *L. pneumophila* в процессе внутриклеточного размножения наблюдается существенное увеличение продукции белков теплового шока, GspA и Hsp60 [36]. Так, в процессе инфекции макрофагов индукция экспрессии белка, относящегося к семейству Hsp60 белков теплового шока, наблюдалась у вирулентного штамма *L. pneumophila*, но не у изогенного авирулентного. Эффект на продукцию Hsp60 специфичен для внутриклеточных условий, т.к. индукции этого белка при тепловом шоке культуры, растущей в питательном бульоне, одинакова для вирулентного и авирулентного штаммов.

Первичное установление инфекции факультативных внутриклеточных паразитов связано с прикреплением к клетке-мишени и интернализацией. В случае, если мишенью являются не макрофаги, а непрофессиональные фагоциты, типа эпителиальных или эндотелиальных клеток, инициация процесса фагоцитоза осуществляется за счет специфических бактериальных белков, взаимодействующих с рецепторами эукариотической клетки. Таким образом, описанная выше первичная активация экспрессии факторов патогенности, наблюдающаяся сразу после попадания в макроорганизм, прежде всего должна быть направлена на увеличение продукции белков, необходимых для адгезии и индукции фагоцитоза.

L. pneumophila инфицирует и размножается преимущественно в альвеолярных макрофагах, в которые попадает путем естественного фагоцитоза или специфического механизма, получившего название кольцевого фагоцитоза [37, 38]. В адгезии *L. pneumophila* к макрофагам принимают участие пили IV типа, которые необходимы и для взаимодействия с простейшими, мишенью легионелл во внешней среде [61]. Пилиация легионелл зависит от стадии роста культуры. Гены *fla*, кодирующие пили, индуцируются при выходе из стадии экспоненциального роста, одновременно с другими генами патогенности легионелл, и их активация находится под контролем алармона ppGpp [35]. Условия выращивания культуры *L. pneumophila*, приводящие к индукции генов факторов патогенности, увеличивают вирулентные свойства, определенные на культуре макрофагов почти в 100 раз [13, 35].

Недавно на модели *L. monocytogenes* нами было показано, что одного температурного сдвига недостаточно для полной активации генов патогенности этой бактерии [1, 23, 24]. Регуляторный белок PrfA, трансляция которого начинается при переносе на 37С, при выращивании на богатых питательных средах при этой температуре поддерживает лишь базовый уровень экспрессии контролируемых им генов [1, 23]. Активация PrfA и полная индукция PrfA-зависимых генов, в том числе кодирующих

факторы инвазии (InlA, InlB, ActA), требуют дополнительных условий [1, 24, 56]. Перевод PrfA в конститутивно активную форму путем введения единичных аминокислотных замен приводит к заметному ускорению начального процесса инфекции, в частности, к 10-100-кратному увеличению процента бактерий успешно вошедших внутрь клеток при заражении клеточных культур, а также к более чем 10-кратному увеличению числа бактерий, достигших внутренних органов (печени и селезенки) мышей в течение первых 24 часов после внутрибрюшинной инфекции [24, 62]. Результаты, полученные на модели *L. monocytogenes* позволяют предположить, что на начальном этапе инфекции эта бактерия не обладает полным набором факторов, необходимых в инфекционном процессе. По нашему мнению, это свидетельствует о том, что у *L. monocytogenes* процесс начального вхождения в клетку является исключительным событием и отличается от дальнейшего процесса инфекции. Это предположение коррелирует с представлением о стратегии внутриклеточного размножения, используемой этой бактерией: один раз попав внутрь эукариотической клетки, она распространяется далее путем непосредственного перемещения из клетки в клетку. Можно предположить, что лишь в ходе развития процесса инфекции, предположительно, после вхождения в эукариотическую клетку, факультативный внутриклеточный паразит попадает в условия, при которых происходит полная активация генов патогенности.

Модуляция экспрессии факторов патогенности в ходе взаимодействия с клеткой-хозяином. Процесс вхождения в клетку заканчивается формированием фагосомы, заключающей бактерию. Начиная с этого этапа судьба бактерии зависит от того, успеет ли она завершить процесс разрушения/преобразования фагосомального компартмента до слияния того с лизосомой. Процесс созревания фагосомы, связанный с взаимодействием с другими эндосомами, развивается в течение короткого времени, всего 5 -15 минут после формирования, что выражается в приобретении фагосомой специфических маркерных белков и понижению внутрифагосомального pH [16, 20, 25]. Следовательно, регуляторные

события, необходимые для продукции бактериальных факторов, необходимых для адаптации, должны происходить чрезвычайно быстро.

В течение первого часа после инфекции культуры макрофагов около 90%, клеток *L. monocytogenes*, находящихся в фагосомах, разрушаются под действием гидролитических ферментов, попавших в фагосому в результате ее слияния с лизосомой [15]. Лишь 14 % бактерий, наблюдаемых спустя час после заражения, оказываются свободными в цитоплазме. Таким образом, внутриклеточное размножение *L. monocytogenes* является результатом соревнования между антибактериальной гидролитической активностью, результатом слияния фагосомы и лизосомы, и мембрано-разрушающей активностью самой бактерии. Нехватку времени на развитие адаптационного ответа *L. monocytogenes* компенсирует оригинальным механизмом посттрансляционной регуляции. Ускоренная продукция мембрано-литического фермента фосфолипазы Ц (PC-PLC) достигается освобождением внутриклеточного пула уже синтезированного белка. Сигналом для такого освобождения является понижение рН, вызываемое слиянием фагосомы и лизосомы [46]. Другой механизм, также, по-видимому, представляющий собой адаптивную реакцию, направленную на ускорение разрушения поздней эндосомы, – это увеличение ферментативной активности основного мембрано-разрушающего токсина, листериолизина О, при низких рН [8]. Данные о регуляции на уровне инициации транскрипции противоречивы. С одной стороны, анализ присутствия специфической мРНК, кодирующей факторы патогенности, у штамма *L. monocytogenes*, неспособного к выходу из фагосомы из-за мутации, выявил активность генов, кодирующих листериолизин О и фосфолипазы [11]. С другой стороны, уровень транскрипции генов патогенности *in vitro* при уменьшении рН понижается, что связано с уменьшением активности регуляторного белка PrfA [9]. Кроме того, слежение за активностью PrfA-регулируемых промоторов с помощью репортерного белка Gfp (green fluorescent protein из *Aequorea victoria*), продемонстрировало отсутствие активности до тех пор, пока бактерия

окружена фагосомальной мембраной [27]. Таким образом, адаптивный ответ *L. monocytogenes* на изменения, связанные с созреванием фагосомы, развивается, по-видимому, преимущественно на посттрансляционном уровне, что обеспечивает его максимальную скорость.

Внутриклеточные паразиты, цикл размножения которых осуществляется внутри фагосомы, преобразованной в репликативную эндосому (РЭ), также обладают ограниченным временем для предотвращения слияния фагосомы с лизосомой и преобразования ее в РЭ. Было показано, что *L. pneumophila* останавливает процесс созревания фагосомы на самых начальных стадиях, в течение первых 5 минут после ее формирования [37, 38, 60]. Белки, необходимые для успешного начала формирования РЭ, должны быть синтезированы заранее. Действительно, индукция экспрессии необходимых для вирулентности продуктов *icm/dot* генов путем увеличения внутриклеточной концентрации алармона ppGpp приводит к существенно более эффективному установлению первичной вакуоли: число бактерий, найденных в фагосомах с маркерным рецептором Lamp-1, свидетельствующем о поздних этапах эндосомально-лизосомального пути деградации, уменьшается более чем в 50 раз, если перед началом инфекции гены патогенности были индуцированы [35].

Условия внутриклеточного размножения. Стадия внутриклеточного размножения, следующая за успешным началом инфекции, не имеет таких временных ограничений. Основной проблемой, с которой сталкиваются факультативные внутриклеточные паразиты на этой стадии, является недоступность некоторых питательных субстратов, распространенных во внешней среде. К числу таких субстратов относятся ионы железа, которые внутри клетки встречаются только в связанной с белками типа ферритина форме. Механизмы получения железа бактериями в процессе инфекции были достаточно давно открыты и к настоящему времени изучены и описаны подробнее всех других адаптационных систем (для обзора см. [21, 47]).

Другой характерной особенностью внутриклеточного пространства является специфика биохимического состава углеводов. В почве, где размножается ведущая во внешней среде сапрофитический образ жизни *L. monocytogenes*, преобладают углеводы растительного происхождения, такие как β -глюкозиды целлобиоза и арбутин. Гены патогенности *L. monocytogenes* подвергаются катаболитной репрессии в присутствии метаболизируемых углеводов, причем именно β -глюкозиды вызывают максимальный уровень репрессии [50, 52]. Координация репрессии генов патогенности в присутствии углеводов осуществляется через подавление активности основного регулятора транскрипции белка PrfA [50]. Было высказано предположение, что наличие углеводов растительного происхождения служит дополнительным сигналом, который, помимо температуры, свидетельствует о выходе из макроорганизма и попадании во внешнюю среду.

Внутри цитоплазмы клетки-хозяина углеводы запасаются в виде гликогена. В цепи биохимических превращений глюкозы предшественником гликогена и первичным продуктом его распада является глюкозо-1-фосфат. В связи с активным метаболизмом гликогена глюкозо-1-фосфат постоянно присутствует в цитоплазме эукариотической клетки и может быть использован находящимися в ней внутриклеточными паразитами. У ряда бактерий, включая *L. monocytogenes*, была идентифицирована ФТС-независимая пермеаза UhpT, которая использует антипорт неорганических фосфатов для доставки глюкозо-1-фосфата внутрь бактерии [55]. У *L. monocytogenes* экспрессия гена *uhpT* находится под контролем регулятора транскрипции PrfA и таким образом координируется с экспрессией факторов патогенности. Делеция гена *uhpT* влияет на внутриклеточное размножение *L. monocytogenes*, указывая на возможную роль глюкозо-1-фосфата как источника энергии в процессе внутриклеточного паразитизма. Таким образом, факультативные внутриклеточные паразиты способны переключать в зависимости от внешних условий активность не только специфической группы генов, к которым

относятся факторы патогенности, но и генов, ответственных за более общие метаболические процессы.

Диссеминация внутриклеточных паразитов внутри макроорганизма.

Завершающим этапом внутриклеточного цикла является перемещение бактерии из первичной клетки-хозяина в соседнюю, что является необходимым условием диссеминации возбудителя внутри макроорганизма. Внутриклеточное размножение *L. pneumophila* состоит из повторяющихся циклов, которые включают этапы интернализации, размножения и разрушения клетки-хозяина [5, 37, 38]. Разрушение эукариотической клетки легионеллами может происходить по механизмам апоптоза и некроза [31]. Однако, только индукция некротической гибели клеток связана с процессом размножения и, по-видимому, является основой диссеминации легионелл, в то время как апоптоз связан с продукцией цитотоксина, активирующего каспазо-3-зависимый путь [31, 63]. На культурах макрофагов было продемонстрировано, что разрушение в результате апоптоза происходит в первые часы инфекции. Размножение легионелл внутри РЭ завершается спустя приблизительно 24 часа после начала инфекции, и в это время около 50% эукариотических клеток подвергаются некрозу [63]. Оставшиеся 50% клеток разрушаются спустя следующие сутки. Некроз эукариотических клеток является результатом активности пороформирующего токсина, продукция которого зависит от стадии роста культуры. Пороформирующая активность наблюдается при достижении высокой концентрации бактерий внутри РЭ, однако вскоре после перехода в стационарную фазу роста пороформирующая активность начинает уменьшаться [63]. Таким образом, продукция порообразующего токсина находится под строгим контролем, механизм которого, однако, до сих пор остается неясным. Продукция необходимых в процессе интернализации *icm/dot* генов, коррелирующая с развитием подвижности в результате активации кодирующих флагеллы генов *fla*, также увеличивается в конце экспоненциальной стадии роста, хотя и не подвергается репрессии при выходе в

стационарную стадию роста [13, 35]. Наблюдаемые изменения в активности генов, связанных с перемещением в пространстве и необходимых в самом начале процесса инфицирования, также, по-видимому, связаны с циклом внутриклеточного развития легионелл. Вышедшие из разрушенной клетки бактерии должны быть готовы к перемещению в поисках нового хозяина и к быстрому развитию событий после интернализации.

Как было указано выше, диссеминация *L. monocytogenes* происходит по другому механизму. Эта бактерия способна перемещаться непосредственно из клетки в клетку, не покидая внутриклеточного пространства, и процесс перехода не связан с разрушением клетки-хозяина. Был установлен ряд направленных на предотвращение разрушения клетки-хозяина механизмов, которые действуют как на посттрансляционном уровне, влияя на активность мембрано-разрушающих белков, таких как листериолизин О и фосфолипазы, а также на уровне инициации транскрипции, регулируя уровень активности кодирующих эти факторы генов. К посттрансляционной регуляции можно отнести наличие в аминокислотной цепи листериолизина О так называемых PEST-последовательностей, которые узнаются эукариотическими протеазами, подвергая листериолизин специфическому протеолизу, а также уменьшение порообразующей активности листериолизина О при нейтральном рН, наблюдающемся в цитоплазме [8, 41]. Нейтральные рН также препятствуют секреции в окружающее пространство другого мембрано-разрушающего фермента, фосфолипазы PC-PLC [46]. Негативной регуляции на уровне транскрипции гены патогенности *L. monocytogenes* подвергаются под воздействием аутокринной сигнальной молекулы, продуцируемой этими бактериями в ходе роста культуры [2, 23]. Этот механизм негативно влияет на активность регуляторного белка PrfA, что приводит к репрессии генов патогенности *in vitro*. Устранение последствий негативной регуляции путем введения в последовательность PrfA соответствующих аминокислотных замен, приводящих его в конститутивно активное

состояние, влияет на вирулентные свойства *L. monocytogenes*. Штаммы, у которых гены патогенности не подвергаются негативной регуляции, являются цитотоксичными и вызывают более быструю гибель эукариотических клеток при исследовании клеточных культур; в опытах по искусственному заражению мышей эти штаммы быстрее распространяются во внутренние органы на начальных этапах инфекции, однако также быстрее элиминируются из организма животного [41, 24]. Более быстрая элиминация, по-видимому, является следствием цитотоксичности и нарушения нормального цикла внутриклеточного размножения. Таким образом, постоянное пребывание во внутриклеточном пространстве, по-видимому, дает листериям определенные преимущества, связанные с доступностью питательных веществ, возможностью эффективного размножения и защитой от гуморального иммунного ответа.

Заключение. Не смотря на огромное количество информации, касающейся молекулярных механизмов внутриклеточного паразитизма, которая была накоплена за последние годы, многие аспекты взаимодействия патогенных бактерий и их эукариотических хозяев до сих пор остаются неясными. В частности, это касается модулирование уровня экспрессии факторов патогенности в ходе процесса инфекции как адаптивного ответа бактерии на условия, с которыми она встречается в различных компартментах клетки на разных стадиях инфекции. Использование новых методических подходов, использующих возможности геномики и протеомики, позволят в недалеком будущем не только выявить неустановленные до сих пор факторы патогенности, но и установить функциональные связи, контролирующие их продукцию. Без сомнения, эти знания заложат фундамент для разработки новых лекарственных средств и способов контроля инфекционных болезней.

Благодарности. Работа, проводимая авторами, поддерживается РФФИ (гранты 02-04-49506 и 02-04-48500) и INTAS (грант 2000-0471). С.А.Е. благодарит за поддержку Региональный Фонд поддержки отечественной медицины.

Список литературы.

1. Ермолаева С.А., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 2000. – №1. – стр. 17-19
2. Ермолаева С.А., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. // ЖМЭИ – 2000. – №5. – стр. 3-6
3. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. // Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. – Москва, Медицина для всех, 2002
4. Abu Kwaik Y. // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62. – P. 2022-2028
5. Abu Kwaik Y. // Mol. Microbiol. – 1998. – Vol. 30. – P. 689-695
6. Abu Kwaik Y., Gao L.Y., Stone B.J. et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64. – P. 3127-3133
7. Bachman M.A., Swanson M. // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol. 40. – P. 1201-1204
8. Beauregard K.E., Lee K., Collier R.J., Swanson J.A. // J.Exp.Med. – 1997. – Vol. 186. – P. 1159-1163
9. Behari J., Youngman P. // Infect. Immun. – 1998. – Vol. 66. – P. 3635-3642
10. Bohne J., Sokolovic Z. Goebel W. // Mol. Microbiol. – 1994. – Vol. 11. – P. 1141-1150
11. Bubert A., Sokolovic Z., Chun S.K. // Mol Gen Genet. – 1999. – Vol. 261. – P. 323-336
12. Buchmeier N.A., Heffron F. // Science. – 1990. – Vol. 248. – P. 730-732
13. Byrne B., Swanson M. // Infect. Immun. – 1998. – Vol. 66. – P. 3029-2034
14. Cashel M., Gentry D.R., Hernandez V.J., Vinella D. // In Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt F.C. (ed.) Washington. 1996. – P. 1458-1496

15. Chastellier C., Berche P. // *Infect. Immun.* – 1994. – Vol. 62. – P. 543-553
16. Chen J.W., Cha Y., Yuksel K.U. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 8754-8758
17. Cossart P. // *Cell. Microbiol.* – 2000. – Vol 2. – P. 195-205
18. Cossart P. // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 7. – P. 94-101
19. Cossart P., Kocks C. // *Mol. Microbiol.* – 1994. – Vol. 13. P. 395-402
20. Desjardins M., Huber L.S., Parton R.G., Griffiths G. // *J. Cell Biol.* – 1994. – Vol. 124. – P. 677-688
21. DiRita V., Mekalanos J.J. // *Annu. Rev. Genet.* – 1989. – Vol. 23. – P. 455-482
22. Dramsi S., Lebrun M., Cossart P. // *Curr. Top. Microbiol. Immun.* – 1996. – Vol. 209. – P. 61-77
23. Ermolaeva S., Belyi Y., Tartakovskii I. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1999. – Vol. 174. – P. 137-141
24. Ermolaeva S., Varfolomeeva N., Belyi Y., Tartakovskii I. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – Vol 150. – P. 189-195
25. Feng Y., Press B., Wandinger-Ness A. // *J. Cell Biol.* – 1995. – Vol. 131. – P. 1435-1452
26. Fischer L.J., Quinn F.D., White E.H. et al. // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol 64. – P. 269-276
27. Freitag N., Jacobs K. // *Inf. Immun.* – 1999. – Vol. 67. – P. 1844-1852
28. Freitag N., Portnoy D.A. // *Mol. Microbiol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 845-853
29. Gaillot O., Pellegrini E., Bregenholt S. et al. // *Mol. Microbiol.* – 2000. – Vol. 35. – P. 1286-1294
30. Gal-Mor O., Zusman T., Segal G. // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – P. 3823-3833
31. Gao L.Y., Abu Kwaik Y. // *Infect. Immun.* – 1999. – Vol. 67. – P. 862-870

32. Gao L.Y., Harb O.S., Abu Kwaik Y. // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65. – P. 4738-4746
33. Goldberg M.B., Sansonetti. P.J. // *Infect. Immun.* – 1993. – Vol. 61. – P.4941-4946
34. Gottesman S., Maurizi M.R. // *Microbiol. Rev.* – 1992. – Vol. 56. – P. 592-621
35. Hammer B.K., Swanson M. // *Mol. Microbiol.* – 1999. – Vol. 33. – P. 721-731
36. Hoffman P.S., Houston L., Butler C.A. // *Infect. Immun.* – 1990. – Vol. 58. – P. 3380-3387
37. Horwitz M.A. // *J. Exp. Med.* – 1983. – Vol. 158. – P. 1319-1331
38. Horwitz M.A. // *J. Exp. Med.* – 1983. – Vol. 158. – P. 2108-2126
39. Hurme R., Berndt K.D., Normark S.J., Rhen M. // *Cell.* – 1997. – Vol. 90. – P. 55-64
40. Johansson J., Mandin P., Renzoni A. et al. // *Cell.* – 2002. – Vol. 110. – P. 551-561
41. Jones S., Preiter K., Portnoy D.A. // *Mol. Microbiol.* – 1996. – V. 21. – P. 1219-1225
42. Kocks C., Marchand J.B., Gouin E. et al. // *Mol. Microbiol.* – 1995. – Vol. 18. – P. 413-423
43. Kohler S., Ekaza E., Paquet J.Y., et al. // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 1631-1634
44. Kreft J., Vazquez-Boland J.A. // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2001. – Vol. 291. – P. 145-157
45. Leimeister-Wachter M., Haffner C., Domann E. et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1990. – Vol. 87. P. 8336-8340
46. Marquis H., Hager E.J. // *Mol. Microbiol.* – 2000. – Vol. 35. – P.289-298
47. Mekalanos J.J. // *J. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174. – P. 1-7

48. Mengaud J., Dramsi S., Gouin E. et al. // *Mol. Microbiol.* – 1991. – Vol. 5. – P.2273-2283
49. Meresse S., Steele-Mortimer O., Moreno E. et al. // *Nat. Cell. Biol.* – 1999. – Vol. 1 – P. E183-E188
50. Milenbachs A., Brown D.P., Moors M., Youngman P. // *Mol. Microbiol.* – 1997. – Vol. 23. – P. 1075-1085
51. Nair S., Frehel C., Nguyen L et al. // *Mol. Microbiol.* – 1999. – Vol. 31. – P. 185-196
52. Park S.F., Kroll R.G. // *Mol. Microbiol.* – 1993. – Vol. 8. – P. 653-661
53. Pizarro-Cerda J., Moreno E., Sangoedolce V., et al. // *Infect. Immun.* – 1998. Vol. 66. – P. 2387-2392
54. Renzoni A., Klarsfeld A., Dramsi S., Cossart P. // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65. – P. 1515-1518
55. Ripio M.T., Brehm K., Lara M. et al. // *J. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179. – P. 71-74- 7180
56. Ripio M.T., Dominguez-Bernal G., Suarez M. et al. // *Res. Microbiol.* – 1996. – Vol. 147. – P. 371-384
57. Ripio M.T., Vazquez-Boland J.A., Vega Y. et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – Vol. 158. – P. 45-50
58. Robbins J.R., Barth A.I., Marquis H. et al. // *J. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 146. – P. 1333-1349
59. Rouquette C., Ripio M.T., Pellegrini E. et al. // *Mol. Microbiol.* – 1996. – Vol. 21. – P. 977-987
60. Roy C.R., Berger K.H., Isberg R.R. // *Mol. Microbiol.* – 1998. – Vol. 28. – P. 663-674
61. Stone B.J., Abu Kwaik Y. // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66. – P. 1768-1775

62. Suarez M., Gonzales-Zorn B., Vega Y. et al. // Cell. Microbiol. – 2001. – V. 3 .
– P. 853-864
63. Terry Alli O.A., Gao L.Y., Pedersen L.L. et al. // Infect. Immun. – 2000. – Vol.
68. – P. 6431-6440
64. Tobe T., Yoshikawa M., Mizuno T., Sasakawa C. // J. Bacteriol. – 1993. – Vol.
175. – P. 6142-6149
65. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P. et al. // Clin. Microbiol. Rev. –
2001. – Vol.14. – P. 584-640.
66. Williams J.R., Thayyulathil C., Freitag N. // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. –
P. 837-841