

ФАГОЦИТОЗ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ: МОДИФИКАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ЭФФЕКТОРАМИ

© О. А. Цаплина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: olga566@mail.ru

Бактерии могут проникать в клетки эукариот, регулируя собственный фагоцитоз клеткой-хозяином. Управлять этим процессом бактерии могут с помощью внеклеточных токсинов, лигандов на поверхности бактериальной клетки и факторов вирулентности, введенных в клетку-хозяина. Механизмы инвазии делят на две группы: механизм «застежки-молнии» и триггерный механизм. Согласно первому механизму, бактерии запускают необходимые для инвазии перестройки цитоскелета и мембраны, связываясь с рецепторами клетки-хозяина. Согласно второму, бактерии регулируют собственный фагоцитоз, впрыскивая в цитоплазму клетки-хозяина регуляторные белки. Мишенью в клетке-хозяине чаще всего становятся сигнальные пути, которые не являются специфическими для фагоцитоза, и непосредственно цитоскелет. Помимо этого, в регуляции бактериальной инвазии существенную роль играют фосфолипидный состав мембраны клетки-мишени. Таким образом, интенсивность инвазии определяется не только факторами вирулентности самих бактерий, но и жизненным циклом, трансформированностью клетки, составом мембраны и другими физиологическими особенностями клетки-хозяина. В настоящем обзоре описаны разнообразные механизмы бактериальной инвазии в клетки эукариот и факторы, которые могут определять чувствительность клеток эукариот к инвазии.

Ключевые слова: инвазия, патогенные бактерии, актиновый цитоскелет, сигнальные системы.

Принятые сокращения: PI — фосфатидилинозитол, PI3P — фосфатидилинозитол-3-фосфат, PI4P — фосфатидилинозитол-4-фосфат, PI5P — фосфатидилинозитол-5-фосфат, PI(4,5)P2 — фосфатидилинозитол-4, 5-бифосфат.

Одним из необходимых процессов жизнедеятельности клетки является эндоцитоз — процесс захвата внешнего материала клеткой, осуществляемый путем образования мембранных везикул. Одним из видов эндоцитоза является фагоцитоз, который клетки эукариот используют для поглощения частиц больших размеров. На первой стадии фагоцитоза происходит связывание поверхностных рецепторов с частицей, в результате чего происходят перераспределение рецепторов в мембране и передача сигнала, приводящего к захвату частицы мембранными выростами. Большинство клеток организма в норме, как правило, не захватывает крупных частиц, тем не менее некоторые патогенные бактерии могут вызывать фагоцитирование своих клеток (инвазию) клетками эукариот (Finlay, Cossart, 1997). Инвазия происходит по одному из двух механизмов: по триггерному механизму или по механизму «застежки-молнии» (Cossart, Sansonetti, 2004). Во время инвазии по механизму «застежки-молнии» взаимодействие бактериального лиганда с клеточным рецептором активирует сигнальную систему клетки-хозяина, обеспечивая перестройки цитоскелета, необходимые для образования фагосомы. Наиболее хорошо изучены использующие этот механизм инвазии бактерии *Yersinia* и *Listeria* (Galan, Cossart, 2005; Bonazzi et al., 2009).

Другой механизм инвазии патогенных бактерий — триггерный, который используют, например, бактерии

Salmonella и *Shigella* (Cain et al., 2008; Schroeder, Hilbi, 2008). Для проникновения в клетку-мишень по этому механизму патогенные бактерии инициирует свое поглощение клеткой-хозяином, вводя в клетку сигнальные молекулы, регулирующие или имитирующие множество белков клетки-хозяина. Попав в клетку-хозяина, бактериальные белки становятся факторами вирулентности, участвуя в различных сигнальных каскадах и в конечном итоге приводят к фагоцитозу бактерий.

Таким образом, интенсивность инвазии определяется не только факторами вирулентности самих бактерий, но и физиологическими особенностями клетки-хозяина. Цель настоящего обзора — показать, как патогенные бактерии используют сигнальные механизмы эукариотической клетки и цитоскелет для проникновения в клетки и выживания.

Аппарат секреции бактерий

Некоторые внеклеточные патогенные бактерии, такие как *Bacillus anthracis* и *Vibrio cholerae*, выделяют токсины, которые проникают в клетки хозяина независимо от бактерий, а затем разрушают сигнальную систему клетки-мишени (De Haan, Hirst, 2004; Turk, 2007). Однако большинство патогенных бактерий переносят факторы

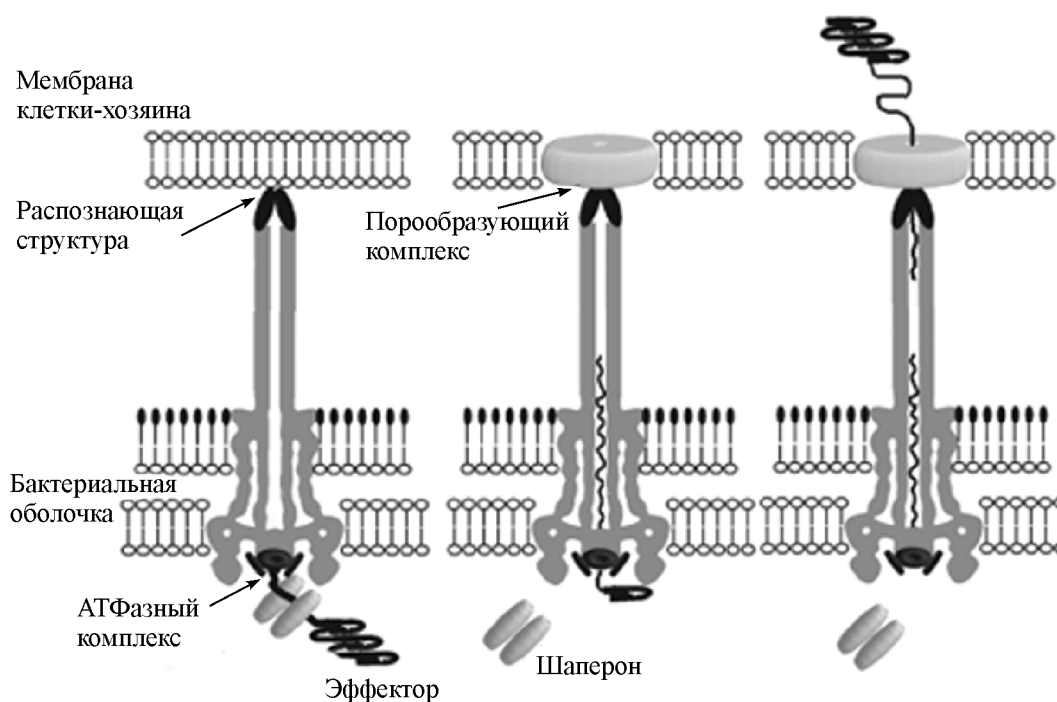


Рис. 1. Модель распознавания субстрата и доставки белков системой секреции III типа (Galán, Wolf-Watz, 2006).

Аппарат секреции узнает комплекс эффиктор—шаперон. Ассоциированная с аппаратом секреции АТФаза высвобождает из комплекса шаперон, который остается в бактериальной клетке. После высвобождения шаперона белок эффиктор разворачивается и переносится по центральному каналу комплекса к мембране клетки-хозяина. Из белков, секретируемых системой секреции III типа, на мембране клетки-хозяина собирается порообразующий комплекс, который становится посредником в переносе белков эффикторов через мембрану клетки-мишени. После переноса белки-эффикторы сворачиваются повторно в клетке-хозяине для выполнения своих функций. Рисунок печатается с любезного разрешения авторов.

вирулентности непосредственно из цитоплазмы бактерии в цитоплазму клетки-хозяина, используя секреторные системы. Из 7 типов систем секреции грамотрицательных бактерий наиболее распространенной является система секреции III типа (Tseng et al., 2009), которая переносит бактериальные эффикторы за один шаг, без отщепления N-концевой последовательности секретируемого белка. Аппарат секреции состоит из 20—25 белков и охватывает внутреннюю мембрану, периплазму и наружную мембрану (рис. 1). После контакта с поверхностью клетки-мишени бактерия вводит белки-эффикторы в мембрану клетки-хозяина, формируя молекулярную пору, через которую секретируемые белки могут попасть в клетку-хозяина (Stone et al., 2011).

Помимо системы секреции III типа грамотрицательные бактерии для введения белков-эффикторов в клетку-хозяина используют систему секреции IV типа, которая представляет собой транспортный комплекс, похожий на пилы, но в отличие от пилей способен переносить не только ДНК, но и белки. Этот аппарат секреции найден у бактерий видов *Agrobacterium*, *Helicobacter* и *Legionella* (Ham et al., 2011).

Энтеропатогенные и энтероагрегативные бактерии *Escherichia coli*, различающиеся степенью патогенности, для введения факторов вирулентности в клетки эукариот используют систему секреции V типа, в которой во время переноса от белков отщепляются сигнальные пептиды. Энтеропатогенные *E. coli* в дополнение к системе секреции V типа используют систему секреции III типа (Navarro-Garcia et al., 2010).

Контакт бактерий с поверхностными рецепторами эукариотической клетки

Первым этапом инвазии является адгезия, посредниками которой могут быть разнообразные молекулы и макромолекулярные структуры, известные как адгезины. Многие из них не только являются посредником адгезии, но и вызывают интернализацию бактерий (Boyle, Finlay, 2003; Nauck, Ohlsen, 2006).

Синтезируемый бактериями поверхностный белок способен связываться с поверхностными рецепторами клеток эукариот, участвующими в межклеточных взаимодействиях или во взаимодействии клетки с внеклеточным матриксом. Связывание бактериальных белков с поверхностными рецепторами клеток эукариот может запускать сигнальные каскады через конформационные изменения рецепторов и (или) их кластеризацию. Молекулы клеточной адгезии, используемые бактериями для проникновения в клетку-хозяина, можно разделить на 4 основные группы — интегрины, кадгеринины, иммуноглобулины и селектины (Boyle, Finlay, 2003).

Многие поверхностные белки патогенных бактерий вызывают адгезию, прямо или опосредованно взаимодействуя с интегрининами (Nauck et al., 2012). Например, на первом этапе инвазии *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в клетки эукариот белок внешней мембраны бактерий инвазин связывается с субъединицей $\beta 1$ интегринина, ответственного за адгезию клеток к внеклеточному матриксу и не участвующего в фагоцитозе в норме (рис. 2). Природный лиганд интегринина фибронектин не имеет гомологий с инвазином в первичной последовательности, но

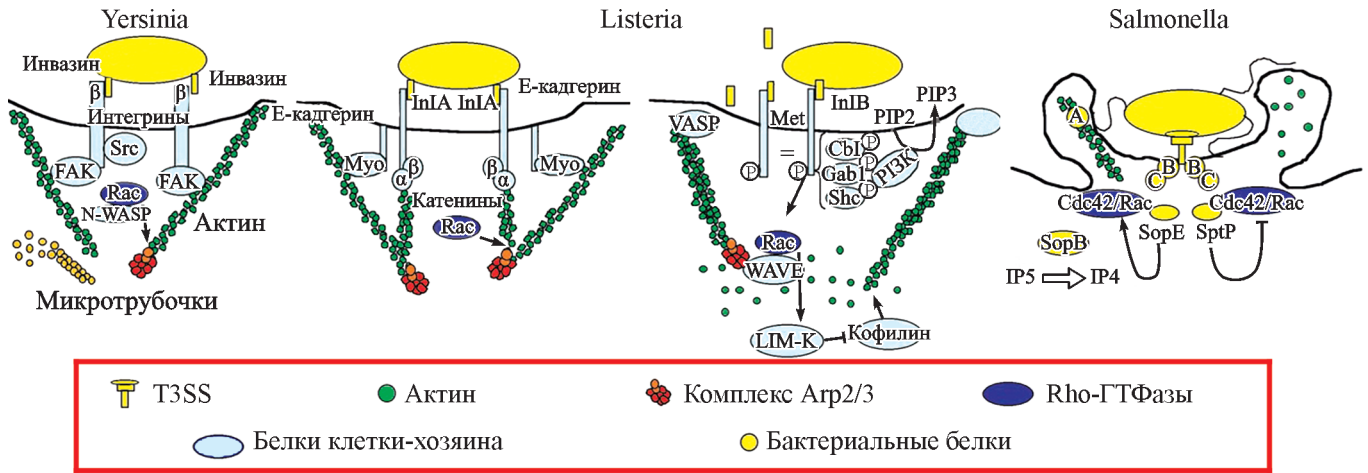


Рис. 2. Механизмы инвазии: застежка-молния, используемая бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Listeria monocytogenes*, и триггерный механизм, используемый бактериями *Salmonella* и *Shigella* для входа в клетки эукариот.

Белок внешней мембраны *Yersinia* инвазин взаимодействует с $\beta 1$ -интегрином, активируя малую Rho-ГТФазу Rac, которая вызывает перестройки актина в сайте контакта с бактерией. FAK- и Src-киназы эукариотической клетки также участвуют в этом процессе. *Listeria* инвазирует в клетку-мишень с помощью одного из двух поверхностных белков InlA или InlB. InlA взаимодействует с молекулой клеточной адгезии E-кадгерин. В инвазии задействованы миозин и Rho-ГТФаза Rac, регулирующая полимеризацию актина. InlB взаимодействует с сигнальным рецептором Met, что привлекает к рецептору молекулярные адаптеры, которые в свою очередь связываются с фосфоинозитол-3-киназой, и происходит активация Rho-ГТФазы Rac1. Баланс между полимеризацией и деполимеризацией актина контролируют киназа Lim и кофилин, фактор деполимеризации актина. *Salmonella* перемещает эффекторы в клетку-мишень: SipC является частью аппарата секреции и задействован в полимеризации актина; SopE активирует ГТФазы Rho, способствуя полимеризации актина; SopB регулирует метаболизм PI, косвенно активизируя те же ГТФазы Rho, что и SopE; SipA стабилизирует полимеры актина, блокируя деполимеризацию кофилином. SptP играет свою роль после интернализации, инактивирует ГТФазы Rho, помогая закрытию макропинацитозного кармана. Рисунок печатается с любезного разрешения авторов.

третичная структура и расположение интегринсвязывающих сайтов на поверхности молекул сходны (Stebbins, Galan, 2001).

Инвазин, связываясь с интегринами гораздо сильнее, чем фибронектин, вызывает объединение интегрин в кластеры и эффективную передачу сигналов далее. Цитоплазматические домены сгруппированных рецепторов интегринов связываются с тирозинкиназой FAK. Параллельно происходит автофосфорилирование тирозинкиназы

Pyk2 (Boyle, Finlay, 2003). В результате происходит передача сигнала цитоскелету с вовлечением киназы Src-семейства, фосфатидилинозитол-3-киназы и малой ГТФазы Rac1 (Cossart, Sansonetti, 2004; Galan, Cossart, 2005).

В условиях, когда синтез инвазина репрессирован, инвазию *Yersinia* обеспечивает другой адгезин YadA, взаимодействующий с интегрином $\alpha 5\beta 1$ через белки внеклеточного матрикса — фибронектин и коллаген. Какой адгезин синтезируют бактерии, зависит от состава пита-

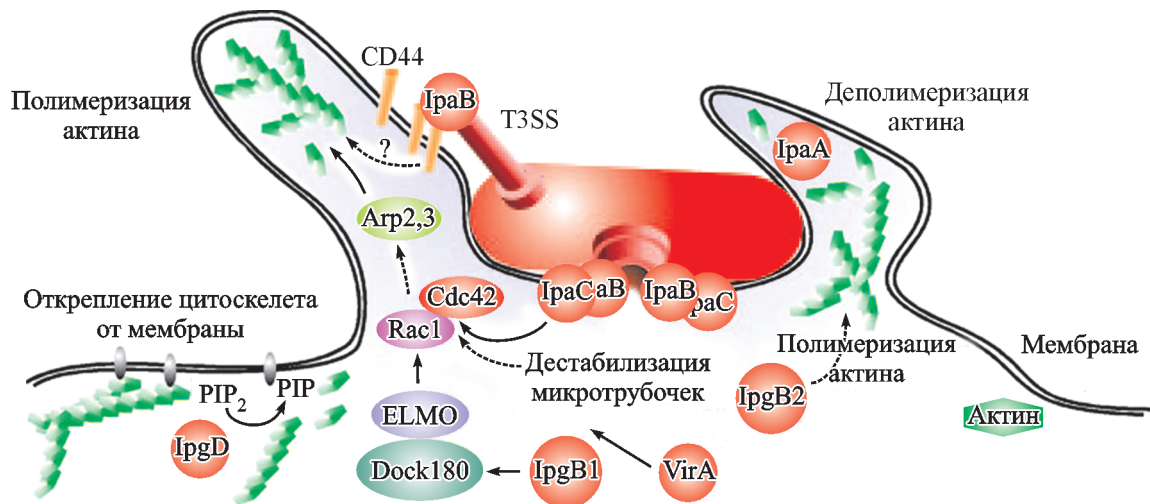


Рис. 3. Нарушение сигнальной системы клетки-хозяина эффекторами, секретируемыми *Shigella flexneri* через аппарат секреции III типа (Schroeder, Hilbi, 2008).

Инъекции эффекторов IpaC, IpgB1 и VirA *Sh. flexneri* вызывает полимеризацию актина, зависимую от Rho-ГТФаз Rac1 и Cdc42, и образование крупных мембранных выростов по краям бактерии. Связывание IpaB с CD44-рецептором и деятельность IpgB2 также могут вызвать перестройки цитоскелета и образование мембранных выростов. Фосфоинозитид-4-фосфатаза IpgD способствует откреплению актинового цитоскелета от цитоплазматической мембраны, что приводит к структурной реорганизации сайта интернализации. IpaA служит посредником локальной деполимеризации актина, которая необходима для закрытия фагоцитарной чашки. PIP2 — фосфатидилинозитол-4, 5-бифосфат, PIP — фосфатидилинозитол-5-фосфат. Рисунок печатается с любезного разрешения авторов.

тельных веществ ростовой среды, ионного баланса и температуры роста бактерий. Поэтому предполагают, что *Yersinia* использует YadA для инвазии в условиях окружающей среды, где синтез инвазина репрессирован (Eitel, Dersch, 2002). Таким образом, *Yersinia* может инициировать собственное поглощение, связываясь с интегрином с помощью одного из двух адгезинов, в зависимости от условий окружающей среды.

Кроме того, бактерии могут взаимодействовать с интегрином не напрямую. Как минимум два поверхностных белка бактерий *Streptococcus aureus* и *S. pyogenes* связываются с природным лигандом интегрин фибронектином, в результате чего фибронектин осаждается на поверхности бактерий. Покрытые фибронектином бактерии вызывают кластеризацию рецепторов интегринов $\alpha 5\beta 1$ клетки-мишени и запуск сигнальных путей, необходимых для интернализации бактерий (Hauck, Ohlsen, 2006). Кластеризация интегринов привлекает к сайту прикрепления структурные белки, такие как тензин, винкулин и зиксин, а также сигнальные ферменты, такие как киназы Src и FAK (Fowler et al., 2003). Объединенная деятельность FAK- и Src-киназ приводит к фосфорилированию по тирозину белков-эффекторов, в том числе кортактина. Кортактин участвует в интернализации бактерий, по-видимому влияя на перестройки цитоскелета через комплекс Arp2/3 или регулируя динамику эндоцитоза (Selbach, Backert, 2005).

С Е-кадгерином человека, участвующим в кальций-зависимой клеточной адгезии (Тройановский, 2005), связывается интерналин А бактерии *Listeria monocytogenes*, ковалентно заякоренный в ее стенке (рис. 2) (Cossart, Sansonetti, 2004). В качестве адаптеров между цитоплазматическим доменом Е-кадгерина и актиновым цитоскелетом выступают α - и β -катенины (Boyle, Finlay, 2003). Взаимодействие интерналина А с Е-кадгерином индуцирует кавеолинзависимую кластеризацию Е-катенинов, активирующую тирозинкиназу Src. Src-зависимое фосфорилирование Е-кадгерина запускает убиквитинирование Е-кадгерина, которое служит сигналом для локализации Е-кадгерина в клатриновых окаймлениях, что способствует интернализации бактерий. Кроме того, Е-кадгерин может сохраняться и в кавеолин-богатых областях, и интернализация бактерий может происходить через кавеосомы (Bonazzi et al., 2009).

Интерналин В не только участвует в первоначальной адгезии бактерий, но и вносит дополнительный вклад в инвазию (Pentecost et al., 2010), связываясь с рецептором тирозинкиназы Met, лигандом которой является фактор роста гепатоцитов (Shen et al., 2000).

Однако на поверхности клетки-мишени не всегда есть необходимые для адгезии белки. В таком случае патогенные бактерии внедряют рецепторы в эукариотическую клетку, используя свои системы секреции. Например, патогенные *E. coli* ЕРЕС и ЕНЕС используют систему секреции III типа для транслокации в клетку-хозяина рецептора Tir, где он встраивается в мембрану клетки-хозяина и связывается с белком внешней мембраны бактерий интимином. Связывание интимины с Tir-рецептором вызывает кластеризацию Tir-рецепторов, инициируя сигнальный каскад, что приводит к полимеризации актина и образованию пьедестала (Собурн et al., 2007). Фосфорилированный по тирозину Tir-рецептор ЕРЕС привлекает комплекс Arp2/3, инициируя через него полимеризацию актина (Campellone et al., 2004), в то время как нефосфорилированный Tir-рецептор ЕНЕС для привлечения Arp2/3

нуждается в дополнительных эффекторах (Campellone, Leong, 2005). С-концевая последовательность Tir имеет сходство с мотивами клеточных рецепторов, ответственных за привлечение SH2- домена 5'-инозитолфосфатазы 2, которая преобразует на плазматической мембране фосфатидилинозитол-3,4,5-3-фосфат (PI(3,4,5)P3) в фосфатидилинозитол-3,4-2-фосфат (PI(3,4)P2). Обогащение PI(3,4)P2 привлекает белок-адаптер ламеллиподин, запускающий формирование актинового пьедестала (Smith et al., 2010).

Первый контакт бактерии *Shigella* с клеткой-хозяином происходит с рецептором гиалуроновой кислоты CD44 и интегрином $\alpha 5\beta 1$, которые распределены в липидных рафтах. При взаимодействии с бактериальной поверхностью рецепторы и интегрины концентрируются в месте контакта клетки-хозяина с бактерией (Schroeder, Hilbi, 2008). Связывание с любым из этих рецепторов вызывает запуск сигнального пути, приводящего к реорганизации актинового цитоскелета, которая обеспечивает инвазию *Shigella flexneri* (Watarai et al., 1996; Lafont et al., 2002). Для инвазии бактерий *Salmonella* помимо белков аппарата секреции III типа необходим поверхностный белок бактерии PagN, который взаимодействует с протеогликанами (Lambert, Smith, 2009).

Начальные взаимодействия между бактериальным белком и собственными или внедренными рецепторами клетки-хозяина вызывают каскад сигналов, включая фосфорилирование белков и (или) привлечение белков-адаптеров и эффекторов, и активацию компонентов цитоскелета. Эти процессы приводят к формированию мембранных выростов, которые захватывают бактерию, и в итоге к интернализации бактерий (Cossart, Sansonetti, 2004).

Прямая регуляция сигнальных путей клеток эукариот

Если инвазия происходит по триггерному механизму, связывание бактерии с поверхностными рецепторами клетки-мишени вызывает первоначальные перестройки актинового цитоскелета и первую стадию подготовки клетки к инвазии. Однако эффективный и полный захват бактерии вызывает перемещение в клетку-хозяина не менее шести белков-эффекторов системы секреции III типа (Schroeder, Hilbi, 2008), индуцирующих образование выростов клеточной поверхности, захватывающих бактерию. Наиболее хорошо изучены использующие триггерный механизм бактерии *Shigella* и *Salmonella* (рис. 2, 3). Мишенью белков-эффекторов становятся сигнальные системы, компоненты клеточной мембраны и непосредственно белки цитоскелета.

Ключевым компонентом мембран клеток эукариот являются фосфатидилинозитолы (PI), небольшие отрицательно заряженные молекулы фосфолипидов, которые служат посредниками в передаче различных сигналов. PI играют существенную роль в широком спектре клеточных процессов, таких как динамика мембраны, перестройки актинового цитоскелета и везикулярный транспорт. Различное распределение PI в клеточных мембранах жестко регулируется локализацией PI-киназ и фосфатаз, которые управляют фосфорилированием PI. Динамическое разнообразие фосфорилированных форм PI позволяет эффективно регулировать связанные с мембраной сигнальные процессы во времени и пространстве. Благодаря участию в широком спектре клеточных функций метаболизм PI часто становится мишенью бактери-

альных факторов вирулентности, которые действуют как PI-фосфатазы или белки-адаптеры.

Патогенные бактерии *Sh. flexneri* при контакте с клеточной поверхностью непосредственно в клетку-хозяина через систему секреции III типа перемещают PI-фосфатазу, которая гидролизует PI(4,5)P₂ с образованием PI5P (рис. 2) (Niebuhr et al., 2002). PI(4,5)P₂ участвует в связывании актинового цитоскелета с клеточной поверхностью через белки-адаптеры. Его перевод в форму PI5P приводит к ослаблению связывания с плазматической мембраной белков, связывающих цитоскелет, что приводит к увеличению участка мембраны, образующего филоподии, и образованию мембранных выростов из клетки. Эта реорганизация актинового цитоскелета в сайте контакта с бактерией способствует поглощению бактерии клеткой-хозяином. Аналогичный механизм используют *Vibrio parahaemolyticus*, впрыскивая через систему секреции III типа эффектор, который гидролизует PI(4,5)P₂ с образованием PI4P (Broberg et al., 2010).

Однако основной мишенью эффекторов патогенных бактерий являются малые ГТФазы Rho и тирозинкиназы, отвечающие за реорганизацию цитоскелета клеток эукариот (Schroeder, Hilbi, 2008; Spiering, Hodgson, 2011). Бактериальные эффекторы катализируют обмен ГДФ на ГТФ в малых ГТФазах, что приводит к запуску сигнальных каскадов, вызывающих полимеризацию актина. Активированные ГТФазы взаимодействуют с белками семейства WASP, которые в свою очередь связывают и активируют комплекс Agr2/3 (белковый комплекс, инициирующий нуклеацию актина), что вызывает нуклеацию полимеризации актина. В незараженной клетке белок Cdc42 (представитель Rho-ГТФаз семейства Ras) отвечает за образование филоподиальных выступов из клеточной поверхности, ГТФаза Rac программирует образование ламелиподий, а Rho, взаимодействующая с актинсвязывающимися белками, а не прямо с актином, индуцирует образование стресс-фибрилл. Показано, что проникновение *Shigella* в клетку-хозяина обеспечивают все три Rho-ГТФазы, которые вовлечены в образование клеточных структур, а для инвазии *Salmonella* показано участие Cdc42 и Rac (Mounier et al., 1999; Sansonetti, 2001; Cain et al., 2008). В месте контакта с клеткой-хозяином патогенные бактерии вызывают полимеризацию актина, приводящую к образованию больших мембранных выростов, которые образуют макропиноцитозный карман, захватывающий бактерию (рис. 2). Бактериальные эффекторы *Shigella* и *Salmonella* могут не только прямо стимулировать малые ГТФазы Rac1 и Cdc42 (Tran Van Nhieu et al., 1999; Patel, Galán, 2006), но и имитировать активные малые ГТФазы RhoG (Ohya et al., 2005) или RhoA (Schroeder, Hilbi, 2008). При этом бактериальные эффекторы полностью контролируют цикл обмена ГТФ-ГДФ в малых ГТФазах (Cossart, Sansonetti, 2004; Galan, Cossart, 2005). Бактерии *Salmonella* впрыскивают через аппарат секреции III типа в клетку-хозяина не только активатор, но и инактиватор Cdc42 и Rac (Fu, Galán, 1999).

Прямая регуляция цитоскелета клеток эукариот бактериальными эффекторами

Бактериальные эффекторы могут контролировать динамику актина и без участия Rho-ГТФаз, непосредственно стабилизируя филаменты актина, подавляя обмен

субъединиц в полимере (McGhie et al., 2001; Cain et al., 2008) или дестабилизируя сеть актиновых филаментов. Энтеропатогенные и энтероагрегативные *E. coli* вводят в клетки эукариот сериновые протеазы, различающиеся сайтами гидролиза белка-мишени, спектрина (Navarro-Garcia et al., 1999, 2004). Два гетеродимера спектрина образуют функциональный тетрамер, связывающий мембранные липиды и трансмембранные белки с кортикальным актиновым цитоскелетом, который расположен под плазматической мембраной. Взаимодействие спектрина с фибриллярным актином поддерживает структурную организацию актинового цитоскелета, которая обеспечивает защиту клетки от механических повреждений. Поэтому расщепление спектрина нарушает связь между плазматической мембраной и кортикальным актиновым цитоскелетом, разрушая его структуру (Navarro-Garcia et al., 2010).

Бактерии могут регулировать перестройки актинового цитоскелета, регулируя активность факторов, деполимеризующих актин. Наиболее распространенный актинсвязывающий белок, вовлеченный в инвазию бактерий, — кофилин. Активация кофилина приводит к фрагментации нитей актина. Кофилин одновременно с прекращением сигналов от Rac и Cdc42 после захвата бактерий *Salmonella* регулирует своевременную перестройку актинового цитоскелета в сайте поглощения и возвращение к нормальной морфологии клеточной поверхности (Dai et al., 2004).

В клетках-мишенях бактерии регулируют активность кофилина путем фосфорилирования, активируя LIMK-киназу клетки-мишени через Rac-путь, как это делают *Listeria* (Bierne et al., 2001), или впрыскивают через систему секреции III типа собственную киназу, как это делают *Porphyrromonas gingivalis* (Moffatt et al., 2012). Фосфорилирование кофилина смещает баланс динамики актина в направлении полимеризации. После захвата бактерии происходит дефосфорилирование кофилина, что приводит к активации кофилина и дестабилизации нитей актина в сайте входа.

Локальную деполимеризацию актина и уменьшение адгезии между клетками и внеклеточным матриксом вызывают и другие белки-эффекторы, попавшие в цитоплазму клетки-хозяина. Так, белок аппарата секреции III типа *Shigella*, связываясь с N-концевой областью винкулина (ключевого белка в образовании адгезионных контактов), приводит к конформационным изменениям молекулы винкулина, в результате которых актинсвязывающий сайт в C-концевом домене молекулы винкулина становится доступным для связывания фибриллярного актина (рис. 4) (Bourdet-Sicard, 1999).

Выживание бактерий в клетке-хозяине

Сразу после попадания в клетку-хозяина внутриклеточные бактерии оказываются внутри мембранной вакуоли — фагосомы, которую бактерии модифицируют для своего выживания во враждебных условиях. Фагоцитоз представляет собой защитный механизм, который клетки эукариот используют для удаления посторонних частиц, в том числе бактерий. Процесс начинается с поглощения бактерий плазматической мембраной, с образованием внутриклеточных вакуолей (фагосом). Далее следует ряд слияний мембран, которые реорганизуют состав фагосомальной мембраны и содержание фагосомы. Этот процесс известен как созревание фагосомы. Путь заканчива-

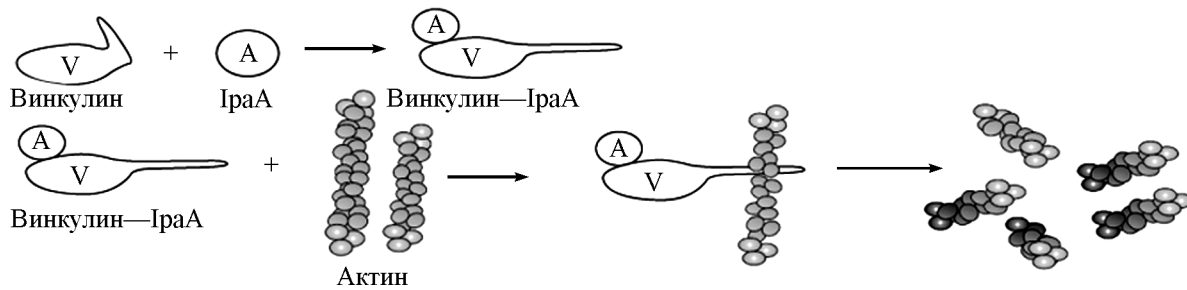


Рис. 4. Конформационные перестройки винкулина, индуцированные присоединением IpaA (поверхностного белка *Shigella flexner*, ответственного за полимеризацию актина при внутриклеточном движении бактерии), и деполимеризации F-актина (Bourdet-Sicard, 1999).

Рисунок печатается с любезного разрешения авторов.

ется формированием лизосом и фаголизосом, которые убивают бактерии с помощью низкого pH и гидролитических ферментов.

В большинстве случаев маршрут следования фагосомы, содержащей патогенную бактерию, не совпадает с маршрутом следования фагосомы, содержащей инертные частицы (убитые микроорганизмы) или непатогенные бактерии (Duclos, Desjardins, 2000). Чтобы избежать лизосомальной деградации, бактерии развили стратегии выхода из фагосом и блокирования созревания фагосомы. Патогенные бактерии могут на любой стадии вызывать изменения созревания фагосомы и препятствовать ее слиянию с ранними и поздними эндосомами, или лизосомами (Duclos, Desjardins, 2000). *Mycobacterium tuberculosis* размножается в фагосомах макрофагов и использует бактериальные фосфатазы, препятствующие созреванию фаголизосомы. Количество PI3P на фагосомальной мембране существенно снижается, и низкий уровень PI3P фагосом препятствует слиянию с поздними эндосомами и лизосомами (Vergne et al., 2005). Это еще один пример того, как бактерии манипулируют клеточными процессами, меняя количество и спектр фосфолипидов на цитоплазматической стороне плазматической мембраны инфицированной клетки.

Другие внутриклеточные бактерии разработали альтернативную стратегию выживания, состоящую в быстром лизисе фагосомальной мембраны, что позволяет им выйти в цитоплазму клетки-хозяина (Alonso, García-del Portillo, 2004). Два наиболее хорошо изученных представителя этого класса — *Listeria monocytogenes* (Cossart, Lecuit, 1998) и *Sh. flexneri* (High et al., 1992; Barzu et al., 1997; Picking et al., 2005).

Для выживания в цитоплазме не требуется экспрессии специализированных генов. Цитоплазма млекопитающих является благоприятной средой для роста бактерий. Однако бактериальные жгутики не могут помочь при движении через вязкую цитоплазму. Как и любым клеточным органеллам, внутриклеточным бактериям для передвижения требуется ассоциация с цитоскелетом. На этом этапе взаимодействия с клеткой-хозяином бактерии снова используют актиновый цитоскелет. Количественный анализ указывает на то, что рост нитей актина на поверхности бактерий может полностью объяснить наблюдаемое движение (Theriot, 1995).

Полимеризация актина происходит при участии бактериальных белков-эффекторов, концентрация которых выше на внешней мембране более старого полюса бактерии (Cossart, Lecuit, 1998; Gouin et al., 2005). Это неравно-

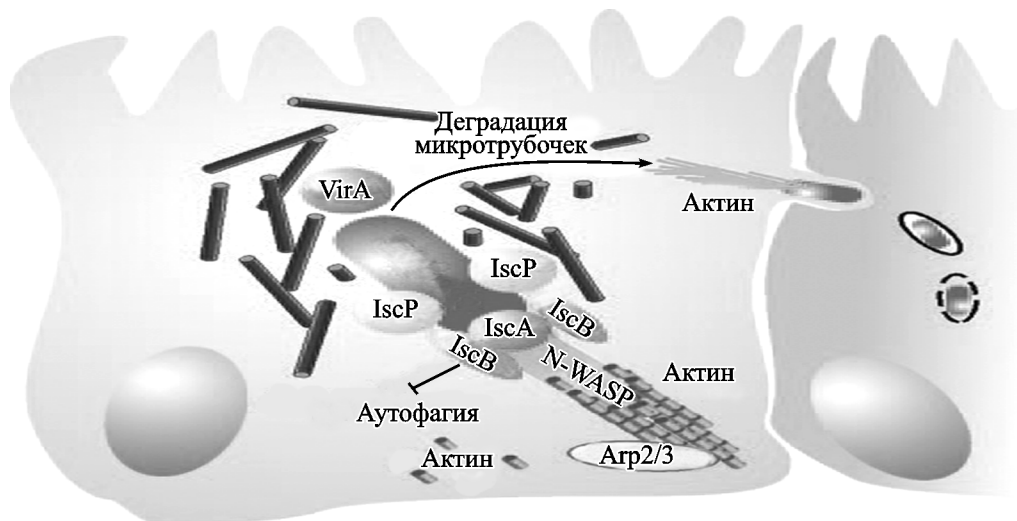


Рис. 5. Внутриклеточное движение *Shigella flexner* с помощью направленной полимеризации актина (Schroeder, Hilbi, 2008).

Из-за активности сериновой протеазы SopA/IscP белок IscA локализуется на одном полюсе бактерии *Sh. flexner*, где взаимодействует с белком N-WASP клетки-хозяина. Комплекс IscA/NWASP активирует комплекс Arp2/3, тем самым вызывая нуклеацию актина. Удлинение актинового хвоста проталкивает *Sh. flexner* через цитоплазму. Движению способствуют протеаза VirA, которая открывает путь, расщепляя сеть микротрубочек, и белок IscB, который маскирует сайты узнавания IscA для системы аутофагии. Рисунок печатается с любезного разрешения авторов.

мерное распределение обеспечивает направленное продвижение бактерий через цитоплазму клетки-хозяина в результате полимеризации актина только на одном полюсе бактерии. Расположенные на поверхности бактерии эффекторы привлекают белки клетки-хозяина и активируют их, в том числе N-WASP и Arp2/3-комплекс (Loisel et al., 1999; Suzuki et al., 2002). Образовавшийся комплекс между бактериальными белками и белками эукариотической клетки служит зародышем нуклеации актина и катализирует направленное удлинение актинового хвоста, которое проталкивает бактерии через цитоплазму. В дополнение к этому через систему секреции III типа в клетку-хозяина доставляется цистеиновая протеаза, расщепляющая α -тубулин, что создает туннель в плотной сети микротрубочек и способствует внутриклеточному движению бактерии (рис. 5) (Schroeder, Hilbi, 2008).

Заключение

Перепрограммирование нормальных клеточных процессов, таких как динамика актинового цитоскелета и везикулярный транспорт патогенными бактериями в свою пользу, оказалось эффективным механизмом, который используют многие патогенные бактерии. При инвазии по механизму «застежки-молнии» бактерии вызывают собственный фагоцитоз, связываясь с рецепторами, отвечающими за адгезию. При инвазии по триггерному механизму факторы вирулентности участвуют в различных сигнальных каскадах, регулируя или имитируя множество белков клетки-хозяина. Основной мишенью факторов вирулентности являются малые Rho-ГТФазы и тирозинкиназы, отвечающие за реорганизацию цитоскелета клеток эукариот, а также непосредственно актиновый цитоскелет. Изучение этих процессов существенно не только для понимания механизмов вирулентности бактерий, но и для изучения процессов эукариотической клетки, которые становятся мишенью бактериальных факторов вирулентности.

Автор выражает искреннюю благодарность С. Ю. Хайтлиной за обсуждение и неоценимую помощь в подготовке обзора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-00393-а и 12-04-31109 мол_а) и программ МКБ и «У.М.Н.И.К.».

Список литературы

Alonso A., García-del Portillo F. 2004. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int. Microbiol.* 7 : 181—191.

Barzu S., Benjelloun-Touimi Z., Phalipon A., Sansonetti P., Parsot C. 1997. Functional analysis of the *Shigella flexneri* IpaC invasin by insertional mutagenesis. *Infect. Immun.* 65 : 1599—1605.

Bierne H., Gouin E., Roux P., Caroni P., Yin H.L., Cossart P. 2001. A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. *J. Cell Biol.* 155 : 101—112.

Bonazzi M., Lecuit M., Cossart P. 2009. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cell Microbiol.* 11 : 693—702.

Bourdet-Sicard R., Rudiger M., Jockusch B. M., Gounon P., Sansonetti P. J., Nhieu G. T. 1999. Binding of the *Shigella* protein

IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. *EMBO J.* 18 : 5853—5862.

Boyle E. C., Finlay B. B. 2003. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 : 633—639.

Broberg C. A., Zhang L., Gonzalez H., Laskowski-Arce M. A., Orth K. A. 2010. *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity. *Science.* 329 : 1660—1662.

Cain R. J., Hayward R. D., Koronakis V. 2008. Deciphering interplay between *Salmonella* invasion effectors. *PLoS Pathog.* 4 : e1000037.

Campellone K., Leong J. 2005. Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. *Mol. Microbiol.* 56 : 416—432.

Campellone K. G., Rankin S., Pawson T., Kirschner M. W., Tipper D. J., Leong J. M. 2004. Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. *J. Cell Biol.* 164 : 407—416.

Coburn B., Sekirov I., Finlay B. B. 2007. Type III secretion systems and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 : 535—549.

Cossart P., Lecuit M. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17 : 3797—3806.

Cossart P., Sansonetti P. J. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science.* 304 : 242—248.

Dai S., Sarmiere P. D., Wiggan O., Bamberg J. R., Zhou D. 2004. Efficient *Salmonella* entry requires activity cycles of host ADF and cofilin. *Cell Microbiol.* 6 : 459—471.

De Haan L., Hirst T. R. 2004. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Mol. Membr. Biol.* 21 : 77—92.

Duclos S., Desjardins M. 2000. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol.* 2 : 365—377.

Eitel J., Dersch P. 2002. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect. Immun.* 70 : 4880—4891.

Finlay B. B., Cossart P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 276(5313) : 718—725.

Fowler T., Johansson S., Wary K. K., Höök M. 2003. Src kinase has a central role in in vitro cellular internalization of *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol.* 5 : 417—426.

Fu Y., Galán J. E. 1999. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature.* 401 : 293—297.

Galán J. E., Cossart P. 2005. Host-pathogen interactions: a diversity of themes, a variety of molecular machines. *Curr. Opin. Microbiol.* 8 : 1—3.

Galán J. E., Wolf-Watz H. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature.* 444 : 567—573.

Gouin E., Welch M. D., Cossart P. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 8 : 35—45.

Ham H., Sreelatha A., Orth K. 2011. Manipulation of host membranes by bacterial effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (9) : 635—646.

Hauck C. R., Borisova M., Muenzner P. 2012. Exploitation of integrin function by pathogenic microbes. *Curr. Opin. Cell Bio.* 24 : 1—8.

Hauck C. R., Ohlsen K. 2006. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 9 : 5—11.

High N., Mounier J., Prevost M. C., Sansonetti P. J. 1992. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO J.* 11 : 1991—1999.

Lafont F., Tran Van Nhieu G., Hanada K., Sansonetti P., van der Goot F. G. 2002. Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *EMBO J.* 21 : 4449—4457.

- Lambert M. A., Smith S. G. 2009. The PagN protein mediates invasion via interaction with proteoglycan. *FEMS Microbiol. Lett.* 297 : 209—216.
- Loisel T. P., Boujema R., Pantaloni D., Carlier M. F. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*. 401 : 613—616.
- McGhie E. J., Hayward R. D., Koronakis V. 2001. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J.* 20 : 2131—2139.
- Moffatt C. E., Inaba H., Hirano T., Lamont R. J. 2012. Porphyromonas gingivalis SerB-mediated dephosphorylation of host cell cofilin modulates invasion efficiency. *Cell Microbiol.* 14 : 577—588.
- Mounier J., Laurent V., Hall A., Fort P., Carlier M. F., Sansonetti P. J., Egile C. 1999. Rho family GTPases control entry of *Shigella flexneri* into epithelial cells but not intracellular motility. *J. Cell Sci.* 112 : 2069—2080.
- Navarro-Garcia F., Canizalez-Roman A., Sui B. Q., Navarro J. P., Azamar Y. 2004. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. *Infect. Immun.* 72 : 3609—3621.
- Navarro-Garcia F., Sears C., Eslava C., Cravioto A., Navarro J. P. 1999. Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 67 : 2184—2192.
- Navarro-Garcia F., Sonnested M., Teter K. 2010. Host-toxin interactions involving EspC and Pet, two serine protease autotransporters of the enterobacteriaceae. *Toxins (Basel)*. 2 : 1134—1147.
- Niebuhr K., Giuriato S., Pedron T., Philpott D. J., Gaits F., Sable J., Sheetz M. P., Parsot C., Sansonetti P. J., Payrastra B. 2002. Conversion of PtdIns(4,5)P(2) into PtdIns(5)P by the *S. flexneri* effector IpgD reorganizes host cell morphology. *EMBO J.* 21 : 5069—5078.
- Ohya K., Handa Y., Ogawa M., Suzuki M., Sasakawa C. 2005. IpgB1 is a novel *Shigella* effector protein involved in bacterial invasion of host cells. Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation. *J. Biol. Chem.* 280 : 24 022—24 034.
- Patel J. C., Galan J. E. 2006. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J. Cell Biol.* 175 : 453—463.
- Pentecost M., Kumaran J., Ghosh P., Amieva M.R. 2010. *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. *PLoS Pathog.* 6 : e1000900.
- Picking W. L., Nishioka H., Hearn P. D., Baxter M. A., Harrington A. T., Blocker A., Picking W. D. 2005. IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infect. Immun.* 73 : 1432—1440.
- Sansonetti P. J. 2001. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 : 3—14.
- Schroeder G. N., Hilbi H. 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21 : 134—156.
- Selbach M., Backert S. 2005. Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol.* 13 : 181—189.
- Shen Y., Naujokas M., Park M., Ireton K. 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosinekinase. *Cell*. 103 : 501—510.
- Smith K., Humphreys D., Hume P. J., Koronakis V. 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli* recruits the cellular inositol phosphatase SHIP2 to regulate actin-pedestal formation. *Cell Host Microbe*. 7 : 13—24.
- Spiering D., Hodgson L. 2011. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh. Migr.* 5 : 170—180.
- Stebbins C. E., Galan J. E. 2001. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature*. 412 : 701—705.
- Stone C. B., Bulir D. C., Emdin C. A., Pirie R. M., Porfiliio E. A., Slootstra J. W., Mahony J. B. 2011. *Chlamydia pneumoniae* CdsL regulates CdsN ATPase activity, and disruption with a peptide mimetic prevents bacterial invasion. *Front. Microbiol.* 2 : 21.
- Suzuki T., Mimuro H., Suetsugu S., Miki H., Takenawa T., Sasakawa C. 2002. Neural Wiskott—Aldrich syndrome protein (N-WASP) is the specific ligand for *Shigella* VirG among the WASP family and determines the host cell type allowing actin-based spreading. *Cell Microbiol.* 4 : 223—233.
- Theriot J. A. 1995. The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 11 : 213—239.
- Tran Van Nhieu G., Caron E., Hall A., Sansonetti P. J. 1999. IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *EMBO J.* 18 : 3249—3262.
- Troyanovsky S. 2005. Cadherin dimers in cell-cell adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* 84 : 225—233.
- Tseng T. T., Tyler B. M., Setubal J. C. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 9:9. Suppl. 1 : S2.
- Turk B. E. 2007. Manipulation of host signalling pathways by anthrax toxins. *Biochem. J.* 402 : 405—17.
- Vergne I., Chua J., Lee H., Lucas M., Belisle J., Deretic V. 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS*. 102 : 4033—4038.
- Watarai M., Funato S., Sasakawa C. 1996. Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with $\alpha 5 \beta 1$ integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J. Exp. Med.* 183 : 991—999.

Поступила 22 X 2012

PHAGOCYTOSIS OF BACTERIAL PATHOGENS: MODIFICATION OF CELLULAR PROCESSES BY BACTERIAL FACTORS

O. A. Tsaplina

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: olga566@mail.ru

Bacteria are able to invade eukaryotic cells manipulating their own uptake by the host cells phagocytosis. Invasive bacteria can induce this process using extracellular toxins, cell surface ligands and virulence factors injected into the host cell. Two main mechanisms of invasion are recognized: the «zipper» mechanism in which bacteria bind host cell receptors to initiate cytoskeletal rearrangements and membrane extensions necessary for

invasion, and the trigger mechanism in which bacteria regulate their own phagocytosis injecting regulatory proteins into the host cell cytoplasm. Most often, the targets in the host cell are signaling pathways not specific for phagocytosis and directly cytoskeleton. In addition, phospholipid composition of the target cell membrane plays an important role in the regulation of bacterial invasion. Thus, the efficiency of invasion is determined not only by bacterial virulence factors, but also by the life cycle, transformation, composition of the membrane, and other physiological characteristics of the host cell. This review describes the various mechanism of bacterial invasion into eukaryotic cells and the factors that may determine the sensitivity of eukaryotic cells to the invasion.

Key words: invasion, bacterial pathogens, actin cytoskeleton, signalling pathways.
