

А.Г. Дьяченко¹, А.А. Демьянова¹, И.М. Балута², И.Ю. Кучма²,
В.В. Леизин², А.Ю. Волянский²

¹Сумский государственный университет, ул. Р. Корсакова, 2, Сумы, 40007,
Украина, e-mail: ag_dyachenko@list.ru

²ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины»,
ул. Пушкинская, 14, Харьков, 61057, Украина, тел.: (057) 717-98-67

ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ САЛЬМОНЕЛЛ И ПАТОГЕНЕЗ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Проведен анализ современных литературных данных, касающихся механизмов развития ограниченной и системной сальмонеллезной инфекций. Замечательная способность сальмонелл уже через несколько минут после поглощения инфицированной пищи проникать в фагоциты и энтероциты и далее по всему телу обеспечивается набором из нескольких десятков эффекторов (всего бактериальный геном включает около 4500 генов), чья координированная экспрессия способствует внутриклеточному выживанию и репликации бактерий. Основная часть эффекторов связана с островами патогенности сальмонелл, SPI-1 и SPI-2. Кроме того, многие штаммы сальмонелл содержат в составе геномов другие локусы патогенности, контролирующие бактериальную адгезию, инвазию, инфекцию, устойчивость к антимикробным средствам. Серьезная угроза, которую представляет собой сальмонеллез, является стимулом для дальнейшего его изучения и совершенствования инфраструктуры общественного здравоохранения.

Ключевые слова: сальмонеллез, *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, *Salmonella enterica* серовар *Enteritidis*, патогенез.

Salmonella enterica является членом семейства *Enterobacteriaceae*, большой группы грамотрицательных факультативных анаэробов, большая часть которых входит в состав кишечной микробиоты позвоночных. Из известных на сегодняшний день более, чем 2500 сероваров *S. enterica* лишь некоторые ассоциированы с заболеваниями людей, которые обычно протекают в виде самоограниченного или более серьезного гастроэнтерита, либо в виде тифа/паратифа. *S. enterica* (серовары *Typhimurium* и *Enteritidis*) является одной из наиболее частых причин диарейных заболеваний у людей, а также важным патогеном сельскохозяйственных животных, включая телят, свиней и цыплят. Сальмонеллы являются факультативными внутриклеточными паразитами, в организм человека поступают с мясом инфицированных животных или из окружающей среды. После поглощения пищи и кишечной колонизации сальмонеллы



внедряются в слизистую кишечника несколькими путями: бактерии могут поглощаться примированными М-клетками, они могут быть захвачены в просвете кишечника CD18+ фагоцитами, проникшими через эпителиальный монослой, дендритными клетками (ДК) или могут самостоятельно проникнуть в нефагоцитирующие энтероциты. При интернализации в нефагоцитирующие клетки сальмонеллы формируют внутриклеточное фагосомальное образование (*Salmonella*-containing vacuole, SCV). Созревающая SCV переносится к аппарату Гольджи селективным внутриклеточным путем. Располагаясь в перинуклеарной зоне, заключенные в SCV бактерии размножаются, формируя структуры — филаменты (*Salmonella*-induced filaments, Sifs). Хотя большинство инфицирующих сальмонелл остаются локализованными в кишечнике, где они вызывают воспалительные ответы, включая диарею, при системных заболеваниях сальмонеллы достигают субмукозы, интернализуются резидентными макрофагами, частично выживают в них и быстро диссеминируют с кровотоком, накапливаясь в мезентериальных лимфоузах и, в конечном итоге, в селезенке [45]. Способность бактерий выживать в разных типах клеток хозяина определяет успех инфекции, является атрибутивным признаком паразитизма сальмонелл. Основные этапы сальмонеллезной инфекции представлены на рисунке 1. Исход ее зависит от большого набора факторов паразита и хозяина, анализу которых посвящен настоящий обзор.

Инфекция и колонизация кишечника. Сальмонеллезная инфекция передается фекально-оральным путем. Инфекционная доза составляет от 30 до 100 микроорганизмов и более и зависит от характера поглощенной пищи и напряженности факторов врожденного иммунитета [49]. Высокое содержание жира в пище уменьшает дозу инфекта [21]. Чтобы достичь места колонизации сальмонеллы должны преодолеть неблагоприятную среду желудка, включая действие сильных неорганических кислот. Сальмонеллы используют механизмы, которые позволяют выживать при низких значениях рН и в присутствии сильных кислот. Многие из экспрессируемых шоковых белков ассоциированы с участком генома ATR (acid tolerance response), обеспечивающим устойчивость к кислотам. Белки RpoS и PhoP Q важны для выживания при низких значениях рН, вызываемых неорганическими кислотами, в то время как белки FliC и RpoS участвуют в регуляции толерантности к органическим кислотам [3]. Вслед за проникновением в организм бактерии колонизируют множество сайтов, включая тонкий кишечник, толстую и слепую кишки. Адгезия осуществляется посредством ворсинок (фимбрий) или пилей, имеющих на поверхности бактерий. Геном сальмонелл содержит 13 локусов, предположительно кодирующих ворсинки, многие из которых индуцируются *in vivo* и требуются для образования биопленки, прикрепления к клеткам хозяина и колонизации, но не для выживания внутри этих клеток [20]. Идентифицировано несколько типов фимбрий, участвующих



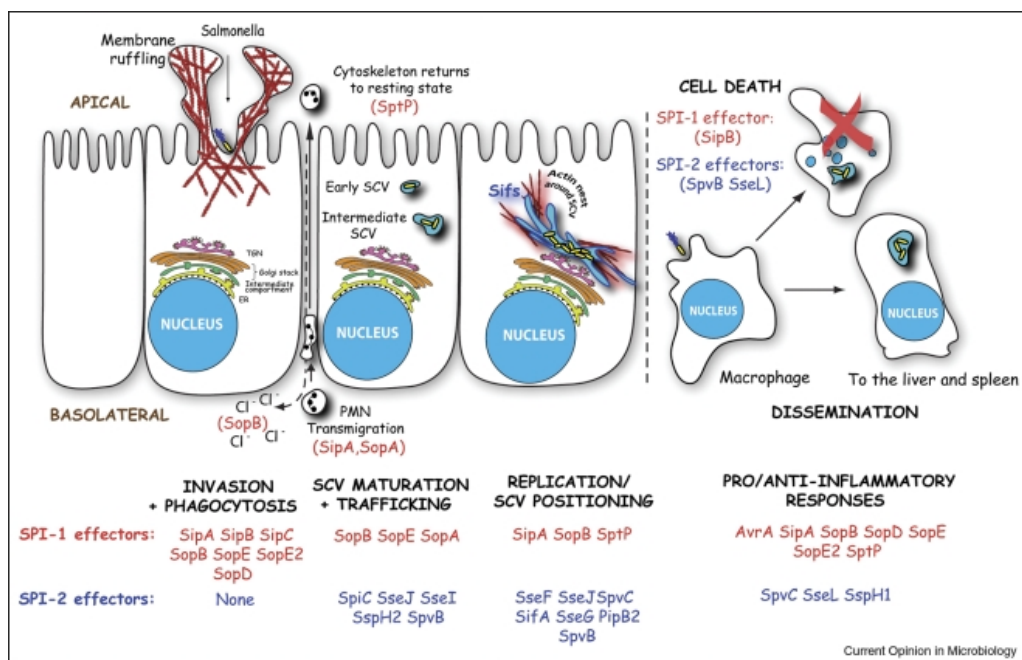


Рис. 1. Основные этапы сальмонеллезной инфекции

Бактерии проникают в нефагоцитирующие клетки посредством индукции деформации мембраны, реаранжировки подлежащего актинового цитоскелотона (образование складок) и включения возбудителей во внутриклеточные фагосомальные образования (SCV). Эти вакуоли переносятся в перинуклеарную область клетки хозяина, где и созревают. Вслед за размещением SCV вблизи аппарата Гольджи начинается репликация внутриклеточных бактерий. При этом образуются тубуло-везикулярные структуры (Sifs), и накапливается актин вокруг бактериальной фагосомы. Секретия Cl⁻ и миграция полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) способствуют развитию кишечного воспаления и диареи. Параллельно сальмонеллы модифицируют иммунные ответы хозяина. При системной инфекции возбудители инфицируют кишечные макрофаги, индуцируя их гибель, или используют их для распространения через кровь или лимфу, достигая печени и селезенки. Эффекторы SPI-1 и SPI-2 играют ключевую роль в созревании, позиционировании и репликации SCV [32].

Fig. 1. Schematic representation of the major stages underlying Salmonella infection

Bacteria invade non-phagocytic cells by inducing membrane deformation and rearrangement of the underlying actin cytoskeleton (membrane ruffling), enclosing bacteria in intracellular phagosomal compartments termed Salmonella-containing vacuoles (SCVs). SCVs traffic towards the perinuclear region of the host cell and mature there. Once the SCV is positioned next to the Golgi apparatus, intracellular bacterial replication begins. This stage is characterized by the formation of SCV tubulovesicular structures called Salmonella-induced filaments (Sifs) and the accumulation of F-actin around the bacterial phagosome (actin nest). Chloride ion (Cl⁻) secretion and polymorphonuclear leukocyte (PMN) transmigration cause diarrhoea and intestinal inflammation. In addition, Salmonella modifies specific host immune response pathways. Salmonella serovars associated with systemic disease are able to enter intestinal macrophages, inducing cell death as well as using them as a vehicle to disseminate to the liver and spleen via the bloodstream and lymphatic system. SPI-1 and SPI-2 effectors are involved in each stage of SCV maturation, positioning and replication [32].

в колонизации, в том числе фимбрии 1 типа (Fim), длинные полярные фимбрии (Lpf), тонкие фимбрии и кодируемые плазмидами фимбрии (Pef) [8]. Fim связывается со специфическими D-маннозными рецепторами на поверхности клеток разных типов. Эти фимбрии кодируются 7 генами (fimAICDHF). Основная структурная единица — FimA, FimH — субъединица, которая взаимодействует с поверхностными клеточными рецепторами, усиливая присоединение [8]. Этот адгезин также опосредует независимое от первой системы третьего типа (Т3SS-1) поглощение сальмонелл дендритными клетками [16]. Другие типы фимбрий также обнаруживают определенную тропность: Lpf связывается с поверхностью Пейеровых бляшек и М-клеток, Pef связывается с ворсинками кишечника.

Инвазия в эпителиальные нефагоцитирующие клетки хозяина.

Интернализация сальмонелл в клетки хозяина происходит посредством двух различных процессов. Профессиональные фагоциты, такие как макрофаги, используют фагоцитоз для эффективного распознавания и поглощения бактериальных патогенов. Кроме того, сальмонеллы могут активно внедряться как в фагоцитирующие, так и в нефагоцитирующие клетки, используя т.н. системы секреции. Фагоцитоз грамотрицательных бактерий является сложным процессом, в который вовлечено множество рецепторов, часть из которых повышает эффективность поглощения, а другие активируют различные сигнальные пути фагоцитоза. Специфические рецепторы распознают молекулы, ассоциированные с патогенами, включая липополисахарид (ЛПС) и флагеллин, и связываются с лигандом на поверхности клетки или внутри фагосомы, воздействуя тем самым на созревание фагосомы, экспрессию сигналов и генов [25]. В то время как фагоцитоз является важнейшей функцией врожденного иммунитета, рассчитанной на применение к максимально широкому кругу различных патогенов, опосредованная системами секреции инвазия сальмонелл в эпителиальные клетки — высоко специфический процесс, который зависит от точной регуляции экспрессии ряда бактериальных факторов [22]. Известны несколько систем секреции. Так, два больших белка, VarA и SiiE, ассоциированных с поверхностной мембраной, принимают участие в инвазии/адгезии и переносятся посредством *систем секреции 1 типа*, VarBCD и SiiCDF соответственно [14]. Однако основным механизмом, используемым бактериями для проникновения в клетку, является Т3SS-1.

Вслед за контактом с клеткой-хозяином сальмонеллы начинают экспрессировать гены, расположенные в пределах первого и второго островов патогенности, SPI-1 и SPI-2. Значительная часть из них входит в состав Т3SS, которая принимает самое активное участие в инвазии сальмонелл. Главным регуляторным белком Т3SS является HilA, экспрессия которого связана с рядом внешних факторов, важных для выживания клетки. Т3SS обеспечивает транспорт факторов вирулентности сальмонелл прямо в клетку хозяина и включает по меньшей мере 20



структурных и регуляторных белков, участвующих в инвазии. Базовая структура комплекса охватывает мембраны бактерии и клетки, а иглоподобная структура выдвигается из базовой, взаимодействуя с клеткой хозяина (рис. 2). Внутри «иглы» находится палочковидная структура, которая формирует канал между бактериальной цитоплазмой и мембраной клетки хозяина. На цитоплазматической (бактериальной) стороне ТЗСС структуры располагаются части экспортной системы, содержащей АТФазный комплекс, который ускоряет транспорт эффекторных молекул через внутренний канал в транслоказный комплекс, находящийся на клеточной мембране [22, 32]. Гены, кодирующие ТЗСС комплекс, ассоциированы с локусом SPI-1, который детерминирует и другие факторы вирулентности (адгезины, инвазины, токсины). Помимо регуляторных и эффекторных генов расположенный на SPI-1 комплекс ТЗСС содержит структурные гены *prgHIJK*, *spaMNOPQRS*, *invABCEFGH*.

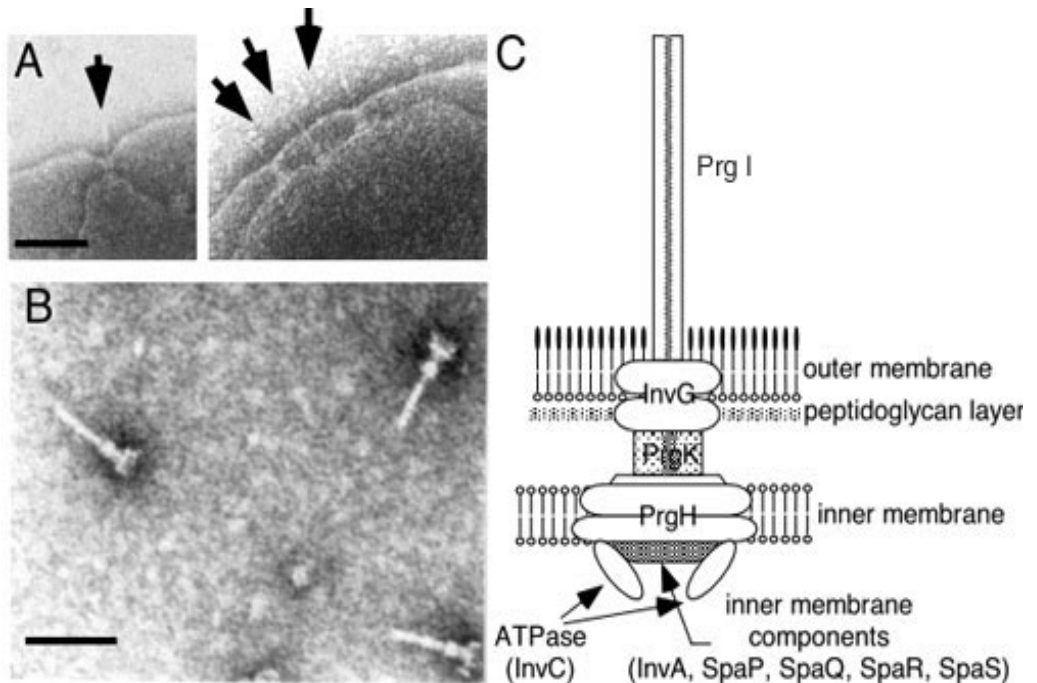


Рис. 2. Система секреции третьего типа *S. Typhimurium*

(А) Электронная микрография *S. Typhimurium*, разрушенной осмотическим шоком, с иглоподобными комплексами на бактериальной мембране (стрелки). (В) Электронная микрография очищенных иглоподобных комплексов. (С) Гипотетическая схема иглоподобного комплекса *S. Typhimurium* и его компонентов. Масштаб 100 нм [26].

Fig. 2. *S. Typhimurium* type III protein secretion system

(A) electron micrograph of the surface of *S. Typhimurium* destroyed by osmotic shock with needle-like complex on bacterial membrane (arrows) (B) electron micrograph of the purified needle-like complex (C) Hypothetical scheme of the *S. Typhimurium* needle-like complex and its components. Scale 100 nm [26].

Сборка ТЗСС начинается с внутренней кольцевой структуры, которая охватывает клеточную мембрану и собирается из субъединиц PrgH и PrgK [12]. Затем из белков InvA, InvC, SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS собирается цитоплазматическое экспортное устройство. Одновременно из белков InvG и InvH на внешней мембране собирается внешняя кольцевая структура, которая соединяется с внутренней при помощи регуляторного белка InvJ. Завершается сборка присоединением иглоподобной и палочковидной структур, составленных из субъединиц PrgJ и PrgI [12]. Завершенная ТЗСС структура перемещает эффекторный белок из бактериальной цитоплазмы в клетку хозяина. В бактериальной цитоплазме молекулы-шапероны связываются с эффекторными белками и сопровождают их в экспортную систему ТЗСС. Шапероны взаимодействуют с АТФазой, что позволяет эффекторам отделяться от шаперонов и проникать в «иглу» и далее в клетку хозяина. Процесс переноса осуществляется при помощи транслоказы, встроенной в мембрану клетки хозяина. Белки этого комплекса продуцируются бактерией и являются частью начальных эффекторных молекул, секретируемых ТЗСС. Белки «иглы» взаимодействуют с транслоказой в переносе бактериальных белков в цитозоль хозяина [12].

Не менее 15 белков переносятся посредством ТЗСС-1 в клетки хозяина [32]. В результате этого четко скоординированного процесса небольшая группа эффекторных белков, кодируемых в пределах SPI-1 (SipA, SipC, SopB/SigD, SopD, SopE2 и SptP), кооперативно индуцирует деформацию мембраны и драматическую реаранжировку подлежащего актинового цитоскелета, вследствие чего происходит массивное локальное образование мембранных морщин (*ruffles*), сопровождающееся быстрой интернализацией бактерий в SCVs [32]. Остальные эффекторы связаны с процессами, протекающими после инвазии, включая выживание в клетке-хозяине, биогенез SCV и модулирование воспалительного ответа.

С-терминальный компонент SPI-1 ТЗСС локуса SipC непосредственно управляет сборкой актина, ведущей к быстрому росту филаментов [17]. SipA (SspA) повышает эффективность инвазии в клетки культуры [17] и усиливает проявления энтероколита *in vivo* [27]. SipA способствует полимеризации актина, уменьшая критическую для сборки его концентрацию, и соединяется с F-актином с высокой аффинностью, что приводит к механической стабилизации филаментов [17, 33]. Кроме того, SipA потенцирует нуклеацию актина, повышает активность клеточного белка T-пластин (фимбрин) и предотвращает связывание клеточного актин-деполимеризующего белка АДФ/кофилин с F-актином, одновременно разрушая уже образовавшиеся комплексы [33]. В отличие от SipA и SipC, SopE и SopE2 не связывают актин. Они модулируют цитоскелет опосредованно через обмен гуанина наподобие клеточных гуанин-обменных факторов (GEFs) [40]. Они, в частности, катализируют замену связанного ГДФ на ГТФ, что необходимо для активации клеточной Rho-ГТФазы. Это, в свою очередь, запускает сборку актинового цитоскелета через Agr2/3.



In vitro SopE и SopE2 имеют различные субстратные специфичности: SopE активирует Rac-1 и Cdc42, а SopE2 обнаруживает специфичность только к Cdc42 [40]. SopE-зависимая активация только Rac-1 кажется вполне достаточной для бактериальной инвазии.

Инозитолфосфатаза SopB (SigD) дефосфорилирует ряд инозитолфосфатных субстратов *in vivo* и *in vitro* [27, 40]. Подавление активности SopB инозитолфосфатазы ослабляет индуцированную сальмонеллами реорганизацию цитоскелетона [40]. SopB-зависимая стимуляция клеточного фактора SGEF (SH-содержащий GEF) приводит к активации небольшой ГТФазы RhoG, которая принимает активное участие в перестройке актина, происходящей во время инвазии сальмонелл [41]. Другой эффектор, SopD, кооперирует с SopB, помогая в расщеплении мембраны и формировании макропиносом [2]. Каждая из этих функций, как полагают, зависит от синтеза специфических фосфатидов в местах локализации SopB, т.е. плазме и SCV мембранах.

Другими T3SS-1 эффекторами, участвующими в биогенезе SCV/Sif, являются тирозинфосфатаза SptP, которая дефосфорилирует AAA+ АТФазу VCP [19] и требуется для выключения образования складок после инвазии, и SipA, который причастен к морфологии и перинуклеарному позиционированию SCV, и, как показано, кооперирует с SPI-2 эффектором SifA [5].

После поглощения сальмонелл клеточный цитоскелетон возвращается к состоянию покоя. Это событие управляется N-терминальным ГТФаза-активирующим (GAP) доменом SptP. Это стимулирует базальную активность SopE/SopE2/SopB-активированных Cdc42 и Rac-1, приводя к снижению их активности [40].

Созревание и перенос вакуоли, содержащей сальмонеллы. Вслед за интернализацией и формированием SCV, на ее поверхности накапливаются ранние эндосомальные клеточные маркеры, например, трансферриновый рецептор (TfnR), ранний эндосомальный антиген 1 (EEA1), и несколько Rab ГТФаз, таких как Rab4, Rab5 и Rab11, а SCV созревает Rab7-зависимым образом [47]. Затем эти маркеры быстро удаляются и через 60–90 мин после инвазии SCV интенсивно обогащаются маркерами поздних эндосом и лизосом, включая Rab7, вакуолярную АТФазу (v-АТФаза) и лизосомальные мембранные гликопротеины (lpgs), в том числе LAMP-1 [47]. Для вовлечения Rab5 в созревание SCV требуются SopE и SopB. Эти и другие данные предполагают, что SopB играет ключевую роль в реализации собственного, отличного от эндосом пути созревания SCV. Помимо этого SopB требуется для активации Akt [27], который в свою очередь деактивирует Rab14 GAP, AS160. Активированный Rab14 повышает репликацию внутриклеточных сальмонелл, возможно, препятствуя слиянию SCV и лизосом. SpiC, как полагают, также предотвращает слияние макрофагальных поздних эндосом/лизосом с SCV [47]. Это позволяет сальмонеллам избегать гибели от воздействия фаголизосом,



что играет ключевую роль в инвазивной инфекции. Поэтому способность бактерий выживать и пролиферировать в SCV является главным фактором вирулентности сальмонелл.

SPI-1 эффектор *SopA*, структурно и функционально напоминающий клеточную НЕСТ E3 убиквитинлигазу, способствует выходу бактерий из SCV посредством нарушения ее целостности [47]. Через несколько часов после инфекции клеток хозяина F-актиновая сеть собирается вокруг репликативной SCV и стабилизируется под действием *SipA* [42, 47]. Несколько SPI-2 эффекторов регулируют динамику ассоциированного с SCV актина [42].

Инвазивная сальмонеллезная инфекция ассоциирована с T3SS-2, которая кодируется в пределах SPI-2. Гены T3SS-2 экспрессируют только при внутриклеточной локализации SCV. Хотя роли индивидуальных T3SS-2 эффекторов остаются во многом неопределенными, некоторые из них участвуют в позиционировании SCV и образовании Sifs, которые распространяются с поверхности поздних SCV (≥ 6 ч после инфекции) в эпителиальные клетки. Другие гены требуются для функционирования структуры T3SS: аппарата секреции (*sscG*), секреции эффекторов (*sseABCDEF*), шаперонов (*sscAB*) и регуляторов (*ssrAB*). Экспрессия генов SPI-2 T3SS регулируется двухкомпонентной системой *SsrA-SsrB*, которая в свою очередь управляется второй двухкомпонентной системой *OmpR-EnvZ* [13].

Активированные гены в составе T3SS-2 принимают участие в переносе эффекторов из цитоплазмы сальмонеллы через SCV мембрану к мишеням в клетке-хозяине. Многие эффекторный белки T3SS-2 участвуют в образовании и сохранении SCV. Так, *SseF* и *SseG* требуются для сохранения SCV и внутриклеточной репликации [44]. *SifA* необходим для образования Sif и сохранения структуры SCV мембран: мутанты, лишённые *SifA*, размножаются в цитозоле [4]. Два других T3SS-2 эффектора, *PipB2* и *SseJ*, кооперируют с *SifA* с участием клеточных белков. *PipB2* вместе с кинезином участвует в перемещении микротрубочек от поверхности перинуклеарной SCV к периферии клетки-хозяина [23]. SPI-2 эффектор *SseJ* требуется для реализации вирулентности при системной инфекции и локализации SCV. Эффектор обладает деацетилазной активностью *in vitro*, а во время сальмонеллезной инфекции он эстерифицирует холестерол, входящий в состав SCV мембран.

Перемещение SCV и образование сальмонелла-индуцированных филаментов (Sifs). Во время созревания SCV мигрирует от периферии клетки к перинуклеарной области клетки хозяина, используя взаимодействующий с *Rab7* лизосомальный белок (RILP), который, в свою очередь, ассоциирован с микротубулярным мотором — динеином [15]. Нахождение SCV в перинуклеарном регионе поблизости от МТОС важно для бактериальной репликации [44]. Близость SCV к аппарату Гольджи способствует воздействию на транспортные везикулы. Для переадресо-

вки транспортных везикул к SCV требуются SifA, SseG и SseF. SseG и SseF удерживают SCV в перинуклеарной области, образуя функциональный комплекс [24], который привязывает SCV к аппарату Гольджи или управляют активностью динеина [9]. Напротив, SifA связывает клеточный белок SKIP (SifA и кинезин-взаимодействующий белок), снижая активность PipB2-индуцированного привлечения двигательного кинезина микротрубочек к SCV [18]. Эффективное присоединение SifA к SCV медируется SPI-1 эффектором SipA [6]. Для удержания SCV в перинуклеарной области клетки требуется также SopB-медирированное фосфорилирование связанной с актином легкой цепи моторного миозина II (MLC) через сигнальный путь Rho/ROCK/MLC [50].

Вслед за позиционированием SCV начинается репликация бактерий. Начало ее сопровождается появлением специализированных тубовезикулярных структур-филаментов (Sifs) [11]. Как полагают, образование Sifs является результатом расщепления SCV посредством поздних эндосом/лизосом, для чего необходим эффектор SifA [47]. Его краткая суперэкспрессия достаточна, чтобы индуцировать набухание и агрегацию поздних эндосом и формирование Sif-подобных структур в животных клетках [47]. Кодированный SPI-2 эффектор PipB2 также способствует расширению сети Sif в основном за счет прямого взаимодействия с кинезином-1 [18]. SseG и SseF усиливают образование Sif, модулируя агрегацию эндосомального компартмента. Напротив, SseJ и SpvB являются антагонистами образования Sif. Мутации в этих генах увеличивают число Sifs [9]. Экспрессия SseJ фактора приводит также к потере целостности SCV.

Модулирование врожденного иммунного ответа и смерть клетки-хозяина. Одним из главных клинических признаков сальмонеллезной инфекции является диарея, которая вызывается перенесенными посредством T3SS белками. SopB играет важную роль в активации секреторного пути привлечения нейтрофилов к местам инфекции и изменении ионного баланса в клетках. SPI-1 эффекторы дополнительно индуцируют острое кишечное воспаление. Стимуляция Cdc42 под действием SopE/SopE2, SopB во время инвазии сальмонелл ведет к зависимой от Raf1 индукции Erk, Jnk и p38 митоген-активированных протеинкиназных (МАРК) путей и последующей активации факторов транскрипции AP-1 и NF-κB [40,41]. Это приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, включая IL-8, привлечению полиморфно ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ). Одновременно N-терминальный регион SipA включает новые сигнальные каскады Atf6 и фосфолипазы D, которые активируют протеинкиназу Ca, что приводит к апикальной секреции мощного ПМЯЛ хемоаттрактанта — гепоксилина A3 [27]. Он способствует трансмиграции ПМЯЛ через эпителий в просвет кишечника, которая, возможно, усиливается E3-убиквитинлигазной активностью SopA [10]. Трансмиграция ПМЯЛ способствует распространению сальмонелл фекально-оральным путем. Продукция Ins(1,4,5,6)



P4 через SopB инозитолфосфатазную активность также вносит вклад в индукцию диареи, усиливая секрецию клеточных ионов хлора и истечение жидкости [27, 40]. Нарушение тесного контакта эпителиальных клеток, который обеспечивается SopE/SopE2, SopB и SipA, также содействует истечению жидкости и трансмиграции ПМЯЛ [5], в то время как другой SPI-1 эффектор, AvgA, подавляет эту активность [28].

Воспалительный эффект далее усиливается гибелью макрофагов вследствие апоптоза, который индуцируется эффектором SipB. Этот процесс может быть следствием прямой активации каспазы-1 либо осуществляется через каспаза-1-независимый путь [27, 28]. Наконец, SpvB и SseL индуцируют более медленный SPI-2-зависимый путь клеточной смерти [7].

Сальмонелла вырабатывает эффекторы, подавляющие клеточные иммунные ответы, в основном нейтрализуя ядерные факторы транскрипции, стимулирующие экспрессию генов.

Детерминанты вирулентности сальмонелл, влияющие на их внутриклеточную выживаемость. Вдобавок к вирулентным факторам, локализованным в пределах SPI-1 и SPI-2 T3SS, у сальмонелл имеются и другие факторы, такие как фимбрии, флагеллы и системы транспорта ионов, которые играют важную роль в установлении и сохранении внутриклеточной ниши. Гены многих из этих факторов находятся в плаزمиде.

Жгутики (флагеллы). Связанная с флагеллами подвижность повышает инвазивность сальмонелл [44]. Структура флагелл включает базальное тело, крюк и филамент. У сальмонелл формирование жгутиков контролируют свыше 50 генов. Экспрессия этих генов организована в три уровня. На вершине иерархии находится оперон 1 класса flhDC, который необходим для экспрессии всех генов флагеллярного каскада. Ряд глобальных регуляторных факторов влияют на экспрессию flhDC. Опероны класса 2 содержат гены, кодирующие структурные белки жгутиков и несколько регуляторных белков, а также компоненты флагелла-специфического T3SS экспортного механизма. Гены оперонов 3 класса участвуют в образовании филаментов, вращении жгутиков и хемотаксисе [30]. Основным белком филаментов, флагеллин, существует в двух антигенно различных формах, кодируемых генами fliB fliC [30]. Он переносится из цитоплазмы в базальное тело посредством флагеллин-специфической T3SS-1. Там он далее полимеризуется при помощи кэп-белка FliD [30]. В то же время флагеллиновые мономеры являются мощными индукторами врожденного иммунитета [34]. FliC включает путь передачи сигнала через Toll-подобные рецепторы 5 (TLR5), что приводит к активации инфламмосомы и опосредованной каспазой-1 смерти клетки [35]. В кишечном эпителии флагеллин индуцирует воспаление, ингибируя в то же время апоптоз через TLR5.

Плазмиды вирулентности. Известно, что плазмиды могут переносить кластеры генов, обеспечивающих селективные преимущества своим



хозяевам, такие как вирулентность или устойчивость к антибактериальным препаратам. Очень многие штаммы сальмонелл лишены плазмид вирулентности, однако наиболее важные для здоровья людей серовары, включая *Typhimurium* и *Enteritidis* имеют такие плазмиды. Эти плазмиды несут генетический локус, содержащий гены *spvRABCD*. Два гена, *spvB* и *spvC*, кодируют главные плазмидные факторы вирулентности, связанные с сероваром *Typhimurium*. Они переносятся в клетки хозяина через T3SS-2 [31]. Другие гены, расположенные на плазмиде вирулентности, кодируют фимбрии (*refABCDI*) и резистентность к сыворотке (*traT*). Большинство вирулентных плазмид не способны к самопереносу в другие бактерии, хотя некоторые из них содержат полный комплект транспортных генов (*tra*) обеспечивающих такую возможность путем конъюгации, что приводит к повышению вирулентности штамма-реципиента. Плазмиды являются высоко консервативным генетическим образованием, что придает штаммам-носителям значительные преимущества.

Супероксиддисмутаза. Многие клетки хозяина продуцируют высоко реактивные дериваты кислорода в основном благодаря активности фагосомальной NADPH оксидазы (NOX2). Эти формы кислорода необходимы для уничтожения внутриклеточных патогенов. Чтобы противостоять этой активности, сальмонеллы используют супероксиддисмутазу, *SodCI*. Этот связанный с периплазмой фермент обладает устойчивостью к протеазам, что позволяет ему функционировать в суровых условиях фагосомы [38].

Транспорт ионов. В эукариотическом хозяине доступность железа ограничена вследствие активности железо-связывающих белков, таких как трансферин и *Ngmp 1/Slc11A1*, дивалентного металлопротонового импортера, находящегося в макрофагах, нейтрофилах и ДК [37]. Чтобы преодолеть это ограничение, сальмонеллы в ответ на нехватку железа продуцируют два сидерофора: энтеробактин и сальмохелин [36]. Сальмохелин — это гликозилированное производное энтеробактина. Эта модификация может быть важной для устойчивости к липокалину-2, противомикробному белку, который предотвращает накопление железа бактериями в инфицированном кишечном эпителии [43].

Сальмонеллы имеют три разные системы доставки магния: *SogA*, *MgtA* и *MgtB*, каждая из которых необходима для реализации вирулентности [39]. Еще один фактор вирулентности, *MgtC*, кодируется тем же самым опероном, что и *MgtB*. В то же время обеспечение магнием не обязательно для выживания сальмонелл в макрофагах и роста в лишенной магния среде [1].

Два других металлоиона, которые имеют отношение к внутриклеточному выживанию сальмонелл — калий и цинк. Высоко аффинная *ZnuABC* система транспорта Zn^{2+} необходима для роста сальмонелл в дефицитной по цинку среде.



Бактерии поддерживают относительно стабильной концентрацию внутриклеточного калия (300–500 мМ), которая необходима для выполнения многих существенных жизненных функций, включая поддержание клеточного тургора и гомеостаза, активацию цитоплазматических ферментов. Поскольку бактерии подвергаются воздействию широкого диапазона внешних концентраций калия, они используют ряд переносчиков и эффлюкс-насосов для стабилизации внутриклеточной концентрации калия. Наиболее хорошо изучены у грамотрицательных бактерий транспортные системы Trk, Kdp и Kup. Trk — это низко аффинная транспортная система переносит калий при нейтральных и щелочных значениях pH [49]. Генные продукты этого мультиединичного комплекса экспрессируют конститутивно. Kdp — высоко аффинная транспортная система, которая индуцируется при низких (≤ 5 мМ) концентрациях K^+ в среде. Kup-система также имеет низкий аффинитет к K^+ и осуществляет его транспорт при кислых значениях среды. Trk участвует в экспрессии и секреции эффекторных белков T3SS-системы, которая кодируется в пределах SPI-1 и которая необходима для внедрения сальмонелл в клетки эпителия кишечника. Кроме того, что *trkA* (*sapG*) необходим для устойчивости к антимикробным пептидам [48]. Более того, внешний калий модулирует патогенные свойства сальмонелл путем повышения экспрессии и секреции эффекторных белков T3SS-системы и путем повышения инвазии эпителиальных клеток. Таким образом, калий активно вовлечен в патогенез сальмонеллеза, а бактерии приобретают преимущество и становятся более вирулентными при высокой концентрации калия внутри клетки и кишечной жидкости, что является обычным следствием диареи [48].

За последние 20 лет достигнут существенный прогресс в изучении взаимодействия сальмонелл с клеткой-хозяином. Патогенез сальмонеллеза осуществляется путем доставки в клетку-хозяина свыше 30 специализированных эффекторных белков через две различные секреторные системы III типа. Эти эффекторы, аранжированные в единый оркестр, воздействуют на цитоскелетон инфицированной клетки, пути переноса сигналов, мембранный транспорт и провоспалительный ответ. Это позволяет сальмонелле внедряться в нефагоцитирующие эпителиальные клетки, ДК и макрофаги, выживать и размножаться внутриклеточно, а в некоторых случаях диссеминировать, вызывая системные заболевания. Установлено, что для установления и поддержания персистирующей (подострой) инфекции в печени и селезенке требуется экспрессия не менее 118 генов (3% генома), 30% которых сосредоточены в геномных областях SPI-1 и SPI-2, лизогенных фагах и различных плазидах [29]. В то же время целый ряд вопросов патогенеза остается пока без ответа. Понятие деталей взаимодействия возбудителя и клетки-хозяина, ускользания патогена от эффекторов иммунной системы и выработки устойчивости к действию противомикробных средств позволит не только заполнить оста-



ющиеся пробелы, но и разработать новые, более эффективные средства воздействия на убиквитарный патоген.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Alix E., Blanc-Potard A.B.* Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor // *EMBO J.* — 2008. — V. 27. — P. 546–557.
2. *Bakowski M.A., Cirulis J.T., Brown N.F., Finlay B.B., Brummel J.F.* SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* invasion // *Cell Microbiol.* — 2007. — V. 9. — P. 2839–2855.
3. *Bearson S.M., Bearson B.L., Rasmussen M.A.* Identification of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* genes important for survival in the swine gastric environment // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2006. — V. 72. — P. 2829–2836.
4. *Beuzone C.R., Salcedo S.P., Holden D.W.* Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* *sifA* mutant strain in the cytosol of different cell lines // *Microbiol.* — 2002. — V. 148. — P. 2705–2715.
5. *Boyle E.C., Brown, B.B. N.F. Finlay* *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* effectors SopE/SopE2, SopB and SipA disrupt tight junction structure and function // *Cell Microbiol.* — 2006. — V. 8. — P. 1946–1957.
6. *Brawn L.C., Hayward R.D., Koronakis V.* *Salmonella* SPI-1 effector SipA persist after entry and cooperates with SPI-2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication // *Cell Host Microbe.* — 2007. — V. 1. — P. 63–75.
7. *Browne S.H., Hasegawa P., Okamoto S., Fiere J., Guiney D.G.* Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2008. — V. 52. — P. 194–201.
8. *Darwin K.H., Miller V.L.* Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa // *Clin. Microbiol. Rev.* — 1999. — V. 12. — P. 405–428.
9. *Deiwick J., Salcedo S.P., Boucrot E. et al.* The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche // *Infect. Immun.* — 2006. — V. 74. — P. 6965–6972.
10. *Diao J., Zhang Y., Huibregtse J.M., Zhou D., Chen J.* Crystal structure of SopA, a *Salmonella* effector protein mimicking a eukaryotic ubiquitin ligase // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2008. — V. 15. — P. 65–70.
11. *Drecktrah D., Levine-Wilkinson S., Dam T. et al.* Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells // *Traffic.* — 2008. — V. 9. — P. 2117–2129.
12. *Galan J.E., Wolf-Watz H.* Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines // *Nature.* — 2006. — V. 444. — P. 567–573.



13. Garmendia J., Beuzon C.R., Ruiz-Albert J., Holden D.W. The role of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system // Microbiol. — 2003. — V. 149. — P. 2385–2396.

14. Gerlach R.G., Jackel D., Stecher B. et al. *Salmonella* pathogenicity island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesion and the cognate type 1 secretion system // Cell Microbiol. — 2007. — V. 9. — P. 1834–1850.

15. Guignot J., Caron E., Beuzon C. et al. Microtubule motors control membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles // J. Cell Sci. — 2004. — V. 117. — P. 1033–1045.

16. Guo A., Lasaro M. A., Sirard J. C. et al. Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* by dendritic cells // Microbiology. — 2007. — V. 153. — P. 1059–1069.

17. Hayward R. D., Koronakis V. Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins // Trends Cell Biol. — 2002. — 12. — P. 15–20.

18. Henry T., Couillault C., Rockenfeller P. et al. The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinasin-1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — V. 103. — P. 13497–13502.

19. Humphreys D., Hume P. J., Koronakis V. The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche // Cell Host Microbe. — 2009. — V. 5. — P. 225–233.

20. Humphries A. D., Townsend S. M., Kingsley R. A. et al. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars // FEMS Microbiol. Lett. — 2001. — V. 201. — P. 121–125.

21. de Jong H., Ekdahl M. O. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries // BMC Public Health. — 2006. — V. 6. — P. 4–12.

22. Kage H., Takaya A., Ohya M., Yamamoto T. Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190. — P. 2470–2478.

23. Knodler L. A., Steel-Mortimer O. The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/ lysosome distribution to mediate Sif extension // Mol. Biol. Cell. — 2005. — V. 16. — P. 4108–4123.

24. Kuhle V., Abrahams G. L., Hensel M. Intracellular *Salmonella enteric* redirect exocytic processes in a SPI-2-dependent manner // Traffic. — 2006. — V. 7. — P. 716–730.

25. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response // Biochem. J. — 2009. — V. 420. — P. 1–16.

26. Kubori T., Sukhan A., Aizawa S.-I., and Galón J. E. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella*

typhimurium type III protein secretion system. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — V. 97(18). — P. 10225–10230.

27. Layton A. N., Galyov E. E. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications // Expert Re. Mol. Med. — 2007. — V. 9. — P. 1–17.

28. Liao A. P., Petrof E. O., Kuppireddi S. et al. *Salmonella* type III effector AvrA stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in intestinal epithelial cells // PLoS ONE. — 2008. — V. 3. — e2369.

29. Lawley T. D., Bouley D. M., Hoy Y. E. et al. Host transmission of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota // Infect. Immun. — 2008. — V. 76. — P. 403–416.

30. Macnab R. M. Type III flagellar protein export and flagella assembly // Biochem. Biophys. Acta. — 2004. — V. 1694. — P. 207–217.

31. Mazurkiewicz P., Thomas J., Thompson J. A. et al. SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases // Mol. Microbiol. — 2008. — V. 67. — P. 1371–1383.

32. McGhie E. J., Brawn L. C., Hume P. J. et al. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host // Curr. Opin. Microbiol. — 2009. — V. 12. — P. 117–124.

33. McGhie E. J., Hayward R. D., Koronakis V. Control of actin turnover by a *Salmonella* invasion protein // Mol. Cell. — 2004. — V. 13. — P. 497–510.

34. Miao E. A., Alpuche-Aranda C. M., Dors M. et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of IL-1 β via Ipaf // Nat. Immunol. — 2006. — V. 7. — P. 569–575.

35. Miao E. A., Andersen-Nissen E., Warren S. E., Aderem A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system // Semin. Immunopathol. — 2007. — V. 29. — P. 275–288.

36. Muller S. I., Valdebenito M., Hantke K. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella* // Biometals. — 2009. — V. 22. — P. 691–695.

37. Nairz M., Fritsche G., Crouch M. L. et al. Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition // Cell Microbiol. — 2009. — V. 11. — P. 1365–1381.

38. Pacello F., Ceci P., Ammendola S. et al. Periplasmic Cu, Zn superoxide dismutase and cytoplasmic Dps occur in protecting *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* from extracellular reactive oxygen species // Biochim. Biophys. Acta. — 2008. — V. 1780. — P. 226–232.

39. Papp-Wallace K. M., Nartea M., Kehres D. G. et al. The CorA Mg²⁺ channel is required for the virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190. — P. 6517–6523.



40. Patel G. C., Galan G. E. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* – all in the name of entry // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – V. 8. – P. 10–15.

41. Patel G. C., Galan G. E. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions // J. Cell Biol. – 2006. – V. 175. – P. 453–463.

42. Poh J., Odendall C., Spanos A. et al. Stec C is a *Salmonella* kinase required for SPI-2 dependent F-actin remodeling // Cell Microbiol. – 2008. – V. 10. – P. 20–30.

43. Raffatellu M., George M. D., Akiyama Y. et al. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* for growth and survival in the inflamed intestine // Cell Host Microbe. – 2009. – V. 5. – P. 476–486.

44. Salcedo S. P., Holden D. W. SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network // EMBO J. – 2003. – V. 22. – P. 5003–5014.

45. Salcedo S. P., Noursadeghi M., Cohen J., Holden D. W. Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo // Cell. Microbiol. – 2001. – V. 3. – P. 587–597.

46. Schmitt C. K., Ikeda J. S., Darnell S. C. et al. Absence of all components of the flagella export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis // Infect. Immun. – 2001. – V. 69. – P. 5619–5625.

47. Steel-Mortimer O. The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the time // Curr. Opin. Microbiol. – 2008. – V. 11. – P. 38–45.

48. Su J., Gong H., Lai J., Main A., Lu S. The potassium transporter Trk and external potassium modulate *Salmonella enterica* protein secretion and virulence // Infect. Immun. – 2009. – V. 77. – P. 667–675.

49. Vought K. J., Tatini S. R. *Salmonella enteritidis* contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak // J. Food Prot. – 1998. – V. 61. – P. 5–10.

50. Wasylnka J. A., Bakowski M. A., Szeto J. et al. Role for myosin II in regulating positioning of *Salmonella*-containing vacuoles and intracellular replication // Infect. Immun. – 2008. – V. 76. – P. 2722–2735.

А.Г. Дьяченко¹, А.А. Дем'янова¹, І.М. Балута², І.Ю. Кучма²,
В.В. Леїзин², А.Ю. Волянський²

¹Сумський державний університет, вул. Р. Корсакова, 2, Суми, 40007, Україна,
e-mail: ag_dyachenko@list.ru

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України»,
вул. Пушкінська, 14, Харків, 61057, Україна, тел.: (057) 717-98-67

ФАКТОРИ ВІРУЛЕНТНОСТІ САЛЬМОНЕЛ І ПАТОГЕНЕЗ САЛЬМОНЕЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Реферат

Проведено аналіз сучасних літературних даних щодо механізмів розвитку обмеженої та системної сальмонельозних інфекцій. Чудова здатність сальмонел вже через кілька хвилин після поглинання інфікованої їжі проникати в фагоцити та ентероцити і далі по всьому організму забезпечується набором із кількох десятків ефекторів (усього бактеріальний геном містить близько 4500 генів), чия координована експресія сприяє внутрішньоклітинному виживанню та реплікації бактерій. Основна частина ефекторів пов'язана з островами патогенності сальмонел, SPI-1 і SPI-2. Крім того, багато штамів сальмонел містять у складі геному інші локуси патогенності, які контролюють бактеріальну адгезію, інвазію, інфекцію, опірність до протимікробних засобів. Серйозна небезпека, якою є сальмонельоз, стимулює подальше його вивчення та вдосконалення інфраструктури охорони здоров'я суспільства.

Ключові слова: сальмонельоз, *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, *Salmonella enterica* серовар *Enteritidis*, патогенез.



A.G. Dyachenko¹, A.A. Demyanova¹, I.M. Baluta², I.Yu. Kuchma²,
V.V.Leisin², A.Yu. Voliansky²

¹Sumy State University, School of Medicine, 2, R. -Korsakov str., Sumy, 40007,
Ukraine, e-mail: ag_dyachenko@list.ru

²Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, AMS Ukraine, 14,
Pushkinska str., Kharkiv, 61057, Ukraine tel.: (057) 717-98-67

THE FACTORS OF SALMONELLA VIRULENCY AND PATHOGENESIS OF THE SALMONELLA INFECTION

Summary

Salmonella pathogenesis relies upon the delivery of over thirty specialized effector proteins into the host cell via two distinct type III secretion systems. These effectors act in concert to subvert the host cell cytoskeleton, signal transduction pathways, membrane trafficking and proinflammatory responses. This allows Salmonella to invade non-phagocytic epithelial cells, establish and maintain an intracellular replicative niche and, in some cases, disseminate to cause systemic diseases. This review focuses on the action of the effectors on their host cell targets during each stage of Salmonella infection.

Key words : salmonellosis, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*, pathogenesis.

