

УДК 579.842.23.022

Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний

Г.Я. Ценева, Н.Ю. Солодовникова, Е.А. Воскресенская

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Проанализирована и обобщена информация отечественных и зарубежных исследователей о патогенных свойствах иерсиний, особенностях молекулярно-генетических механизмов, регулирующих экспрессию факторов патогенности. Представлены данные о роли различных внешних факторов в регуляции генов вирулентности.

Определены дальнейшие перспективы изучения механизмов взаимодействия иерсиний в системе «паразит – хозяин» и генетического контроля их патогенности.

Ключевые слова: иерсинии, патогенность, биологические функции, генетический контроль.

Molecular Aspects of Yersinia Virulence

G.Ya. Tseneva, N.Yu. Solodovnikova, E.A. Voskresenskaya

Research Institute for Epidemiology and Microbiology named under L. Paster, Saint-Petersburg, Russia

The available in the literature information on the pathogenic patterns of yersiniae, peculiar properties of the molecular and genetic mechanisms that regulate the expression of the factors of the pathogenesis are analysed and summarized. Data on the role of different environmental factors for the regu-

lation of the genes of virulence are presented. The further perspectives for the study of genetic control of pathogenesis and mechanisms of interaction of yersiniae with the host are highlighted.

Key words: yersinia, pathogenesis, biological functions, genetic control.

Введение

Род *Yersinia* включает 11 видов бактерий [1]. Из них 3 вида – *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* – являются хорошо документированными возбудителями инфекционных болезней человека. Накоплена значительная информация об эпидемиологических, микробиологических, биохимических, молекулярно-генетических основах жизнедея-

тельности этих бактерий, а также о клинических аспектах вызываемых ими болезней.

В данном обзоре обобщены молекулярные и генетические данные о патогенных свойствах *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* и о «вкладе» отдельных детерминант в развитие инфекционного процесса. По ряду аспектов проводится сравнение свойств этих бактерий со свойствами *Y. pestis*. По последним данным, эволюционным предшественником *Y. pestis* является *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b [2]. Соответственно у этих видов наблюдается большая степень родства между отдельными детерминантами патогенности.

Контактный адрес:
Галина Яковлевна Ценева
Тел.: (812) 233-48-11
Эл почта: tseneva@PC7367.spb.edu

Y. pseudotuberculosis и *Y. enterocolitica* широко распространены в природе. Они выделяются из овощей, фруктов, мяса, молочных продуктов, воды, почвы, у некоторых видов животных, птиц и человека. Это факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки [1], жизненные циклы которых зависят от условий окружающей среды.

Бактерии метаболически более активны при температуре 30°C [1, 3]. В этих условиях они обладают подвижностью. Повышение температуры окружающей среды от 30 до 37°C, происходящее, например, при попадании бактерий в организм млекопитающего, приводит к утрате перитрихий [1, 3, 4]. *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в отличие от *Y. pestis* являются психрофильными бактериями, способными к росту и размножению при более низкой температуре.

Патогенность иерсиний зависит от наличия плазмид [5]. Известно, что *Y. pseudotuberculosis* включает только патогенные штаммы. Известно 6 серотипов *Y. pseudotuberculosis*. Выделяют как патогенные, так и непатогенные штаммы *Y. enterocolitica*. Помимо деления на серогруппы по липополисахаридному комплексу *Y. enterocolitica* подразделяется на 6 биогрупп по биохимическим признакам [6]. Отличительной особенностью авирулентных изолятов от остальных состоит в их способности утилизировать салицин, эскулин и продуцировать пиразинамидазу [6]. Остальные биогруппы (1b, 2, 3, 4, 5, 6) наиболее близки патогенному фенотипу. У *Y. enterocolitica* известно примерно 60 серогрупп, из которых лишь 11 вызывают заболевания людей [6].

Наиболее распространенный способ инфицирования людей и животных – попадание иерсиний в желудочно-кишечный тракт с пищей. Следует заметить, что заражение может происходить через продукты, хранящиеся в холодильнике.

Таким образом, входными воротами иерсиний является, как правило, *желудочно-кишечный тракт* (ЖКТ) хозяина.

В генезе болезней, вызываемых иерсиниями, как и другими патогенными микробами, первостепенную роль играют адгезия бактерий к слизистой оболочке кишечника, ее колонизация и последующая инвазия. При этом микроб должен пройти адаптацию к температуре тела хозяина [6], так как температура среды его обитания, как правило, ниже таковой.

Считают, что развитие инфекционного процесса, связанное с активным размножением иерсиний внутри тканей, возможно только при наличии у них плазмиды pYV (*plasmid for Yersinia virulence*) размером 70–75 тыс. пар оснований [7, 8]. Эта плазида придает содержащим ее штаммам устойчивость к действию иммунной системы человека или живот-

ных [9, 10]. В литературе, однако, встречаются сведения об обнаружении у пациентов с различными нарушениями функции ЖКТ так называемых непатогенных серобитов *Y. enterocolitica*.

Инфекции, вызываемые *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, характеризуются как инвазивные системные болезни. Клинические проявления включают энтериты, энтероколиты, острый аппендицит, терминальный илеит, мезентериальный аденит, фокальные абсцессы, пневмонии, менингиты, эндокардиты, фарингиты. *Y. enterocolitica* могут вызывать бактериемию с последующей септициемией. Наиболее часто за энтеритами следуют иммунопатологические постинфекционные синдромы, такие, как артриты и узловатая эритема.

Итак, патогенные свойства иерсиний, полностью проявляющиеся лишь в условиях роста при температуре 37 °C, определяются набором генов, многие из которых являются, по-видимому, терморегулируемыми и расположены не только на плазмиде pYV, но и в хромосомных локусах.

Факторы адгезии, колонизации и инвазии у иерсиний

Накопленные данные позволяют сделать вывод о существенных отличиях между *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* по способности к инвазии эукариотических клеток [11]. Принято считать, что *Y. pseudotuberculosis* является высокоинвазивным микробом. *Y. enterocolitica* представляет собой гетерогенную группу, но в целом этот микроб менее инвазивен. Для него более характерны адгезия к эукариотическим клеткам и первоначальная колонизация интестинального слоя. Оба вида проявляют одинаковую способность к адгезии эукариотических клеток [11].

У иерсиний известно несколько белков, опосредующих прикрепление патогена к поверхности эукариотических клеток: адгезин (YadA), инвазин, белок Ail и адгезин, родственный антигену рН6.

YadA кодируется плазмидой [12] и обнаруживается только у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Более подробно он будет описан в разделе, посвященном плазмиде pYV.

Инвазин обеспечивает не только прикрепление к поверхности, но и проникновение внутрь клеток хозяина. Его кодирует хромосомный ген *inv*, который присутствует у всех трех видов рассматриваемых иерсиний [8, 13]. У *Y. pestis* этот ген неактивен из-за мутации в области рамки считывания [14].

Белок Ail кодируется хромосомой и также опосредует адгезию и инвазию. Однако его активность более специфична по сравнению с инвазином.

Антиген рН6 обнаруживается только у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Он является хромосомным продуктом (его структурные и регуляторные единицы кодируются опероном *psaEFABC*) и экспрессируется максимально при температуре 37°C и низком значении рН.

Этот белок имеет существенное значение для вирулентности *Y. pestis*. У *Y. pseudotuberculosis* он опосредует гемагглютинацию и адгезию к культивируемым клеткам млекопитающих [15].

Инвазин

Первоначально инвазин был обнаружен и охарактеризован у *Y. pseudotuberculosis* [16]. Это белок с молекулярной массой 103 кДа, локализованный в наружной мембране и состоящий из 987 остатков аминокислот. Он непосредственно участвует в прикреплении к клеткам млекопитающих, связываясь с β_1 -интегринами – рецепторами межклеточного взаимодействия и передачи сигналов у эукариот [17].

Мутантные штаммы *Y. pseudotuberculosis*, дефектные по инвазину, не могут проникать из кишечника в пейеровы бляшки (*noduli lymphatici aggregati*) и лишь колонизируют кишечный эпителий. Интересно, что белок *Y. pseudotuberculosis* индуцирует образование псевдоподий, хемотаксическую и гаптотаксическую миграции человеческих Т-лимфоцитов [18]. Аттрактивное свойство инвазина опосредуется через β_1 -интегрины лимфоидных клеток. Эта способность, возможно, играет определенную роль в патогенезе инфекций, обусловленных иерсиниями, так как вызывает миграцию лимфоцитов в экстраинтестинальное пространство.

Продукт гена *inv* у *Y. enterocolitica* также охарактеризован [19]. Он состоит из 835 аминокислот, имеет массу 100 кДа, локализован в наружной мембране и также способствует прикреплению к клеткам хозяина и инвазии.

Ген *inv* *Y. enterocolitica* схож с *inv*-геном из *Y. pseudotuberculosis* (гомология составляет 73%) [16, 20]. Инвазины обоих видов имеют очень сходные аминокислотные последовательности на С-терминальном участке (общая гомологичность составляет 77%) [16, 19]. У инвазина из *Y. pseudotuberculosis* два небольших участка на N-конце и последовательность в середине белка из 99 аминокислот, не гомологичны инвазину *Y. enterocolitica* [19].

При исследовании инвазина из *Y. enterocolitica* было обнаружено, что он имеет единственный участок в середине белковой молекулы, который располагается на поверхности внешней мембраны [19], тогда как С-терминальная часть находится либо внутри молекулы, либо в периплазме. При поиске в

генетической базе данных не выявлено значительной гомологии инвазинов из этих видов бактерий с другими известными последовательностями [19].

Количество инвазина у *Y. enterocolitica*, как и у *Y. pseudotuberculosis*, зависит от окружающей температуры. Оно максимально при температуре 28–30°C, но не при 37°C. Это согласуется с тем, что штаммы *Y. enterocolitica*, растущие при температуре 30°C, инвазивнее штаммов, выросших при более высокой температуре. Снижение температуры положительно влияет и на количество *inv*-специфического посредника у *Y. enterocolitica*.

Ген инвазина обнаруживается как у патогенных, так и у непатогенных штаммов иерсиний. В связи с этим обстоятельством роль инвазина в патогенезе менее определенная. Считается, что непатогенные штаммы иерсиний содержат функционально неактивный ген инвазина, поскольку они не способны проникать внутрь HEp-2 клеток, а при введении в эти штаммы интактного *inv*-гена их способность к адгезии и инвазии восстанавливается.

Французские исследователи выразили сомнения относительно участия инвазина в инфекционном процессе у людей, инфицированных *Y. pseudotuberculosis* [21], так как при их обследовании не было обнаружено антител к инвазину. Не обнаруживались они и у мышей, перорально зараженных вирулентными штаммами. Авторы полагают, что поскольку инвазин *in vitro* экспрессируется максимально при температуре 30°C, а не при 37°C, то в кишечнике этот антиген не представлен иммунной системе для выработки антител. То есть, по-видимому, он не участвует в процессе инвазии *in vivo*.

Однако существует и другое мнение о роли инвазина в инфекционном процессе, особенно на ранних стадиях [4]. При попадании иерсиний внутрь организма микробные клетки имеют на своей поверхности белки, экспрессирующиеся при низкой температуре окружающей среды. Одной из таких структур и является инвазин, максимальное количество которого, как указано выше, синтезируется при температуре 28–30°C.

Таким образом, инвазин может участвовать в проникновении патогена внутрь эпителия кишечника уже на самых ранних стадиях инфекции. Эти данные согласуются с результатами опытов на культуре клеток и на животных [22], в которых было показано, что успешная инвазия иерсиний зависит от температуры предварительного культивирования микроба.

Итак, с понижением температуры роста и появлением у бактерий подвижности и адгезивных свойств эта способность усиливается, а при повышении температуры, вызывающей утрату подвиж-

ности и адгезивности, ослабляется. Кроме того, было показано, что летальный исход у мышей, зараженных перорально *Y. pseudotuberculosis*, наблюдался чаще, если возбудитель выращивался при температуре 6–8°C, чем при заражении возбудителем, выращенным при температуре 36–37°C.

Белок Ail

Помимо *inv*-гена у патогенных штаммов *Y. enterocolitica* инвазивность опосредуется еще одним хромосомным геном – *ail* (*attachment invasion locus*) [20]. Ген *ail* кодирует белок с молекулярной массой 17 кДа [23], который локализуется на поверхности клетки.

Аналогично *inv*-гену экспрессия *ail*-гена зависит от температуры. Одни авторы говорят о влиянии на эту зависимость фазы роста бактерий, в логарифмической фазе белка образуется больше при температуре 30°C, а в стационарной – при 37°C [24]. Другие отмечают, что в стационарной фазе роста значительные количества белка Ail обнаруживаются только при 37°C, а не при более низких температурах [25]. Интересно, что мутанты по инвазину *Y. enterocolitica* в условиях роста при температуре 30°C не могут проникать внутрь клеток млекопитающих из-за отсутствия у них продуктов генов *ail* и *inv* [25].

Помимо участия в адгезии/инвазии белок Ail патогенных *Y. enterocolitica* придает им устойчивость к воздействию человеческой сыворотки [24]. Ген *ail* имеет гомологию с некоторыми другими генами, кодирующими белки бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, которые придают клеткам устойчивость к воздействию человеческой сыворотки, но не имеют принципиального значения для адгезии/инвазии.

Считается, что ген *ail* присутствует только у патогенных видов и штаммов рода *Yersinia* [24]. Согласно другим сообщениям, ген *ail* характерен только для вирулентных штаммов *Y. enterocolitica* [4, 26]. Тем не менее при исследовании мутантного по гену *inv* штамма *Y. pseudotuberculosis* была обнаружена его термоиндуцируемая адгезия к культивируемым клеткам млекопитающих, которая, как оказалось, опосредуется последовательностями, гомологичными локусам генов *ail* *Y. enterocolitica* и *psa* *Y. pestis* [27].

Исследование роли гена *ail*, как и гена *inv*, проводилось главным образом на линиях культивируемых клеток. Продукты генов *ail* и *inv* у *Y. enterocolitica* способны независимо вызывать адгезию и инвазию культуры эпителиальных клеток, что было установлено в экспериментах с использованием неинвазивной *E. coli* K-12.

В клетки *E. coli* вводили рекомбинантную ДНК, содержащую *ail*- или *inv*-гены *Y. enterocolitica*. Штаммы, содержавшие ген *ail*, прикреплялись к

клеткам HEp-2, но плохо проникали внутрь. В опытах с линией клеток СНО штаммы, содержавшие ген *ail*, проникали внутрь клеток с такой же эффективностью, что и бактерии, содержавшие ген *inv*. Авторы пришли к выводу, что энтеропатогенные бактерии обладают поверхностными белками, проявляющими тканевую тропность: инвазин способствует проникновению внутрь клеток одного типа, белок Ail – другого [20].

Дальнейшие исследования результатов трансформации *ail*-гена из патогенного штамма *Y. enterocolitica* в непатогенный показали, что в отличие от рекомбинантных *E. coli* рекомбинантные штаммы *Y. enterocolitica* не приобретают способность прикрепляться к клеткам млекопитающих и проникать в них [24]. Авторы предполагают, что непатогенные штаммы могут содержать какой-либо ингибитор, препятствующий взаимодействию белка Ail с поверхностью клеток млекопитающих, либо, наоборот, вовсе не содержат некий фактор Ail-взаимодействия. Возможно, что на экспозицию белков Ail на поверхность внешней мембраны и их функцию влияет липополисахаридный состав мембраны [24].

Сравнительное исследование *in vitro* и *in vivo* свойств мутантного по гену *ail* штамма *Y. enterocolitica*, показало, что *in vitro* белок Ail вносит «вклад» в устойчивость микроба к сыворотке и в инвазивный фенотип *Y. enterocolitica*. Однако *in vivo* в моделях на мышах белок Ail не требовался для начала и генерализации инфекции. Авторы исследовали методом иммуноблотинга наличие белка Ail у бактерий и обнаружили его экспрессию только через 48 ч после заражения мышей.

Необходимо отметить, что эти данные согласуются с уже описанной ранее моделью начального этапа инфекции [4]. В ней первичным фактором адгезии и инвазии является инвазин, уже экспрессированный на поверхности клеток иерсиний при их попадании внутрь хозяина. По-видимому, белок Ail действует как вторичный фактор уже после адаптации клеток бактерий к температуре тела хозяина.

Фибриллярные структуры

У *Y. enterocolitica* описана структура, аналогичная рН6-антигену *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* [28] и образующая фимбрию. Главная единица этого антигена – белок 21 кДа – кодируется хромосомным геном *myfA* (*mucooid Yersinia factor*). Экспрессия белков Myf регулируется на уровне транскрипции температурой и рН. Ген *myfA* транскрибируется при температуре 35°C и низком значении рН и подобно энтеротоксину только в стационарной фазе роста [29]. MyfA имеет 44% гомологии с рН6-антигеном *Y. pestis* [30].

Изучение распространенности белка *MyfA* среди различных видов иерсиний выявило, что он подобно гену *yst* энтеротоксина встречается у патогенных серотипов *Y. enterocolitica* [30]. Фибриллярные структуры *Y. enterocolitica*, по-видимому, могут участвовать в адгезии и колонизации эпителия кишечника млекопитающих. Наличие энтеротоксина и фибриллярных структур у бактерий данного вида также ассоциируется с диареей у источников выделения.

В последнее время появились сообщения о роли М-клеток иммунной системы хозяина в переносе бактерий через эпителий кишечника [31]. Возможно, что они являются важнейшими сайтами адгезии и «воротами» для проникновения энтеропатогенных бактерий. Существуют клинические экспериментальные данные о том, что на ранних стадиях инфекции М-клетки эпителиальных фолликул транспортируют энтероинвазивные бактерии таких родов, как *Salmonella*, *Yersinia* и *Shigella* [31]. Механизмы адгезии и инвазии, выявленные на линиях эпителиальных клеток, также используются этими бактериями для проникновения внутрь М-клеток.

Известно, что у *Y. pseudotuberculosis* прикрепляется к М-клеткам посредством взаимодействия инвазина, экспрессированного на наружной мембране патогена, и β_1 -интегрин на поверхности М-клеток [32]. После переноса с помощью М-клеток через эпителий кишечника бактерии прикрепляются к фагоцитарным клеткам, преимущественно к макрофагам.

Роль плазмиды вирулентности иерсиний в развитии инфекционного процесса

Как уже отмечалось, для максимального проявления патогенных свойств необходимы присутствие в клетках иерсиний плазмиды *rYV* и экспрессия кодируемых ею белков. Размеры плазмиды составляют около 70 тыс. пар оснований. Плаزمиды вирулентности иерсиний не является конъюгативной. Кроме того, она несовместима с половым фактором F, то есть *rYV* не способна самостоятельно проникать в клетки или переноситься в них каким-либо агентом.

Известно, что штаммы иерсиний, обладающие плазмидой вирулентности, проявляют следующие фенотипические признаки, зависящие от температуры среды:

- клеточную адгезию, аутоагглютинацию и поверхностную агглютинацию;
- зависимость роста от концентрации Ca^{2+} в среде культивирования;
- синтез белков наружной мембраны (OMPs), в том числе V- и W-антигенов;

- высвобождение белков в среду культивирования;

- повышенную гидрофобность клеточной поверхности;

- летальность мышей при заражении *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* серовара O:8 (но не другими сероварами *Y. enterocolitica*).

Организация *rYV*

Белки, кодируемые плазмидой вирулентности иерсиний, можно разделить на следующие группы.

1. Белок *YadA* (адгезин) и липопротеин *YlpA* [33, 34].

2. Белки *Yop_s* (от *Yersinia outer protein*) – известно примерно 13 полипептидов [35], около 10 белков обнаруживаются в культуральной жидкости; в некоторых работах их классифицируют как *Rp_s* (*released proteins*), или как секретируемые белки.

Эти белки делят по крайней мере на *mpu* группы [36]:

а) белки-эффекторы – направляются внутрь клетки-мишени (*YopE*, *YopH*, *YpkA/YopO*, *YopJ/YopP*, *YopM*, *YopT*);

б) белки, необходимые для переноса эффекторов через клеточную мембрану хозяина – порообразующие *YopB* и *YopD*, вспомогательный *LcrV*;

в) белки, участвующие в регуляции переноса эффекторов внутрь клетки-мишени – *YopN/LcrE*, *TyeA*, *LcrG*, (*LcrV*), *YopK/YopQ*.

3. Белки, образующие аппарат секреции *Yop_s* – кодируются 20 генами *ysc* (*Yersinia sec-retion*) [36].

4. Белки, регулирующие экспрессию генов *yop_s*.

К настоящему времени плаزمиды вирулентности полностью секвенированы у всех трех видов патогенных иерсиний. Достаточно подробно изучены расположение генов и их регуляция.

Гены организованы в несколько моно- и полицистронных оперонов. Полицистронные опероны помимо *yop_s* также кодируют белки, участвующие в регуляции *Yop_s*, а также шапероны (внутриклеточные переносчики) для *yop_s*, которые не имеют сигнальной последовательности [37, 38]. Дополнительные полицистронные опероны кодируют другие регуляторные белки, а также белки аппарата секреции *Yop_s* [39, 40]. Все изученные *yop* опероны и некоторые регуляторные опероны объединены в так называемый *yop* регулон (или вирулон), который в конечном итоге находится под контролем белка *YmoA* [41].

Адгезин и липопротеин, функции и «вклад» в вирулентность иерсиний

YadA (*Yersinia adhesin A*; первоначально *Yop1*, *YopA*) – белок, состоящий из мономеров по 45 кДа, которые агрегируют на поверхности клеток в фиб-

рилярные структуры с молекулярной массой 200–240 кДа [14]. Другие авторы считают, что мономер YadA имеет молекулярную массу 53 кДа, а нативный белок – 116 кДа и содержит 2–3 мономера.

В отличие от других плазмидных белков YadA синтезируется в клетках независимо от наличия или отсутствия в среде Ca^{2+} [40, 42]. У *Y. pestis* ген *yadA* содержит делецию из одной пары оснований и, как следствие, имеет сдвиг рамки считывания. Поэтому этот белок у *Y. pestis* не синтезируется, хотя ген и содержится в плазмиде вирулентности [28].

Белок YadA вызывает аутоагглютинацию иерсиний и маннозостойчивую агглютинацию эритроцитов морской свинки [14]. Он может связывать широкий ряд эукариотических внеклеточных и поверхностных клеточных структур, таких, как коллаген, фибронектин, ламинины [43, 44, 45].

Белок YadA эффективно прикрепляется к интестинальным тканям кролика, к мембране линзы хрусталика глаза и к интестинальной подслизистой оболочке человека [44, 46, 47]. Кроме того, он опосредует прикрепление иерсиний к культивируемым клеточным линиям HEp-2, HeLa и проявление активности Yop_B в отсутствие инвазина, например у мутантного по инвазину штамма [48, 49].

Итак, белок YadA может рассматриваться в качестве ведущего адгезина иерсиний, необходимого для прикрепления патогена к эукариотическим клеткам [28]. Полагают, что адгезия за счет адгезина не является специфичной, а осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий. Однако адгезин может опосредовать и проникновение иерсиний внутрь клеток хозяина, возможно, за счет взаимодействия с β_1 -интегринами, как и в случае инвазина [48, 50].

Установлено, что одна из функций белка YadA заключается в защите клеток иерсиний от обезвреживающего действия человеческой сыворотки. Это происходит за счет связывания фактора H, что препятствует размещению C3b комплемента на поверхности бактерий, вероятно, за счет быстрой инактивации этих молекул. Естественно, что это усиливает вирулентность иерсиний.

Белок YadA влияет также на поглощение опсонизированных иерсиний гранулоцитами хозяина [51], ингибирует антиинвазивное действие интерферона. Возможно, что он участвует в защите патогена от макрофагов, способствуя прикреплению бактерий к этим эукариотическим клеткам и процессу внедрения белков-эффекторов внутрь макрофагов [28].

Обнаружено существенное различие во влиянии мутаций в гене *yadA* *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* на их вирулентность в опытах на мышах [28]. Так, мутант *Y. enterocolitica* проявлял значительно

сниженную вирулентность, чем изогенный родительский штамм [14, 52]. Вероятно, из-за неспособности таких мутантов колонизировать пейеровы бляшки бактериальные клетки элиминировались из организма экспериментального животного и лишь небольшое количество бактерий обнаруживалось в мезентериальных лимфоузлах, селезенке и печени.

Кроме того, воспаление и некроз печени были значительно редуцированы. Аттенуация этих мутантов вряд ли является результатом того, что белок YadA необходим иерсиниям для проникновения в пейеровы бляшки. По-видимому, он нужен для персистенции бактерий в лимфоузлах и, возможно, для диссеминации бактерий в другие органы и ткани [28].

Имеются данные, свидетельствующие о том, что экспрессия белка YadA *in vivo* позволяет *Y. enterocolitica* более эффективно колонизировать тонкую кишку и препятствует проникновению бактерий вглубь ее слизистой оболочки.

Мутант *Y. pseudotuberculosis*, наоборот, проявлял такую же вирулентность, как и родительский штамм, и эффективно колонизировал пейеровы бляшки [53]. Интересно, что при исследовании вирулентных свойств двойных *inv yadA* мутантов *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* в моделях на мышах также оказалось, что мутантный штамм *Y. enterocolitica* теряет свои вирулентные свойства, тогда как *Y. pseudotuberculosis* остается вирулентным, как и родительский штамм [53]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что у *Y. pseudotuberculosis* ни инвазин, ни адгезин не играют значительной роли в инфекционном процессе и что этот патоген должен обладать дополнительными факторами адгезии [28].

YlpA – липопротеин иерсиний. Он также входит в состав Yop регулона и экспрессируется при температуре 37°C и в отсутствие Ca^{2+} [34].

YlpA имеет типичную сигнальную последовательность, не требует аппарата секреции в отличие от других Yop_B , локализуется в наружной мембране. Мутации в белковом домене не влияют на вирулентность в опытах на мышах [34]. На этот белок обращают внимание из-за почти 88% гомологии по аминокислотному составу с плазмидными белками TraT из *E. coli*, которые придают бактериям устойчивость к воздействию сывороток, ингибирование фагоцитоза макрофагами и способствуют отсоединению поверхностей бактериальных клеток после конъюгации [28]. Однако об участии липопротеина иерсиний в подобных процессах сведения пока отсутствуют.

Эффекторные белки

Действие этих белков направлено главным образом на подавление фагоцитарной активности кле-

ток иммунной системы [54]. В этот процесс вовлечено 6 белков, 3 из которых – YopE (*цитотоксин*), YopH (*тирозинфосфатаза*), YpkA (*протеинкиназа*) – известны давно и подробно изучены.

Далее рассмотрим строение и функции этих и других белков, прямо участвующих во взаимодействии бактерий с организмом хозяина.

YopE – секретируемый белок с молекулярной массой 23 кДа и свойствами цитотоксина. Механизм его воздействия на клетку точно не установлен, но известно, что после попадания YopE в эукариотическую клетку происходит расплетание филаментов веретена деления в клетках-мишенях.

Цитотоксическое воздействие YopE на клетку хозяина происходит только после прикрепления патогена к эукариотической клетке [55]. Перенос YopE внутрь клетки хозяина поляризован и происходит в месте контакта с патогеном. Данный белок, полученный из культуральной жидкости, не оказывает цитотоксического воздействия на клетки-мишени ни при добавлении к смеси клеток, ни при непосредственном введении внутрь клеток. Кроме того, если патоген попадает внутрь клетки хозяина, то цитотоксин также не проявляет активности.

YopH является фосфотириозинфосфатазой с молекулярной массой 51 кДа [56]. Участок на С-конце белка имеет 262 аминокислоты, гомологичные эукариотическим тирозинфосфатазам, и является активным центром фермента [56].

YopH катализирует дефосфорилирование специфических белков макрофагов и клеток эпителиальной ткани хозяина и влияет на процессы передачи сигналов клетками иммунной системы (макрофаги, лейкоциты) путем отмены сигнала, индуцируемого β_1 -интегринами [56, 57, 58]. Это приводит к неспособности клеток иммунной системы оказывать бактерицидное действие за счет выделения бактерицидных ферментов, активации окислительного взрыва у макрофагов, хемотаксических и фагоцитарных рецепторов на поверхности клеток [5].

Получены данные о том, что патогенные иерсинии способны подавлять немедленный ответ фагоцитов путем ингибирования Ca^{2+} -зависимого сигнального пути у нейтрофилов, который инициируется в момент прикрепления патогена к клеточной поверхности [5]. И этот процесс является YopH-зависимым. YopH может также опосредовать устойчивость к поглощению макрофагами опсонированных иммуноглобулинами бактерий [59], что также регулируется через Ca^{2+} -зависимый сигнальный путь [5].

YpkA (YopO) – протеинкиназа, секретируемый продукт плазмидного оперона, содержащего два структурных гена – *ypkA/yopO* и *yopJ/yopP* [60].

У *Y. pseudotuberculosis* этот белок имеет молекулярную массу 81,7 кДа. Обнаружено, что у *Y. pestis* и *Y. enterocolitica* фермент имеет сходную молекулярную массу [60]. Кроме того, наблюдается значительная его гомология с эукариотическими Ser/Thr протеинкиназами.

В опытах на мышах YpkA является существенным фактором вирулентности [60]. Показано, что при введении в мутантные штаммы *Y. pseudotuberculosis*, неэкспрессирующих некоторые Yops (YopH, M, E, K и YpkA), высококопийной плазмиды с нормальным геном белка YpkA происходила секрция большого количества этого белка *in vitro*. Заражение культивируемых HeLa клеток такими штаммами приводило к морфологическим изменениям инфицированных клеток-мишеней. Кроме того, было обнаружено, что после прикрепления патогена к HeLa клеткам происходил перенос YpkA с помощью YopB-транслоцирующего механизма на внутреннюю поверхность плазматической мембраны хозяина. Это указывает на то, что данный эффектор вовлечен во взаимодействие с сигнальной системой и повышает вирулентность микроба.

YopJ/YopP – белок с массой 31–32,5 кДа, содержащий 288 аминокислотных остатков [61, 62]. Первоначально он рассматривался как не несущий вирулентной нагрузки, так как в опытах на мышах мутантные по этому гену *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* оставались по-прежнему вирулентными. Однако позднее было установлено, что этот «минорный» белок, который секретируется в гораздо меньших количествах, чем, например, YopE [28], индуцировал апоптоз макрофагов [61, 63].

Следует отметить, что иерсинии способны индуцировать апоптоз только клеток лимфоидной ткани. Это может иметь значение в процессе инфекции, когда включение механизма апоптоза у макрофагов хозяина приводит к их инактивации и тем самым исключению воспалительного ответа, что, в свою очередь, приводит к внеклеточному размножению патогена в лимфоидной ткани [28].

YopP-белок *Y. enterocolitica* подавлял образование инфицированными макрофагами TNF- α [61, 64]. Этот эффект коррелирует с *митогенактивируемой протеинкиназой* (МАРК) макрофагов. Кроме того, белок ингибирует активность внеклеточного сигнала регулируемой киназы-2 макрофагов (ERK-2). Интересно, что YopJ/YopP имеет высокую степень схожести с белками AvrRxv *Xanthomonas campestris*, AvrA – бактерий рода *Salmonella* и у 410 – рода *Rhizobium*, функции которых практически неизвестны [28].

AvrRxv – это один из многих авирулентных белков растительных патогенов, которые опосредуют

реакцию гиперчувствительности у растений, по-видимому, запуская механизм апоптоза [28].

YopM – кислый белок с изоэлектрической точкой 4,06 и массой 41,6 кДа, имеет гидрофобные участки на С- и N-концах молекулы, содержит 12 богатых лейцином повторяющихся последовательностей. Интересно, что белок YopM, изолированный из штамма *Y. enterocolitica* серовара O:8 от пациента с тяжелым течением болезни, имел массу 56,9 кДа [28]. Авторы предположили, что увеличение молекулярной массы этого белка связано с дубликацией некоторых участков гена из-за повтора последовательностей, присутствующих в этом гене. О вирулентных функциях этого белка известно относительно немного [28].

Y. enterocolitica и *Y. pestis*, мутантные по *yopM*, имели значительно большую LD₅₀ для мышей, а также проявляли сниженную способность размножаться в печени и селезенке инфицированных *Y. enterocolitica* мышей [65]. Исследования *in vitro* показали, что очищенный YopM обладает тромбин-связывающей активностью и может полностью ингибировать тромбининдуцируемую активность тромбоцитов [65].

Предполагается, что YopM – это один из внеклеточных эффекторов. Относительно недавно были получены данные о том, что он может попадать внутрь эукариотической клетки, но мишень для этого белка внутри клетки пока не установлена.

YopM-белок имеет значительную гомологию с IpaH из бактерий рода *Shigella* и с u4fR из бактерий рода *Rhizobium*. Функции этих белков неизвестны.

YopT – недавно описанный белок с молекулярной массой 35,5 кДа [66]. Обнаружено, что он индуцирует цитотоксическое воздействие на клетки HeLa и макрофаги. Действие состоит в разрушении актиновых нитей и изменении цитоскелета.

Таким образом, этот белок наряду с YopE обладает свойствами цитотоксина.

Механизм секреции эффекторных белков

Транспорт и секреция Yop_s осуществляются кодируемой плазмидой вирулентности системой [67]. Такая система позволяет иерсиниям впрыскивать белки-эффекторы непосредственно внутрь клеток-мишеней и таким образом подавлять их специфические функции. Важно, что для успешной секреции белков-эффекторов внутрь клеток-мишеней необходимо, чтобы патоген прикрепился к поверхности эукариотической клетки, сохраняя внеклеточную локализацию.

In vitro при температуре 37°C и дефиците Ca²⁺ иерсинии секретируют белки Yop_s в среду культивирования. Некоторые из них (YopM, YopK/YopQ,

YopR, LcrV) растворимы в культуральной жидкости, другие (YopH, YopE, YopO/YpkA, YopB, YopD, YopP/YopJ, YopN/LcrE) образуют крупные нерастворимые агрегаты. Однако выделенные из культуральной среды белки не оказывают какого-либо токсического воздействия на клетки эукариот [68].

Белки аппарата секреции образуют каналы, проходящие сквозь внутреннюю цитоплазматическую мембрану, периплазматическое пространство и наружную мембрану бактерий [67]. Эти каналы обеспечивают одноэтапный перенос белков-эффекторов к месту контакта с клеткой-мишенью.

С системой секреции типа III иерсиний тесно ассоциированы белки-эффекторы, образующие поры в мембране эукариотической клетки – YopD и YopB [71], а также LcrV, YopK/YopQ, которые рассматриваются в этом разделе.

Следует отметить, что для Yop_s-белков характерно отсутствие классической N-терминальной сигнальной последовательности, поэтому они не подвергаются процессингу при транспортировке. Для их успешной транспортировки и секреции необходимы белки-шапероны Syc (*specific Yop chaperone*). У иерсиний пока обнаружено 6 таких белков – SycD (для YopB и YopD) [70], SycE (для YopE), SycH (для YopH), SycT (для YopT) [66], SycN (для YopN) [28].

Роль шаперонов скорее всего заключается в стабилизации конформации белков-эффекторов в цитозоле бактериальной клетки и в предотвращении их взаимодействия до момента секреции.

Порообразующие белки. Впрыскивание белков-эффекторов внутрь клетки-мишени, как сказано выше, осуществляется через поры в мембране эукариотической клетки, образуемые в месте контакта. Определен диаметр этих пор – 1,2–3,5 нм [71], по другим данным – 1,6–2,3 нм [69]. Получены многочисленные доказательства того, что в образовании этих пор участвуют главным образом 2 белка – YopB и YopD; белок LcrV вовлечен в этот процесс опосредованно [69, 71, 72, 73].

YopB кодируется дистальной частью большого плазмидного оперона IcrGV *sycD yopBD* [68]. Он состоит из 401 аминокислоты у *Y. enterocolitica* и у *Y. pseudotuberculosis*. Молекулярная масса белка обоих видов равна 41,942 и 41,745 кДа соответственно; изоэлектрическая точка (pI) равна соответственно 6,73 и 7,29.

Белок обладает двумя гидрофобными участками, которые разделены последовательностью из 15 аминокислот. Первый участок состоит из 44 аминокислот (позиции 165–208), второй – из 35 (позиции 224–258). Согласно компьютерному анализу, YopB-белок имеет типичное для трансмемб-

ранных белков строение в отличие от белков, имеющих глобулярные модели, – YopE, YopH и YopQ.

YopB из *Y. pseudotuberculosis* имеет некоторое сходство с белком IpaB *Shigella flexneri*. Он определяет инвазивный фенотип этого вида бактерий и является контактным гемолизинном, способным повреждать мембраны [56]. Белок IpaB аналогично YopB имеет два трансмембранных участка. Кроме того, YopB имеет значительную гомологию с гидрофобными участками белков RTX семейства α -гемолизиннов и лейкотоксинов, хотя на участке связывания с Ca^{2+} гомология отсутствует [68]. На основании такого сходства было предположено, что YopB может обладать гемолитической активностью.

Интересно, что очищенный YopB обладал *in vitro* мембранодеструктивной активностью [71]. Сообщалось о том, что очищенный YopB из *Y. enterocolitica* препятствует высвобождению TNF- α макрофагами [73]. TNF- α является цитокином и играет центральную роль в регуляции иммунитета и развитии воспалительного ответа. При обработке культивируемых макрофагов культуральным супернатантом, содержащим белки наружной мембраны иерсиний, происходила супрессия экспрессии мРНК TNF- α , но не интерлейкина-1 и интерлейкина-6. Этот эффект нивелировался после обработки культуры макрофагов сывороткой к YopB. Очищенный YopB также индуцировал супрессию продукции TNF- α . Кроме того, у инфицированных иерсиниями мышей не наблюдалось высвобождения TNF- α макрофагами в пейеровых бляшках, первичных участках инвазии патогена, тогда как интерлейкин-1 (α и β) нормально экспрессировался.

При обработке anti-YopB макрофагов перорально инфицированных мышей значительно снижалось количество живых бактерий, выделяемых из пейеровых бляшек животных, а количество высвобождающегося TNF- α возросло. Очевидно, что супрессия отдельного цитокина недостаточна для выживания микроба внутри хозяина, но все же очевидно, что YopB вносит существенный «вклад» в подавление ответа хозяина на инфекцию.

Белок YopD состоит из 306 аминокислот, имеет молекулярную массу 33,357 кДа у *Y. pseudotuberculosis* (pI = 6,99) и 33,234 кДа – у *Y. enterocolitica* (pI = 6,56) [68]. У обоих видов белок имеет один гидрофобный участок в середине молекулы, состоящий из 31 аминокислоты (позиции 122–152) и одного амфипатического домена на C-конце в положении 278–292 [68]. Последовательность аминокислот белка также определяет его трансмембранные свойства.

Белки YopD и YopB у обоих видов обладают высоким уровнем гомологии, что позволяет сделать заключение о дубликации и конвергенции кодирующих их

генов в процессе эволюции. Помимо этого каждый из белков обладает высокой степенью консервативности по сравнению с другими Yop-белками [68].

Недавно были получены данные о непосредственном взаимодействии *in vitro* белков YopD и YopE [72]. При исследовании методом аффинного блота возможности связывания YopD с другими Yop белками было обнаружено, что YopD связывается преимущественно с YopE и YopB. Причем YopE связывается с центральным участком молекулы YopD. Получены данные о существенном значении этого гидрофобного участка у YopD для образования пор [71]. Обнаружено также, что YopD негативно воздействует на Yop вирулон и, следовательно, может выполнять у иерсиний двойную функцию.

Итак, очевидно, что YopB и YopD являются структурными компонентами пор, представляющих собой гетерогенный трансмембранный комплекс [69]. Более того, показано, что эти белки транспортируются к месту сборки в ассоциации шапероном SycD [70] и полимеризуются в виде канала после секреции из бактериальной клетки. По-видимому, YopD – более подвижный элемент этого комплекса, так как показано, что он может связываться с некоторыми эффекторами [72] и обнаруживается в цитоплазме клетки-мишени [70].

Роль LcrV в секреции эффекторных белков. LcrV, или V-антиген – полипептид с молекулярной массой 37 кДа [75], кодируемый большим опероном IcrGVsycDYopBD. Этот белок известен уже около 50 лет благодаря своим протективным свойствам. Он активно изучается в целях создания противочумной вакцины.

Предполагается, что LcrV супрессирует воспалительный ответ на ранней стадии инфекции, что подтверждено экспериментально. Введение LcrV в организм мышей подавляло экспрессию TNF- α и INF- γ , а также пролонгировало выживаемость LcrV-негативных штаммов *Y. pestis* в организме животных, а также выживаемость бактерий родов *Salmonella* и *Listeria*. Кроме этого, было замечено, что LcrV задерживает отторжение пересаженной аллоткани и повышает устойчивость к липополисахаридам у мышей. LcrV способен также ингибировать хемотаксическую активность нейтрофилов *in vitro* и *in vivo*.

Экспериментальные данные [73, 76, 77] позволили предположить, что LcrB наряду с YopB и YopD является одним из элементов транслокационной системы иерсиний и способен взаимодействовать с этими белками, а также с LcrG (см. ниже). В недавних исследованиях LcrV придана значительная роль в транслокации эффекторных белков [36].

LcrV обнаруживается на поверхности бактерий еще до контакта между патогеном и клеткой-мишенью и является, таким образом, секретруемым белком наружной мембраны. Авторы заключили, что LcrV нужен на самых ранних стадиях переноса белков-эффекторов. Поскольку этот белок способен, по-видимому, взаимодействовать с рецепторами эукариотических клеток, то одна из потенциальных ролей LcrV могла бы состоять в сенсорном контакте с рецептором клетки-мишени. Возможно, что роль этого белка как в транслокации, так и в иммуносупрессии опосредуется через общее рецепторное взаимодействие.

Белки аппарата секреции. Как отмечалось, аппарат секреции III типа состоит из более чем 20 белков, кодируемых плазмидными генами *ysc* (по некоторым данным – из 28 белков) [28]. Эти гены содержатся в 4 больших локусах, названных первоначально у *Y. enterocolitica* *virA*, *virB*, *virG*, *virC* [28, 40]. Не все гены, входящие в локусы *ysc*, существенны для секреции белков-эффекторов. Сейчас используется другая номенклатура для обозначения входящих в эти локусы генов, однако такое деление на группы сохранилось для всех трех видов рассматриваемых иерсиний [28].

Локус *virC* кодирует 13 белков. Наиболее изучен белок YscC [28]. Он относится к группе секретинов – белков наружной мембраны, участвующих в транспорте различных макромолекул через наружную мембрану. Несколько мономеров этого белка образуют большой (около 600 кДа) комплекс в виде кольцевой структуры [78]. Еще один белок, кодируемый геном *yscH* из этого локуса, **YopR-белок**, существенен для патогенеза, поскольку летальная доза для мутанта *Y. enterocolitica* по этому гену в 10 раз выше, чем у дикого изогенного штамма. Остальные гены этого локуса участвуют как в образовании канала для секреции белков, так и в регуляции синтеза Yop-белков [28].

Локус *virG* кодирует один небольшой белок YscW, имеющий домен для связывания с липидами и являющийся липопротеином. Этот белок помогает при встраивании секретина в наружную мембрану иерсиний и является существенным для секреции YopD, YopB и LcrV [28, 78].

Оперон *virB* состоит из 8 генов. Он кодирует белок YscN, который, возможно, является АТФазой. Кроме того, он также кодирует несколько белков, образующих канал во внутренней мембране иерсиний [28].

Локус *virA* кодирует 7 белков [28], в том числе белки, контролирующие перенос белков-эффекторов – YopN и TyeA (см. ниже), а также белок

LcrD/YscV, участвующий в образовании канала для секреции во внутренней мембране иерсиний.

Белки, контролирующие перенос эффекторов. С помощью мутаций выявлены три гена (*yopN*, *tyeA* и *IcrG*), вовлеченные в контроль переноса Yop_s в эукариотические клетки. Мутации в этих генах приводили к полной утрате чувствительности секреции Yop_s к концентрации Ca²⁺ [39, 79, 80].

YopN (LcrE) – белок молекулярной массой 32,6 кДа, лишенный гидрофобных доменов [39], имеющий 2 скрученные спиральные структуры [79]. *In vitro* YopN массово секретруется в среду культивирования при температуре 37°C в отсутствие ионов кальция, но в отличие от других Yop_s может обнаруживаться у бактерий при 37°C и в присутствии ионов кальция. В этом случае он располагается в наружной мембране [28], и его можно экстрагировать ксиленом [39, 79] или выделить в нерастворимой фракции мембран при обработке тритоном X-100 [79].

TyeA – белок молекулярной массой 10,8 кДа, состоящий из 92 аминокислотных остатков [39]. TyeA обнаруживается у иерсиний как в бактериальной цитозольной фракции, так и в нерастворимой в тритоне X-100 фракции наружных мембран независимо от концентрации ионов кальция в среде культивирования. Подобно YopN белок можно экстрагировать из бактериальной поверхности ксиленом, что говорит о близкой его ассоциации с мембраной [28].

LcrG – белок (масса – 11,0 кДа), состоящий из 96 аминокислотных остатков, который *in vitro* оказывал контролирующее действие на секрецию Yop_s [80]. Показано, что *IcrG* мутант *Y. enterocolitica* не способен эффективно переносить внутрь клеток хозяина белки YopE, YopH, YopM, YrkA/YopO и YopP. Однако при исследовании процесса порообразования у мутантного по *IcrG* штамма иерсиний выявлено, что белок LcrG не влияет на формирование пор, а скорее всего он вовлечен в процесс транспорта белков-эффекторов [70] и опосредует их эффективную интернализацию внутрь клеток-мишеней.

Белок LcrG первоначально был обнаружен в цитозоле, но его также можно обнаружить и в мембране и во внеклеточной среде [81]. Локализация белка LcrG при развитии инфекционного процесса не исследовалась [28], однако показано, что он может связываться с белком LcrV [81] и, возможно, играть роль ингибитора секреции Yop_s [77, 81].

Помимо этого обнаружено, что у *Y. enterocolitica* белок LcrG может непосредственно связываться с HeLa клетками, а именно с гепаринсодержащими протеогликанами на их поверхности [76]. Анализ структуры белка LcrG выявил последовательность, обладающую сродством к гепарину. Возможно, что

взаимодействие между белком LcrG и сульфатом гепарина, расположенном на поверхности HeLa клеток, является сигналом включения системы транслокации Yop_s.

YopK (YopQ) – недавно открытый белок, кодируемый плазмидой вирулентности и входящий в *yop* регулон. Первоначально он был обнаружен у *Y. pseudotuberculosis*. Гомологичные последовательности имеются и у *Y. enterocolitica* (YopQ), и у *Y. pestis* (YopK) [82]. Вначале предполагалось, что этот белок не участвует в защите *Y. pseudotuberculosis* от реакций первичного иммунного ответа хозяина. Его влияние происходит на другом уровне (этапе) развития инфекции, так как этот белок влиял на развитие системных болезней у инфицированных внутрибрюшинно и перорально мышей.

Дальнейшие исследования роли YopK у *Y. pseudotuberculosis* выявили участие этого белка в регуляции переноса Yop-эффекторов внутрь эукариотической клетки путем изменения размера пор, образуемых YopB [82].

Дополнительные механизмы секреции белков вирулентности. Предполагается, что аппарат секреции флагеллина, являющегося мономером сложной фибриллярной структуры бактерий, располагающейся на поверхности клеток, был эволюционным предшественником аппарата секреции типа III грам-отрицательных бактерий. Поэтому многие Ysc-белки имеют значительную гомологию аминокислотных последовательностей с белками, образующими фибриллярные структуры иерсиний [67].

Кроме того, некоторые другие бактерии обладают последовательностями, гомологичными YopD, выполняющими регуляторные и секреторные функции. Одна группа таких гомологов связана с функцией синтеза флагеллина у *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Campylobacter jejuni*. Другая группа связана с вирулентностью *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* и некоторых бактерий, патогенных для растений.

Показано, что в секреции вирулентных белков у *Y. enterocolitica* также может участвовать система секреции флагеллина [6]. В частности, так осуществляется транспорт ассоциированной с вирулентностью фосфолипазы (YpIA).

Регуляция экспрессии и секреции белков pYV. Известно, что экспрессия Yop_s, как и их секреция, зависит от внеклеточных факторов – температуры и концентрации Ca²⁺ в культуральной жидкости. Фенотипически это проявляется в том, что максимальная экспрессия Yop_s происходит при температуре 37°C, низком содержании кальция в среде или полном его отсутствии. У патогенных иерсиний существует уникальный механизм ответа на сниже-

ние концентрации кальция в среде – *low calcium response* (LCR), который ассоциирован с плазмидой. Такой регуляции подвержены *yop* опероны, некоторые регуляторные опероны и *ysc* опероны. Исключение составляет ген *yadA*, который не регулируется концентрацией Ca²⁺ [12].

Установлено, что регуляция осуществляется двумя независимыми регуляторными петлями в ДНК плазмиды: одна имеет отрицательное значение, другая – положительное [37, 83]. Положительная петля осуществляет температурозависимую регуляцию всех *pYV*-генов, другая, отрицательная – ингибирует экспрессию *yop_s* и *ylpA* при высоких концентрациях Ca²⁺ [28].

В положительной регуляции участвует активатор транскрипции VirF/LcrF – кодируемый в плазмидный белок 30,9 кДа, который имеет гомологию аминокислотной последовательности с белком-регулятором AraC некоторых грамотрицательных бактерий [41] и связывается с промоторами оперонов *yop_s*, *sysE*, *ylpA*, *yadA*, *virC* [34, 40, 42, 83]. VirF/LcrF не влияет на транскрипцию генов оперонов *virA* и *virB*, кодирующих белки аппарата секреции [83]. Но все эти зависимые и независимые от VirF/LcrF гены являются молчащими при низких температурах окружающей среды и начинают транскрибироваться при 37°C. Эти гены получили название «*yop*-стимулон» [28].

При переключении роста клеток с температуры 26°C на 37°C уровень VirF повышается даже в присутствии 2,5 мМ Ca²⁺ [83]. Это показывает, что VirF/LcrF является терморегулируемым. Показано, что регулятором экспрессии *virF/lcrF* является белок YmoA (*Yersinia modulator*), кодирующийся соответствующим хромосомным геном. Этот белок 8,1 кДа содержит очень много положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков и похож на белки-гистоны. В регуляции температурозависимой транскрипции генов *pYV* играет роль структура хроматина, и YmoA также вовлечен в этот процесс [28].

Доказано, что высокая концентрация Ca²⁺ отрицательно воздействует при температуре 37°C не только на секрецию Yop, но и на их синтез. В этой сложной отрицательной регуляции участвуют по крайней мере 5 локусов. Один из них является опероном V-антигена *IcrGV sysD yopBD* [84, 38]. Мутации в этом опероне приводят к появлению у бактерий температурочувствительного фенотипа, то есть мутант проявляет сниженную частоту деления при температуре 37°C вне зависимости от концентрации Ca²⁺.

Кажется маловероятным, чтобы ионы кальция могли поступать в цитозоль бактерий и непосред-

венно воздействовать на уровень транскрипции. Вероятно, что первоначальным этапом воздействия ионов кальция является ингибирование секреции Yop_{β} , которое по принципу обратной связи приводит к ингибированию транскрипции соответствующих генов [28].

Как говорилось ранее, *in vitro* секреция Yop_{β} происходит только при температуре 37°C, отсутствии или низкой концентрации Ca^{2+} в культуральной среде. В организме теплокровного хозяина концентрация Ca^{2+} в межклеточном пространстве достигает 2,5 мМ, но внутри клеток она существенно ниже [28]. Следовательно, иерсинии могли бы существовать и противостоять воздействию клеток хозяина, находясь только внутри клеток-мишеней.

Однако существуют доказательства того, что иерсинии могут нормально распространяться и размножаться и в межклеточном пространстве тканей теплокровного хозяина [85]. Возникает таким образом парадокс [28], когда иерсинии, находясь в непроницаемых для продукции Yop_{β} условиях, в течение инфекционного процесса тем не менее синтезируют и секретируют эти белки, о чем говорят результаты обнаружения антител к ним в сыворотке крови хозяев.

Как описано выше, было обнаружено, что мутанты по *yopN/lcrE*, *lcrG* и *tyeA* были нечувствительны к концентрации ионов кальция и секретируют Yop_{β} как при отсутствии Ca^{2+} в среде, так и при его присутствии. Следовательно, эти белки участвуют в регуляции секреции Yop_{β} . Показано, что ключевым моментом в регуляции процесса переноса эффекторных белков является контакт патогена с поверхностью клетки-мишени. Кроме того, получены данные о том, что инициация транскрипции происходит только после этого события.

Однако до сих пор точный механизм взаимодействия $YopN$, $TyeA$, $LcrG$ и их индивидуальный «вклад» в регуляцию поляризованной контактной секреции Yop_{β} и их экспрессию еще неизвестны. Следует отметить, что белок $LcrV$ имеет также важное значение для контроля переноса эффекторных белков (см. выше). Роль Ca^{2+} в этом процессе также не совсем ясна. Очевидно то, что контакт с клеткой-мишенью приводит к устранению доступа Ca^{2+} к регуляторным сайтам на поверхности иерсинии. Возможно также, что в этом процессе играют определенную роль другие белки, имеющие рецепторную функцию.

Предполагается, что концентрация Ca^{2+} в среде культивирования влияет на экспрессию Yop_{β} , по-видимому, через экспрессию репрессора транскрипции, который взаимодействует с промоторами *yop* [37]. При концентрации Ca^{2+} по крайней мере 2,5 мМ количество репрессора в клетках возрастает,

что ведет к репрессии генов *yop*. Выращивание бактерий на среде, дефицитной по Ca^{2+} , приводит к снижению количества этого репрессора и, следовательно, к дерепрессии генов *yop*.

Значение «островка высокой патогенности» и железорепрессируемой системы белков в вирулентности иерсиний

На современном этапе наших знаний патогенные иерсинии разделяют:

1) на штаммы с низкой патогенностью (вызывают интестинальные инфекции со средней тяжестью течения, нелетальны для мышей при их заражении низкими дозами);

2) с высокой патогенностью (вызывают системные инфекции с тяжелым течением болезни, летальны для мышей при заражении низкими дозами) [86].

К первой группе относят pYV^{+} штаммы *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* сероваров O:1 и O:3 и *Y. enterocolitica* биовара 1b, ко второй группе – pYV^{+} штаммы *Y. pseudotuberculosis* сероваров O:2, O:4, O:5 и *Y. enterocolitica* био групп 2–5. Такие различия коррелируют с наличием в геноме высокопатогенных иерсиний большого хромосомного фрагмента (35–45 тыс. пар оснований), содержащего гены вирулентности и имеющего признаки «островка патогенности».

Признаками «островков патогенности» помимо указанных выше являются:

а) содержание нескольких повторяющихся последовательностей (IS-элементов);

б) наличие у одного из концов островка гена транспортной РНК;

в) большее чем в остальном геноме соотношение Г+Ц [86].

«Островки патогенности» широко распространены у грамотрицательных бактерий и были открыты относительно недавно [87]. У разных родов грамотрицательных бактерий «островки» включают разнообразные гены, имеющие значение для вирулентности. Поскольку у иерсиний этот участок генома содержит гены, коррелирующие с высокой патогенностью, он получил название «островок высокой патогенности» (HPI – *high-pathogenicity island*) [88]. Эти «островки» характеризуются нестабильностью и часто подвергаются спонтанным делециям [87].

У иерсиний HPI содержит гены системы поглощения железа [86]. Система включает секретируемый **сидерофор**, называемый «*yersiniabactin*», или «*yersiniophore*», который хелатирует железо, связанное с белками эукариот, и транспортирует их в бактериальную клетку. Структура и свойства сидеро-

фора иерсиний хорошо изучены [89]. Участвующий в поглощении железа локус включает 11 генов, организованных в 4 оперона [86].

У *Y. pestis* и у *Y. enterocolitica* серотипа O:8 НР1 содержится дополнительный оперон, кодирующий систему поглощения гема. Гены этих локусов кодируют белки, необходимые для биосинтеза иерсиниабактина, транспорта связанного железа внутрь бактериальной клетки (рецептор наружной мембраны и транспортеры) и регуляции.

Синтез сидерофора у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* ассоциирован также с пигментацией колоний при выращивании на среде с хром-азурол S индикаторным красителем (конго красный) [90]. Потеря способности к пигментации, связанная со спонтанными делециями в «островке высокой патогенности», не означает полную потерю вирулентных свойств данным штаммом, но ассоциирована с отсутствием летальности у мышей.

В биосинтезе иерсиниабактина участвуют два белка с большой молекулярной массой (HMWP1 и HMWP2), образующие синтетазный комплекс [89]. Они кодируются генами *irp1* и *irp2* из оперона *irp*. В их сборке участвуют продукты еще трех генов – *ybtE/irp5*, *ybtS*, *ybtT/irp4* [86]. Показано, что инактивация гена *irp2* значительно снижает летальность мышей при заражении их штаммами *Y. pseudotuberculosis* [91].

Psn/FyuA – это рецептор наружной мембраны. Он обладает двойной функцией: рецепция иерсиниабактина и бактериоцина *Y. pestis* – пестицина [92]. Кодируется геном *psn/fyuA*. Транспортную функцию выполняют два других белка (YbtP и YbtQ), являющиеся пермеазами и локализующиеся во внутренней мембране [89]. Транспортеры для иерсиниабактина связаны с TonB-зависимой системой транспорта у грамотрицательных бактерий.

Описан активатор транскрипции YbtA, связывающийся с промоторами генов *psn/fyuA*, *ybtP* и *irp2*, и репрессор Fur, связывающийся со всеми четырьмя промоторными зонами оперонов системы иерсиниабактина [89, 93].

Участие иерсиниабактина в патогенезе иерсиниозов опосредовано через поглощение железа, связанного с молекулами белков-переносчиков в организме хозяина. Иерсинии чувствительны к концентрации железа в окружающей среде и, попадая в организм млекопитающего, не смогли бы активно размножиться и вызывать системную инфекцию, если бы у них не было такого механизма. Поэтому иерсиниабактин рассматривают как один из факторов вирулентности [86].

Иерсинии с низкой патогенностью не способны синтезировать свой собственный сидерофор с вы-

сокой степенью сродства к связанному железу. У них также отсутствует рецептор Psn/FyuA для иерсиниабактина. Однако они тем не менее обладают способностью к интернализации экзогенных сидерофоров, например ферроксамина и феррихрома. Для поглощения экзогенных сидерофоров иерсинии с низкой патогенностью используют рецепторы FoxA и FcuA [93]. Непатогенные иерсинии, выделяемые из окружающей среды, продуцируют растворимый сидерофор и аэробактин, которые не ассоциированы с вирулентностью.

Факторы токсигенности иерсиний

Продукция токсинов и токсических продуктов у бактерий является одним из основных факторов патогенности [94]. Как отмечалось выше, иерсинии обладают ярко выраженными цитотоксическими свойствами, которые опосредуются по крайней мере двумя известными Yop_s – YopE и YopT. Однако плазмидные цитотоксины специфически воздействуют на клетки иммунной системы млекопитающих.

Имеются данные о цитотоксическом воздействии *Y. pseudotuberculosis* на культивируемые клетки эпителиальной ткани *in vitro* и в опытах *in vivo* с использованием тестов на морских свинках и изолированной петли кишечника кролика [95, 96]. При этом клетки иерсинии проникали внутрь клеточных мишеней и разрушали их лизосомальный аппарат, за которым следовало разрушение самих клеток и возникали различной степени выраженности некротические поражения тканей. Данных о детерминантах, которые могли бы опосредовать этот процесс, в литературе нет. Исследовавшиеся *Y. enterocolitica* заметно отличались от *Y. pseudotuberculosis* по цитотоксичности в опытах *in vitro* и *in vivo* и не вызывали глубокого поражения тканей [11].

Для иерсиний характерно наличие разнообразных **энтеротоксинов** (Yst), кодируемых хромосомными генами [35, 93]. Среди симптомов иерсиниозных инфекций диарейный синдром ярко выражен, особенно у пациентов, выделяющих *Y. enterocolitica* различных сероботипов. Помимо Yst_s развитие диареи могут опосредовать различные фибриллярные и липополисахаридные структуры иерсиний.

Y. pseudotuberculosis обладает термостабильным токсином (ST), на который у пациентов с псевдотуберкулезом обнаруживаются антитела. Токсин летален для мышей (LD₅₀ = 4,5 мкг/мышь). Он выделен из бактерий, растущих при температуре 8–10°C. Это видоспецифический белок с молекулярной массой 45 кДа, устойчивый к высокой температуре (выдерживает кипячение в течение

5 мин), устойчив к воздействию анионного детергента (0,1–1,0% раствора додецил сульфата натрия). Белок стабилен при pH 6,0–8,0. Определена его аминокислотная последовательность в N-терминальной части.

У *Y. enterocolitica* также обнаружен термостабильный энтеротоксин [97]. Молекулярная масса токсического компонента равна 12,4 кДа [97]. Энтеротоксин может кодироваться двумя хромосомными генами – *ystA* и *ystB*. Ген *ystB* впервые выделен из *Y. enterocolitica* серотипа O:5 биовара 1A. Он содержит 216 пар оснований и кодирует белок, состоящий из 71 аминокислотного остатка.

Между генами *ystA* и *ystB* имеется 73,5% гомологии по нуклеотидной последовательности. При исследовании методом *полимеразной цепной реакции* (ПЦР) ряда серотипов *Y. enterocolitica* было обнаружено, что все положительные с *ystB* пробами штаммы относятся к биотипу 1A и большей частью – к так называемым непатогенным серотипам O:5, O:6, O:7,8, O:7,13 и O:10. Положительные с *ystA* пробами штаммы (78,5%) идентифицированы как патогенные серотипы. Из 36 содержащих ген *ystB* штаммов 18 имели клиническое происхождение и были положительны в тесте на мышах, что говорит о возможном участии *YstB* в патогенезе. При этом так называемые непатогенные штаммы могут быть вирулентными для человека.

У *Y. enterocolitica* регуляция экспрессии энтеротоксинов происходит на транскрипционном уровне. Часто ген токсина находится в «молчащем» состоянии. На экспрессию энтеротоксина очень сильно влияют физико-химические параметры окружающей среды, а также продукт гена *ymoA*. В обычной среде культивирования ген транскрибируется только при температуре ниже 30°C, что противоречит возможности участия энтеротоксина в развитии диареи при температуре тела. Однако транскрипция *yst* может индуцироваться при температуре 37°C, увеличении осмолярности и pH до значений, которые обычно имеют эти показатели в просвете кишечника.

Недавно у *Y. pseudotuberculosis* открыт суперантигенный токсин **YPM** (*Y. pseudotuberculosis-derived mitogen*). Этот антиген обнаружен в культуральном супернатанте штаммов, выделенных от пациентов с симптомами болезни Кавасаки в Японии. Была выделена и охарактеризована субстанция, которая проявляла митогенную активность на модели мононуклеарных клеток периферической крови [98].

Антиген состоял из 131 аминокислоты и имел массу в 14,5 кДа. YPM кодируется, по-видимому, хромосомным геном. Описано три разновидности суперантигена *Y. pseudotuberculosis* – YPMa, YPMb

и YPMc [99]. Разделение на группы осуществляется только по нуклеотидной или аминокислотной последовательности генов и самих суперантигенов. Групповая принадлежность коррелирует с географическим распределением штаммов, обладающих суперантигеном.

При исследовании сывороток крови у 61% пациентов с псевдотуберкулезом выявлены IgG-антитела к YPM. Причем у пациентов с различными системными осложнениями титр антител был выше. Очищенный суперантиген вызывал летальный шок у мышей, проявляя токсичность *in vivo*. Помимо этого было продемонстрировано, что токсин может мешать нормальной функции эпителиальных клеток, уменьшая транспорт ионов и повышая проницаемость эпителия [95].

Исследования вирулентности мутантного по гену *ypmA* штамма показало, что такие штаммы при внутривенном заражении менее вирулентны на мышах, чем их изогенные родительские штаммы [99, 100]. Однако при введении мутантного и родительского штаммов перорально или интрагастрально отличий в LD₅₀ не обнаружено.

Дефектный суперантиген также не влиял на диссеминацию и рост бактерий в органах (пейеровы бляшки, селезенка, мезентериальные лимфоузлы) мышей при пероральном заражении, а также не обнаружено изменений в этих органах после внутривенного и интрагастрального заражений. Авторы полагают, что суперантиген опосредует развитие системной инфекции у мышей.

Предполагается, что биологическая активность YPM заключается в стимуляции активной пролиферации Т-лимфоцитов, обладающих Т-клеточными рецепторами, и их активации, в результате которой происходит массовая продукция цитокинов антигенпрезентирующими клетками и Т-клетками, что, в свою очередь, приводит к развитию шока и повреждению тканей [99].

Таким образом, существуют доказательства вовлечения суперантигена в патогенетический процесс при иерсиниозах, вызванных *Y. pseudotuberculosis*. Возможно, что суперантигены ответственны за возникновение иммунопатологических состояний, сопряжены с гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, вызывающих различные метаболические и гематологические сдвиги при развитии инфекционного процесса [94].

Продукция экзоферментов и их «вклад» в инфекционный процесс

Показано, что некоторые *Y. enterocolitica* обладают **фосфолипазной активностью**, которая связана с лецитинзависимым гемолизом. Был определен

ген фосфолипазы у *Y. enterocolitica* [33]. При анализе нуклеотидной последовательности выявлены две расположенные друг за другом рамки считывания. Первая, *yp1A*, имеет 74% гомологии и 85% схожести с геном фосфолипазы А из *Serratia liquefaciens*. Однако другая, *yp1B*, менее схожа с геном второго аналогичного белка из *S. liquefaciens*.

Для оценки роли фосфолипазы в патогенезе был сконструирован мутант по *yp1A*. В качестве модели использовали мышей BALB/c. При пероральном заражении несколько мутантных микроорганизмов были выделены из мезентериальных лимфоузлов и пейеровых бляшек на 3-й или 5-й день после заражения. Однако ткань кишечника, в том числе пейеровы бляшки, были менее воспаленными, чем у моделей, зараженных родительским штаммом.

При заражении экстремально высокими дозами мутантных и нормальных бактерий в обоих случаях выделялось одинаковое число живых бактерий из мезентериальных лимфатических узлов и пейеровых бляшек. Однако число очагов воспаления, их интенсивность и степень некроза внутри них были значительно ниже при заражении мутантным штаммом. На основании этого было сделано заключение, что *Y. enterocolitica* продуцирует фосфолипазу А, имеющую значение в патогенезе.

SigA-протеазы являются ферментами, расщепляющими секреторные иммуноглобулины класса А. Их наличие характерно прежде всего для патогенных бактерий, вызывающих ряд локальных инфекций у человека. Эти ферменты были обнаружены с помощью ПЦР также у *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* [101]. Гены, отвечающие за синтез ферментов, расположены на хромосоме. «Вклад» протеаз в развитие инфекционного процесса состоит в подавлении местной противинфекционной защиты открытых полостей макроорганизма, в частности слизистых оболочек.

Кроме того, при расщеплении молекулы SigA образуются Fab- и Fc-фрагменты. Fab-фрагменты, связываясь с поверхностью бактерий, предохраняют последние от воздействия активных антител.

Таким образом, SigA-протеазы рассматривают как фактор, участвующий в проявлении патогенности бактерий. В фильтрате культуральной жидкости *Y. pseudotuberculosis* обнаружена **секретируемая трипсиноподобная протеиназа** массой в 110 кДа [102], которая, как считают авторы, вносит важнейший «вклад» в патогенность бактерии.

Заключение

Представленные материалы свидетельствуют о сложности процессов взаимодействия иерсиний с организмом хозяина, в который вовлечены многие специализированные структуры паразита, имеющие полидетерминантную природу. Они демонстрируют также сложность генетического контроля факторов патогенности, значение состояния макроорганизма и условий существования бактерий для экспрессии вирулентности.

Важнейшее значение в регуляции экспрессии патогенных свойств иерсиний имеют плазмиды класса rYV. Значительная роль в их проявлении принадлежит белкам наружной мембраны и другим структурам.

Однако необходимы дальнейшие исследования многих процессов интимных взаимоотношений в системе «паразит–хозяин», в частности особенностей молекулярно-генетических механизмов экспрессии патогенности как способа сохранения видов и защиты от иммунных реакций организма.

Благодарность

Выражаем искреннюю признательность и благодарность академику РАМН А.А. Тотолян за ценные советы при оформлении настоящего обзора литературы.

Литература

1. Определитель бактерий Берджи. Пер с англ. Г.А. Заварзина. Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. В 2 т. Москва: Мир; 1997.
2. Skurnik M., Peippo A., Ervela E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. *Mol Microbiol* 2000; 37:316-30.
3. Kapratl V., Olson J.W., Pepe J.C., Miller V.L., Minnich S.A. Temperature-dependent regulation of *Yersinia enterocolitica* Class III flagellar genes. *Mol Microbiol* 1996;19:1061-71.
4. Bottone E.J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb Infect* 1999; 1:323-33.
5. Andersson K., Magnusson K.-E., Majeed M., Stenghal O., Fallman M. *Yersinia pseudotuberculosis*-induced calcium signaling in neutrophils is blocked by the virulence effector YopH. *Infect Immun* 1999; 67:2567-74.
6. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6456-61.

7. Heesemann J., Keller C., Morawa R., Schmidt N., Seimens H.J., Laufs R. Plasmid of human strains of *Yersinia enterocolitica*: molecular relatedness and possible importance. *J Infect Dis* 1983; 147:107-15.
8. Lian C.J., Hwang W.S., Kelly J.K., Pai C.H. Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid: an *in vivo* study. *J Med Microbiol* 1987; 24:219-26.
9. Lian C.J., Pai C.H. Inhibition of human neutrophil hemoluminescence by plasmid-mediated outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1985; 49:145-51.
10. Forsberg A., Rosqvist R. *In vivo* expression of virulence genes of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Agents Dis* 1993; 2:275-78.
11. Ценева Г.Я. Варианты проявления основных патогенных свойств иерсиний в эксперименте и их сопоставление с изменениями у больных. Материалы международной конференции «Инфекции, обусловленные иерсиниями (иерсиниоз, псевдотуберкулез), и другие актуальные инфекции». Санкт-Петербургский НИИЭМ им. Пастера; 2000. с. 66.
12. Kapperud G., Namork E., Skarpeid H.-J. Temperature-inducible surface-fibrillae associated with the virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 1985; 47:561-6.
13. Isberg R.R., Falkow S. A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permit invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* 1985; 317:262-4.
14. Kapperud G., Namork E., Skurnik M., Nesbakken T. Plasmid-mediate surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. *Infect Immun* 1987; 55:2247-2254.
15. Yang Y., Isberg R.R. Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH6 antigen adhesin by two envelope-associated components. *Mol Microbiol* 1997; 24:499-510.
16. Isberg R.R., Voorhis D., Falkow S. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cel* 1987; 50:769-78.
17. Straley S.C., Skrzypek E., Piano G.V., Bliska J.B. Yop₈ of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect Immun* 1993; 61:3105-10.
18. Arencibia I., Suatze N.C., Wolf-Watz H., Sundqvist K.G. *Yersinia* invasin, a bacterial beta-1-integrin ligand, is potent inducer of lymphocyte motility and migration to collagen type IV and fibronectin. *J Immunol* 1997; 159:1853-9.
19. Young V.B., Miller V.L., Falkow S., Schoolnik G.K. Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 1990; 4:1119-28.
20. Miller V.L., Falkow S. Evidence for two genetic loci from *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 1988; 56:1242-8.
21. Fortineau N., Beretti J.L., Berche P., Simonet M. Lack of antibody response to invasin in humans with yersiniosis. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 1994; 1:235-7.
22. Тимченко Н.Ф., Венедиктов В.С., Павлова Т.Н. Моделирование инициации псевдотуберкулезной инфекции. *Журн микробиол* 1988; 7:16-20.
23. Pederson K.J., Carlson S., Pierson D.E. The ClpP protein, a subunit of the Clp protease, modulating *ail* gene expression in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 1997; 26:99-107.
24. Pierson D.E., Falkow S. The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect Immun* 1993; 61:1846-52.
25. Pierson D.E. Mutations affecting lipopolysaccharide enhance *ail*-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells. *J Bacteriol* 1994; 176:4043-51.
26. Goverde R.L., Jansen W.H., Brunings H.A., Huis-in-'t-Veld J.H., Mooi F.R. Digoxigenin-labeled *inv*- and *ail*-probes for the detection and identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical specimens and naturally contaminated pig samples. *J Appl Bacteriol* 1993; 74:301-13.
27. Yang Y., Merriam J.J., Mueller J.P., Isberg R.R. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells. *Infect Immun* 1996; 64:2483-9.
28. Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.P., et al. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihistogenom. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62:1315-52.
29. Iriarte M., Stainier I., Cornelis G.R. The *rpoS* gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun* 1995; 63:1840-7.
30. Iriarte M., Vanooteghem J.C., Delor I., Diaz R., Knutton S., Cornelis G.R. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 1993; 9:507-20.
31. Sansonetti P.J., Phalipon A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* 1999; 11:193-203.
32. Clark M.A., Hirst B.H., Jepson M.A. M-cell surface beta 1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch cells. *Infect Immun* 1998; 66:1237-43.
33. Kwaga J., Iversen J.O. Plasmid and outer membrane proteins of *Yersinia enterocolitica* and related species of swine origin. *Vet Microbiol* 1993; 36:205-14.
34. China B., Michiels T., Cornelis G.R. The pYV plasmid of *Yersinia* encodes a lipoprotein YlpA, related to TraT. *Mol Microbiol* 1990; 4:1585-93.
35. Heesemann J. Enteropathogenic yersinias: pathogenicity factors and new diagnostic methods [Germany]. *Infect Immun* 1990; 18:186-91.
36. Pettersson J., Holmstrom A., Hill J., et al. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* 1999; 32:961-76.
37. Bergman T., Hakansson S., Forsberg A., et al. Analysis of the V-antigen *IcrGVH-yopBD* operon of *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for a regulatory role of *LcrH* and *LcrV*. *J Bacteriol* 1991; 173:1607-16.
38. Mulder B., Michiels T., Simonet M., Sory M.-P., Cornelis G. Identification of additional virulence determinants on the plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* 1989; 57:2534-41.

39. Forsberg A., Viitanen A.-M., Skurnik M., Wolf-Watz H. The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 1991; 5:977-86.
40. Michiels T., Vanooteghem J.-C., Lambert de Rouvroit C., et al. Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 1991; 173:4994-5009.
41. Cornelis G.R. Role of the transcription activator virF and the histone-like protein YmoA in the thermoregulation of virulence functions in Yersiniae. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis* 1993; 278:149-64.
42. Skurnik M., Toivanen P. LcrF is the temperature-regulated activator of the *yadA* gene of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* 1992; 174:2047-51.
43. Gripenberg-Lerche C., Skurnik M., Toivanen P. Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: experimental studies with rats. *Infect Immun* 1995; 63:3222-6.
44. Flugel A., Schulze-Koops H., Heesemann J., et al. Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entacin. *J Biol Chem* 1994; 269:29732-8.
45. Schulz-Koops H., Burkhardt H., Heesemann J., et al. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun* 1993; 61:2513-9.
46. Paerregaard A., Espersen F., Jensen O.M., Skurnik M. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect Immun* 1991; 59:253-260.
47. Paerregaard A., Espersen F., Skurnik M. Role of the *Yersinia* outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles. *APMIS* 1991; 99:226-32.
48. Bliska J.B., Copass M.C., Falkow S. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into Hep-2 cells. *Inf Immun* 1993; 61:3914-21.
49. Heesemann J., Gruter L. Genetic evidence that the outer membrane protein Yop1 of *Yersinia enterocolitica* mediates adherence and phagocytosis resistance to human epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 40:37-41.
50. Yang Y., Isberg R.R. Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the *Yersinia pseudotuberculosis yadA* product. *Infect Immun* 1993; 61:3907-13.
51. Visser L.G., Annema A., van Furth R. Role of Yops in inhibition of phagocytosis and killing of opsonized *Yersinia enterocolitica* by human granulocytes. *Infect Immun* 1995; 63:2570-5.
52. Roggenkamp A., Ruchdeschel K., Leitritz L., Schmitt R., Heesemann J. Deletion of aminoacids 29 to 81 in adhesion protein YadA of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun* 1996; 64:2506-14.
53. Han Y.W., Miller V.L. Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* 1997; 65:327-30.
54. Rosqvist R., Forsberg A., Wolf-Watz H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect Immun* 1991; 59:4562-9.
55. Forsberg A., Rosqvist R. *In vivo* expression of virulence genes of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Agents Dis* 1993; 2:275-8.
56. Guan K., Dixon J.E. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 1990; 249:553-6.
57. Andersson K., Carballeira N., Magnusson K.E., et al. YopH of *Yersinia pseudotuberculosis* interrupts early phosphotyrosine signalling associated with phagocytosis. *Mol Microbiol* 1996; 20:1057-69.
58. Persson C., Carballeira N., Wolf-Watz H., Fallman M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130 Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesion. *EMBO J* 1997; 16:2307-18.
59. Follman M., Andersson K., Hakansson S., Magnass K.-E., Stendahl O., Wolf-Watz H. *Yersinia pseudotuberculosis* inhibits Fc receptor-mediated phagocytosis in J774 cells. *Infect Immun* 1995; 63:3117-24.
60. Galyov E.E., Hakansson S., Forsberg A., Wolf-Watz H. A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* showing homology with eukariotic Ser/Thr protein kinases is an indispensable virulence determinant. *Nature* 1993; 361:730-2.
61. Mills S.D., Boland A., Sory M.P., et al. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12638-43.
62. Palmer L.E.S., Hobbie S., Galan J.E., Bliska J.B. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophages TNF- α production and downregulation of the MAP kinase p38 and JNK. *Mol Microbiol* 1998; 27:953-5.
63. Monack D.M., Mecsas J., Ghori N., Falkow S. *Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:10385-90.
64. Boland A., Cornelis G.R. Role of YopP in suppression of tumor necrosis factor alpha release by macrophages during *Yersinia* infection. *Infect Immun* 1998; 66:1878-1884.
65. Leung K.Y., Reisner B.S., Straley S.C. YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* 1990; 58:3262-71.
66. Iriarte M., Cornelis G.R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 1998; 29:915-29.
67. Kerr J. Type III (contact-dependent) secretion in Gram-negative bacteria. *Rev Med Microbiol* 1999; 10:155-64.
68. Hakansson S., Bergman T., Vanooteghem J.-C., Cornelis G., Wolf-Watz H. YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect Immun* 1993; 61:71-80.

69. Neyt C., Cornelis G. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* 1999; 33:971-81.
70. Neyt C., Cornelis G. Role of SycD, the shaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* 1999; 31:143-56.
71. Hakansson S., Schesser K., Persson C., et al. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* 1996; 15:5812-23.
72. Hartland E.L., Robins-Browne R.M. *In vitro* association between the virulence proteins, YopD and YopE, of *Yersinia enterocolitica*. *FEMS Microbiol Let* 1998; 162:207-13.
73. Sarker M.R., Neyt C., Stainier I., Cornelis G. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* 1998; 180:1207-14.
74. Beuscher H.U., Burdack S., Rollinghoff M. Bacterial cytokine antagonists encoded by pathogenic yersiniae. *Behring Institute Mitteilungen* 1997; 98:240-8.
75. Roggenkamp A., Geiger A.M., Leitritz L., Kessler A., Heesemann J. Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. *Infection Immun* 1997; 65:446-51.
76. Boyd A.P., Sory M.P., Iriarte M., Cornelis G.R. Heparin interferes with translocation of Yop proteins into HeLa cells and binds to LcrG, a regulatory component of the *Yersinia* Yop apparatus. *Mol Microbiol* 1998; 27:425-36.
77. Nilles M.L., Fields K.A., Straley S.C. The V antigen of *Yersinia pestis* regulates Yop vectorial targeting as well as Yop secretion through effects on YopB and LcrG. *J Bacteriol* 1998; 180:3410-20.
78. Koster M., Bitter W., de Cock H., Allaoui A., Cornelis G.R., Tommassen J. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* 1997; 26:789-98.
79. Iriarte M., Sory M.P., Boland A., et al. TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J* 1998; 17:1907-18.
80. Sarker M.R., Sory M.-P., Boyd A.P., Iriarte M., Cornelis G.R. LcrG is required for efficient translocation of *Yersinia* Yop effector proteins into eukaryotic cells. *Infect Immun* 1998; 66:2976-9.
81. Nilles M.L., Williams W., Skrzypek E., Straley S.C. *Yersinia pestis* LcrV forms a stable complex with LcrG and may have a secretion-related regulatory role in the low-Ca²⁺ response. *J Bacteriol* 1997; 179:1307-16.
82. Holmstrom A., Rosqvist R., Wolf-Watz H., Forsberg A. Virulence plasmid-encoded YopK is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* to cause systemic infection in mice. *Infect Immun* 1995; 63:2269-76.
83. Holmstrom A., Pettrson J., Rosqvist R., et al. A YopK of *Yersinia pseudotuberculosis* controls translocation of Yop effectors across the eukaryotic cell membrane. *Mol Microbiol* 1997; 24:73-91.
84. Lambert de Rouvroit C., Sluifers C., Cornelis G. Role of the transcriptional activator, VirF, and temperature in the expression of the pYV plasmid genes of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* 1992; 6:395-409.
85. Hanski C., Kutschuka U., Schmoranz H.P., et al. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun* 1989; 57:673-8.
86. Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Intern Micribiol* 1999; 2:161-7.
87. Hacker J., Blum-Oehler G., Muhldorier I. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 1997; 23:1089-97.
88. Carniel E., Guilvout I., Prentice M. Characterization of a large chromosomal «high-pathogenicity island» in biotype 1b *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 1996; 178:6743-51.
89. Gehring A.M., Demoll E., Fetherston J.D., et al. Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactine in *Yersinia pestis*. *Chem Biol* 1998; 5:573-86.
90. Buchrieser C., Brosh R., Bach S., Guiyole A., Carniel E. The high-pathogenicity island of *Y. pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn* tRNA genes. *Mol Microbiol* 1998; 30:965-78.
91. Carniel E., Guiyole A., Guilvout I., Mercereau Puijalon O. Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol Microbiol* 1992; 6:379-88.
92. Rakin A., Saken E., Harmsen D., Heesemann J. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function. *Mol Microbiol* 1994; 13:253-63.
93. Straley S.C., Perry R.D. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends in Microbiology* 1995; 3:310-7.
94. Бондаренко В.М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса. *Журн микробиол* 1999; 5:34-9.
95. Donnelly G.A.E., Lu J., Takeda T., McKey D.M. Colonic epithelial physiology is altered in response to the bacterial superantigen *Yersinia pseudotuberculosis* mitogen. *J Infect Dis* 1999; 180:1590-6.
96. Куляшова Л.Б., Ценева Г.Я., Буйневич Ю.Б. Роль антигенов наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* в патогенезе и диагностике псевдотуберкулеза. *Журн микробиол* 1997; 1:14-8.
97. Saikia G.K., Thapliyal D.C. Enterotoxigenicity as an attribute of virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Indian J Experiment Biol* 1997; 35:1108-10.
98. Miyoshi-Akiyama T., Imanischi K., Uchiyama T. Purification and partial characterization of a product from *Yersinia pseudotuberculosis* with the ability to acti-

- vate human T-cells. *Infect Immun* 1993; 61:3922-7.
99. Carnoy C., Muller-Alouf H., Desreumaux P., Mullet C., Grangette C., Simonet M. The superantigenic toxin of *Yersinia pseudotuberculosis*. a novel virulence factor? *Int J Med Microbiol* 2000; 290:477-82.
100. Carnoy C., Mullet C., Muller-Alouf H., Leteurtre E., Simonet M. Superantigen YPMa exacerbates the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect Immun* 2000; 68:2553-9.
101. Бондаренко В.М., Голкочева Е.Н., Найденский Х. Обнаружение островков высокой патогенности и син-теза SIgA протеазы у редко встречающихся видов иерсиний. Материалы конференции «Инфекции, обусловленные иерсиниями (иерсиниоз, псевдотуберкулез), и другие актуальные инфекции. Санкт-Петербургский НИИЭМ им. Пастера; 2000. с. 8.
102. Бурцева Т.И., Бузолева Л.С., Сомов Г.П. Секретируемая трипсиноподобная протеиназа *Yersinia pseudotuberculosis*. *Биохимия* 1995; 60:1589-95.
103. Gemski P., Lazere J.R., Casey T. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependence of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1980; 27:682-5.