

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

3•2012

Квартальный
научно-теоретический журнал

Основан в январе 1983 г.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. В. КОСТРОВ
Зам. главного редактора Ю. М. РОМАНОВА
Ответственный секретарь Т. С. ИЛЬИНА

В. И. АГОЛ, А. Д. АЛЬТШТЕЙН, В. А. ГВОЗДЕВ, В. Н. ГЕРШАНОВИЧ,
А.Л. ГИНЦБУРГ, В. В. ДЕМКИН, Н. В. КАВЕРИН, Е. Д. КУЗНЕЦОВА (научный
редактор), С. А. ЛИМБОРСКАЯ, С. А. ЛУКЬЯНОВ, Н. Ф. МЯСОЕДОВ,
С. В. НЕТЕСОВ, Е. Д. СВЕРДЛОВ, Г. Б. СМИРНОВ, Н. И. СМЕРНОВА,
В. З. ТАРАНТУЛ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А. М. БОРОНИН (Пушино-на-Оке), В. И. ВОТЯКОВ (Минск), А. А. ПРОЗОРОВ
(Москва), Н. В. ТОМИЛИН (Санкт-Петербург), Ю. К. ФОМИЧЕВ (Минск),
С. В. ШЕСТАКОВ (Москва)

Журнал утвержден в Перечне ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Бюллетень ВАК)

Журнал полностью переводится на английский язык в США издательством ALLERTON PRESS, INC.

Сведения о статьях, публикуемые в журнале, размещаются в следующих международных информационно-справочных изданиях: *Index Medicus*, *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *Ulrich's International Periodicals Directory*, а также журнал включен в информационные продукты Thomson Reuters. Начиная с тома 23 (1) 2008 г. издание индексируется и вносится в следующие базы данных:

- Science Citation Index Expanded (известный также как SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition®
- Biotechnology Citation Index®
- Biological Abstracts
- BIOSIS Previews.



МОСКВА «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОРЫ

- Зигангирова Н. А., Нестеренко Л. Н., Тиганова И. Г., Кост Е. А.* Регуляторная роль системы секреции III типа грамотрицательных бактерий в развитии хронического инфекционного процесса 3
- Weilong Liu, Lv Li, Asaduzzaman Khan, Feizhou Zhu.* Popular Molecular Markers in Bacteria 14

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Платонов М. Е., Евсева В. В., Светоч Т. Э., Ефременко Д. В., Кузнецова И. В., Дентовская С. В., Куличенко А. Н., Анисимов А. П.* Филогеография полевочных штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов Кавказа и Закавказья 18
- Кузнецова Е. М., Волох О. А., Шепелев И. А., Никифоров А. К.* Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремийного микроба 22
- Демкин В. В., Кириллова Н. В.* Специфичные мотивы в геномах семейства *Chlamydiaceae* 26
- Дмитриев Г. В., Борисова Т. К., Файзулоев Е. Б., Забияка Ю. И., Десяткова Р. Г., Зверев В. В.* Изучение молекулярных механизмов аттенуации вируса краснухи на примере отечественного штамма С-77 28
- Ломакина Н. Ф., Батуев Ю. М.* Новый генотип вируса мешотчатого расплода у пчел *Apis mellifera* 34

REVIEWS

- Zigangirova N. A., Nesterenko L. N., Tiganova I. G., and Kost E. A.* The Role of the Type-Three Secretion System of the Gram-Negative Bacteria in Regulation of Chronic Infections
- Weilong Liu, Lv Li, Md. Asaduzzaman Khan, and Feizhou Zhu* Popular Molecular Markers in Bacteria

EXPERIMENTAL WORKS

- Platonov M. E., Evseeva V. V., Svetoch T. E., Efremenko D. V., Kuznetsova I. V., Dentovskaya S. V., Kulichenko A. N., and Anisimov A. P.* The Phylogeography of the *Yersinia pestis* Vole Strains Isolated from the Natural Foci of Caucasian Region
- Kuznetsova E. M., Volokh O. A., Shepelev I. A., and Nikiforov A. K.* The Components of Francisella tularensis Protective Antigene Complex
- Demkin V. V. and Kirillova N. V.* Specific Motifs in the Genomes of the Family *Chlamydiaceae*
- Dmitriev G. V., Borisova T. K., Faizuloev E. B., Zabiayaka J. I., Desiatskova R. G., and Zverev V. V.* Studying of Molecular Mechanisms of the Rubella Virus Attenuation Evidence from Russian Strain C-77
- Lomakina N. F. and Batuev Yu. M.* New Genotype of the Sacbrood Virus of the Honeybee *Apis mellifera*



Адрес редакции:

Москва, 115088**ул. Новоостаповская, д. 5, стр. 14****ОАО «Издательство "Медицина"»**

Редакция журнала "Молекулярная генетика, микробиология и вирусология"

Тел. редакции: (499) 264-36-66

Зав. редакцией И. Х. Измайлова

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс 8-499-264-00-90

Ответственность
за достоверность информации,
содержащейся в рекламных
материалах, несут
рекламодатели.

Редактор Е. И. Константинова

Художественный редактор
М. Б. Белякова

Корректор Л. В. Кузнецова

Переводчик С. К. Чаморовский

Все права защищены. Ни одна часть этого
издания не может быть занесена в память
компьютера либо воспроизведена любым
способом без предварительного письменного
разрешения издателя.

Сдано в набор 21.05.12
Подписано в печать 05.07.12
Формат 60 × 88½.
Печать офсетная. Печ. л. 5,00.
Усл.-печ. л. 4,90. Уч.-изд. л. 5,50.
Заказ 459.

Подписной тираж номера 198 экз.
ЛР №010215 от 29.04.97 г.
E-mail: meditsina@mtu-net.ru
www.medlit.ru

Отпечатано в типографии ООО «Подольская
Периодика»,
142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

Н. А. Зигангирова, Л. Н. Нестеренко, И. Г. Тиганова, Е. А. Кост

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ III ТИПА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития, Москва

Обзор посвящен анализу информации об участии системы секреции третьего типа (ССТТ) грамотрицательных бактерий в развитии хронического инфекционного процесса. Исследованиями последних лет показано, что в основе большинства тяжелых хронических соматических заболеваний лежит хроническое воспаление, индуцированное в первую очередь инфекционными агентами. Обсуждается роль ССТТ различных видов в переходе от острой инфекции к персистирующей. Данные клинических и бактериологических исследований показали, что микроорганизмы персистируют в форме, устойчивой к антибиотикам. Поэтому одной из перспективных мишеней для разработки антибактериальных препаратов нового поколения является ССТТ, осуществляющая транспорт факторов патогенности бактерий непосредственно в эукариотическую клетку. Наличие этой системы абсолютно необходимо для развития острого инфекционного процесса, а хронизация инфекции принципиально зависит от ее функционирования.

Ключевые слова: патогены, ингибиторы, ССТТ, хронические инфекции

Роль бактериальных хронических инфекций в инфекционной патологии человека

На рубеже XX–XXI веков медицинское сообщество было вынуждено признать, что инфекционные заболевания по-прежнему занимают 1-е место в мире по числу смертельных исходов (около 18 млн ежегодно). При этом структура инфекционных заболеваний принципиально изменилась в сторону существенного преобладания хронических форм над острыми формами течения инфекционного процесса. Более того, многочисленные клинические и микробиологические данные доказывают, что в основе большинства тяжелых хронических соматических заболеваний лежит хроническое воспаление, индуцированное в первую очередь инфекционными агентами [26], и пусковым механизмом таких широко распространенных и значимых заболеваний, как артрит, атеросклероз, астма, гастрит, язва и рак желудка, бесплодие, неврологические, аутоиммунные и ряд онкологических заболеваний являются хронические инфекции, обусловленные конкретными микроорганизмами.

Такая плохо контролируемая ситуация крайне широкой распространенности хронических инфекций сложилась во многом вследствие того, что современная медицина не имеет эффективных средств для борьбы с ними. Антибиотики и вакцинопрофилактика могут ограничивать развитие только острых форм заболевания и неэффективны для лечения хронических инфекций. Это связано с принципиальной разницей взаимодействия патогена с организмом хозяина при острой и хронической форме инфекции [49].

При острой инфекции основная стратегия микробов – размножение и распространение метаболече-

ски активного патогена, и эти процессы эффективно блокируются антибиотиками. При хронической инфекции система взаимодействия патогена и хозяина гораздо сложнее; стратегия направлена на адаптацию микроорганизма к условиям обитания внутри макроорганизма, подавление или избегание защитных реакций организма-хозяина и в результате этого длительное выживание или персистенцию (бактерионосительство) микробов в макроорганизме. Известно, что при бактерионосительстве имеет место перестройка механизмов защиты макроорганизма с формированием иммунокомпromетированного статуса (иммунологический дисбаланс, иммунологическая толерантность, дефицит местного иммунитета), т. е. создаются условия для выживания (персистирования) возбудителя, а следовательно, дальнейшего развития бактерионосительства. Снижая вирулентность или изолируясь в очагах локального иммунодефицита, бактерии могут уклоняться от факторов защиты хозяина. Подавление же факторов защиты хозяина идет за счет повышения вирулентных свойств бактерий и в результате диссеминации в иммунокомпromетированном организме. Многие виды бактерий способны факультативно паразитировать внутриклеточно, формируя внутриклеточные бактериальные сообщества и проявляя тропность к различным клеткам хозяина (например, макрофагам и эпителиальным клеткам). Внутриклеточное паразитирование бактерий основано на способности блокировать внутриклеточные механизмы иммунной защиты хозяина [6]. Персистенция как способ резервации возбудителя в организме хозяина является ключевым патогенетическим звеном в формировании хронического течения заболеваний, а также опасна в эпидемическом плане как способ распространения инфекций.

Данные клинических и бактериологических исследований показали, что микроорганизмы персистируют в форме, устойчивой к антибиотикам. Среди механизмов, определяющих толерантность персистирующих форм микробов к антибиотикам, можно выделить формирование биопленок, переход в некультивируемое состояние, образование форм с измененной клеточной стенкой и измененным метаболизмом. Сложность лечения хронических инфекций обусловлена также подавлением иммунной системы хозяина под действием длительных курсов антибиотикотерапии, в результате чего развиваются иммунодефицитные состояния, существенно усугубляющие течение хронических болезней [3].

В связи с этим разработка новых антибактериальных препаратов, эффективных в отношении хрониче-

ческих форм инфекции, является фундаментальной задачей клинической микробиологии и должна основываться на понимании молекулярных механизмов установления персистенции. Разрабатываемые препараты должны строго селективно действовать на те бактериальные мишени, которые ответственны на молекулярном уровне за базисные механизмы взаимодействия с организмом хозяина и определяют развитие самого инфекционного процесса как при острой, так и при хронической инфекции. Подавление бактериальных мишеней, которые присутствуют только у патогенных бактерий, низкомолекулярными специфическими химическими соединениями будет блокировать эти механизмы, не влияя на жизнеспособность бактерий, фактически “обезоруживая” патоген. В отличие от антибиотиков действие таких специфических ингибиторов не должно приводить к развитию генетически детерминированной устойчивости. Кроме того, специфическое связывание химических соединений с конкретным белком-мишенью даст возможность минимизировать побочные эффекты [2].

Система секреции третьего типа как перспективная мишень для поиска новых антибактериальных препаратов

Одной из перспективных мишеней для разработки антибактериальных препаратов нового поколения является система секреции третьего типа (ССТТ) патогенных грамотрицательных бактерий, с помощью которой факторы патогенности бактерий транспортируются непосредственно в эукариотическую клетку. Наличие этой структуры абсолютно необходимо для развития острого инфекционного процесса, а хронизация инфекции принципиально зависит от ее функционирования [4].

Настоящий обзор посвящен анализу современных представлений о роли ССТТ патогенных для человека бактерий в установлении хронических форм инфекции на примере возбудителей иерсиниозов, сальмонеллезов и хламидиозов.

Секреция в клетку макроорганизма белковых факторов патогенности – бактериальных молекул, ответственных за реализацию бактериями патогенных свойств, является важнейшим механизмом развития инфекционного процесса. Всего к настоящему времени описано 7 систем секреции, характеризующихся различиями в специфичности секретируемых молекул и в структуре секреторного аппарата. У многих грамотрицательных бактерий как для инвазии, так и для выживания внутри клеток хозяина наибольшее значение имеет ССТТ.

Ключевое отличие ССТТ от других систем секреции заключается в том, что перенос белков – факторов патогенности бактериальной клетки осуществляется непосредственно в цитоплазму эукариотической клетки с помощью специальной структуры, так называемого “молекулярного шприца” (инжектисомы). Такой “молекулярный шприц” присутствует только у патогенных бактерий; именно благодаря его функционированию широкий спектр бактерий с различным типом паразитирования (экзо- и эндопаразиты) реализует свои патогенные свойства [9].

ССТТ обнаружена у целого ряда грамотрицательных бактерий – возбудителей социально значимых

и особо опасных инфекций. ССТТ демонстрирует значительное сходство у таксономически далеких родов микроорганизмов, таких как *Chlamydia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Burkholderia*, *Bordetella*, *Aeromonas* и др., а также ряда патогенов, поражающих растения (*Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium*, *Pantoea*) [19].

Структура ССТТ

Данная система секреции характеризуется наличием более 20 белков, составляющих аппарат (“молекулярный шприц”) для транспорта в клетку хозяина факторов патогенности, взаимодействующих с мембраной или проникающих непосредственно в цитоплазму клетки хозяина и изменяющих ее нормальное физиологическое состояние, способствуя инвазии и внутриклеточному размножению патогена [20].

“Молекулярный шприц” состоит из следующих элементов (рис. 1). Во внутренней мембране бактерий расположена кольцевая белковая структура, играющая основную роль в распознавании секретируемых молекул, в инициации процесса секреции и его энергетическом обеспечении. Эта белковая структура состоит из базального тела и окружающих

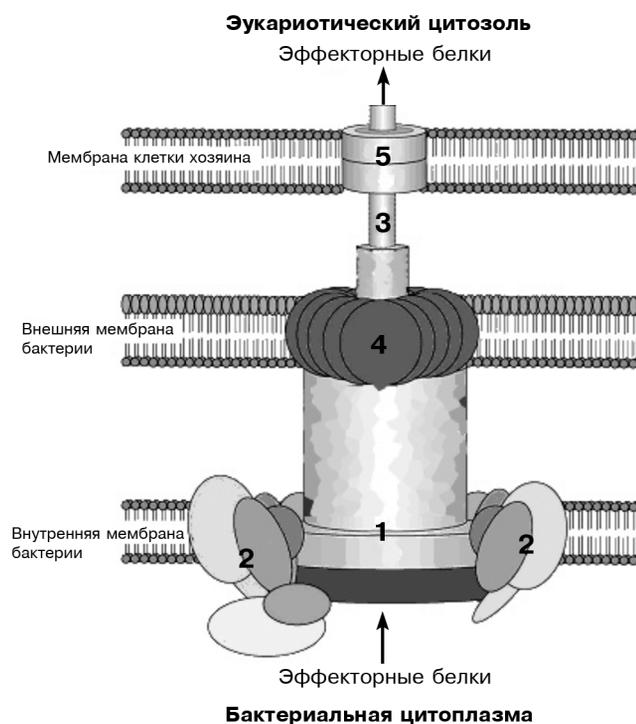


Рис. 1. ССТТ грамотрицательных бактерий.

1 – базальное тело; кольцевая белковая структура, расположенная во внутренней части клеточной стенки бактерии; 2 – экспортер: комплекс белков внутренней части клеточной стенки бактерии, обеспечивающих активный транспорт факторов патогенности бактерий (эффекторных белков) внутрь белкового канала (иглы); 3 – игла: белковый канал, проходящий через наружную часть клеточной стенки бактерии, служащий для переноса эффекторных белков в инфицируемую клетку; 4 – секретон: кольцевая белковая структура, участвующая в транспорте эффекторных белков через внешнюю часть клеточной стенки бактерии в инфицируемую клетку; 5 – транслокон: белковая структура, формирующая пору в мембране инфицируемой клетки.

его белков-экспортеров, обеспечивающих активный транспорт белков в периплазматическое пространство. Непосредственно к этой базальной структуре присоединен белковый канал, проходящий через пептидогликан и наружную мембрану бактериальной клетки. В наружной мембране канал фиксируется кольцевыми белковыми структурами (секретон). Секретон состоит из ряда белков наружной мембраны бактерии, участвующих в транспорте эффекторных белков и компонентов транслокона через внешнюю мембрану бактерии. Над поверхностью микробной клетки выступает белковая структура – игла и транслокон, формирующий пору в мембране эукариотической клетки [11]. Длина иглы ССТТ около 60–80 нм, диаметр 8 нм. Диаметр отверстия в игле равен примерно 3 нм. Одна бактерия может иметь несколько сотен структур ССТТ.

Бактериальные белки, секретлируемые из цитоплазмы бактерии, попадают через иглу “молекулярного шприца” в цитоплазму клетки-хозяина, преодолевая три мембраны: внутреннюю и внешнюю мембраны грамотрицательных бактерий и мембрану эукариотической клетки.

Большая часть генов, кодирующих белки ССТТ, локализована в хромосомных регионах, называемых островами патогенности. Острова патогенности содержат гены, кодирующие структурные и эффекторные белки, шапероны, а также регуляторные элементы ССТТ. Острова патогенности ограничены повторами нуклеотидных последовательностей и снабжены механизмами, позволяющими осуществлять горизонтальный перенос генов.

Эффекторные белки, секретлируемые через иглу, должны быть распознаны. Распознавание осуществляется через “сигнал секреции” – небольшую последовательность аминокислот, расположенную на N-конце белка, которая распознается белками-экспортерами. Эта последовательность никогда не отщепляется от белка, как это может происходить в других секреторных системах.

Ключевыми структурными элементами ССТТ являются: мономер иглы, мономер внутреннего стержня, белки базального тела, белок кончика иглы, белок, ответственный за определение длины иглы, АТФаза, которая предоставляет энергию для секреции. Эти элементы содержатся во всех ССТТ различных бактерий, являясь очень консервативными, схожими друг с другом [36].

Функционирование ССТТ

Контактирование иглы с клеткой хозяина запускает секрецию. Секреция также может индуцироваться снижением концентрации ионов кальция, добавлением различных специфических веществ или повышением температуры. Секреция белков происходит за счет протон-движущей силы, так же, как движение жгутиков. Большинство секретлируемых белков должны проходить через иглу в денатурированном состоянии, которое они приобретают под воздействием АТФазы в базальном теле [22]. Секреция белков требует присутствия специальных шаперонов. Внутри семейства шаперонов ССТТ белки имеют очень небольшую гомологию или не имеют ее вовсе, так же, как они не имеют гомологии с АТФ-зависимыми

шаперонами теплового шока. Каждый шаперон взаимодействует только со своим специфическим белком-эффектором; отсутствие определенных шаперонов приводит к уменьшению или прекращению секреции соответствующих эффекторов. Шапероны и их эффекторы обычно кодируются генами, расположенными рядом. Рентгеноструктурный анализ белков YopE (белок иерсиний) и SptP (белок *Salmonella enterica*) в комплексе со специфическими шаперонами показал удивительное пространственное сходство, несмотря на отсутствие гомологии, что говорит об универсальном характере взаимодействия между шаперонами ССТТ и эффекторами [10, 45].

Эффекторы ССТТ входят в “молекулярный шприц” в базальном теле и движутся по игле в направлении клетки хозяина. Сначала секретированы особые белки эффекторы – транслокаторы, которые создают пору в мембране клетки хозяина (транслокон), через которую могут пройти другие эффекторы. Мутантная бактерия, у которой нет транслокаторов, может секретировать белки, но не может доставить их в клетку хозяина. Некоторые транслокаторы играют двойную роль: после того как они сформировали пору, белки транслоцируются в клетку и выполняют функцию эффекторов.

Взаимодействие эффекторных белков ССТТ с эукариотической клеткой

В единственную эукариотическую клетку могут быть транспортированы до 100 различных эффекторных белков. Эффекторные белки иерсиний, сальмонелл и хламидий являются одними из наиболее хорошо изученных (см. таблицу).

Эффекторы часто бывают multifunctionальными и могут взаимодействовать друг с другом, вызывая согласованный ответ клетки хозяина. Эффекторные белки разных патогенов эволюционно далеки и выполняют различные функции в клетке, воздействуя на основные физиологические процессы эукариотической клетки.

Для развития инфекции бактерии должны проникнуть в клетку хозяина, чтобы там реплицироваться. Для этого бактериальные эффекторы воздействуют на механизм полимеризации актина, что приводит к перестройке цитоскелета и преобразованию мембраны эукариотической клетки, так называемому рифлению [42]. Внутри клеток хозяина патогены секретуют эффекторы ССТТ, позволяющие им регулировать созревание фагосомы, избегая действия лизосомальных ферментов, контролировать биогенез патогенсодержащих фагосом, обеспечивая внутриклеточное выживание и распространение в другие клетки инфицированных тканей.

Эффекторы ССТТ также влияют на клеточный цикл, и некоторые из них способны индуцировать механизм гибели клетки. Это может происходить вследствие активации некоторых проапоптотических белков эукариотической клетки, например, каспаз; ингибирования антиапоптотических факторов, таких как NF-κB и MAP (Mitogen Activating Protein)-киназ; индукции лиганд-рецепторной системы [49]. Индукция апоптоза макрофагов защищает бактерии от фагоцитоза, способствуя их выживанию. В том случае, когда макрофаги защищают мукозный слой от про-