

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПАТОГЕННОСТИ *COXIELLA BURNETII*

Ю.А. Панферова

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. *Coxiella burnetii* — облигатный внутриклеточный грамотрицательный бактериальный патоген, возбудитель Ку-лихорадки — природно-очагового заболевания, протекающего в острой (преимущественно в виде атипичной пневмонии) или хронической (чаще всего в виде эндокардита) форме. Хозяевами коксиелл в природе являются многие виды млекопитающих, птиц и членистоногих, основным источником инфекции для человека — сельскохозяйственные животные. Основным путем передачи инфекции — аэрозольный. При попадании в организм человека патоген связывается с фагоцитирующими клетками моноцитарно-макрофагального ряда. Внутри клетки хозяина *C. burnetii* способствует созреванию специфического, подобного фаголизосоме, компартмента, известного как коксиелла-содержащая вакуоль, внутри которого происходит метаболическая активация и репликация бактерий. Во внешней среде коксиелла существует в виде метаболически неактивной спороподобной формы. В процессе внедрения в клетку хозяина *C. burnetii* использует актин-зависимый фагоцитоз и механизм «застежки-молнии». После интернализации бактерии происходит созревание фаголизосомоподобного компартмента и формирование крупной коксиелла-содержащей вакуоли, занимающей почти всю цитоплазму клетки хозяина. Выживание инфицированных клеток является важным для поддержания хронической коксиеллезной инфекции. Коксиелла продлевает жизнеспособность хозяйской клетки двумя способами: она активно ингибирует апоптотический сигнальный каскад и индуцирует способствующие выживанию факторы. Помимо этого, коксиелла активно задействует компоненты аутофагии в формировании коксиелла-содержащей вакуоли, и индукция аутофагии способствует внутриклеточной репликации патогена. В процессе инфекции коксиелла с помощью секреторной системы IV типа транслоцирует эффекторные субстраты из бактериального цитозоля напрямую в цитозоль эукариотной клетки, где они взаимодействуют с белками хозяина. Всего идентифицировано около 130 секреторируемых эффекторов транспортной системы IV типа, функция большинства из них на данный момент неизвестна. Обнаружены специфические для ряда штаммов и изолятов секреторируемые белки, что подтверждает существующую гипотезу о наличии отдельных патотипов *C. burnetii*. Идентификация и характеристика новых факторов вирулентности стала возможной после появления бесклеточной среды для культивирования и развития методов сайт-специфического мутагенеза и других генетических манипуляций, что является важной вехой в исследовании молекулярного патогенеза *C. burnetii*.

Ключевые слова: *Coxiella burnetii*, Ку-лихорадка, молекулярный патогенез, вирулентность, транспортная система, секреторируемые эффекторы.

Адрес для переписки:

Панферова Юлия Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: (812) 232-21-36 (служебн.). Факс: (812) 232-92-17.
E-mail: panferova.jul@gmail.com

Contacts:

Yulia A. Panferova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-21-36 (office). Fax: +7 (812) 232-92-17.
E-mail: panferova.jul@gmail.com

Библиографическое описание:

Панферова Ю.А. Молекулярные основы патогенности *Coxiella burnetii* // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 1. С. 7–24. doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24

Citation:

Panferova Yu.A. *Coxiella burnetii* pathogenicity molecular basis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 7–24. doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-7-24

© Панферова Ю.А., 2016

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2016-1-7-24>

COXIELLA BURNETII PATHOGENICITY MOLECULAR BASIS

Panferova Yu.A.

St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. *Coxiella burnetii* is an obligate intracellular gram-negative bacterial pathogen, an ethiological agent of Q-fever, a zoonotic disease, elapsing as an acute (mostly atypical pneumonia) or a chronic (mostly endocarditis) form. The host range is represented by wide range of mammal, avian and arthropod species, but the main source of human infection are farm animals. The main route of infection is aerosolic. In case of contact with organism pathogen binds with phagocytal monocytic-macrophagal cell line. *C. burnetii* promotes maturation of specific phagolysosome-like compartment in host cell, called coxiella-containing vacuole, within this vacuole pathogen becomes metabolically activated and actively replicates. *Coxiella* persists as metabolically inactive spore-like form in environment. Internalisation of *C. burnetii* occurs using actin-mediated phagocytosis and zipper mechanism. After internalization of bacteria maturation of phagolysosome-like compartment and large coxiella-containing vacuole formation occure, and vacuole can occupy nearly the whole cytoplasm of the host cell. Survivance of infected cells is important for chronic infection with *C. burnetii*. *C. burnetii* elongate the viability of host cell by two ways: it actively inhibits apoptotic signal cascades and induce pro-survival factors. Except that *C. burnetii* involves autophagic pathway during coxiella-containing vacuole formation, and induction of autophagy promotes pathogen replication. During infection *C. burnetii* translocates effector substrates from bacterial cytosole to eucaryotic host cell cytosole using type IV secretion system, where effectors modulate host cell proteins. Overall approximately 130 secreted effectors of type IV transport system, but function of most of them remains unknown to date. Specific secreted proteins for variety of strains and isolates were identified, confirmed that certain pathotypes of *C. burnetii* can exist. Identification and characterization of novel virulence factors it is now possible through axenic media for *C. burnetii* cultivation and development of site-specific mutagenesis and other genetic technics, which is important for research of *C. burnetii* molecular pathogenesis.

Key words: *Coxiella burnetii*, Q-fever, molecular pathogenesis, virulence, transport system, secreted effectors.

Coxiella burnetii — облигатный внутриклеточный грамотрицательный бактериальный патоген, возбудитель Ку-лихорадки — природно-очагового заболевания, протекающего в острой или хронической форме. Летальность при хронической форме заболевания, представленной чаще всего в виде гепатита и эндокардита, составляет 65% [59]. Основным источником инфекции для человека являются сельскохозяйственные животные (преимущественно козы и овцы, реже — крупный рогатый скот), хотя хозяевами коксиелл в природе могут быть многие виды млекопитающих, птиц и членистоногих.

Коксиелла способна длительно выживать во внешней среде. Эта способность связана с особенностью перехода в различные стадии развития. Малая клеточная форма метаболически неактивна и устойчива к многочисленным факторам внешней среды, таким как температура, воздействие ультрафиолетового излучения, высушивание. Переход из малой в большую клеточную форму происходит после внедрения в клетку хозяина в процессе закисления содержащей патоген фагосомы: в это время патоген становится метаболически активным [38].

В организм человека возбудитель попадает чаще всего через дыхательные пути при вдыхании зараженных аэрозолей или пыли, затем

они попадают в кровь и связываются с фагоцитирующими клетками моноцитарно-макрофагального ряда. Будучи внутриклеточным патогеном, *C. burnetii* вовлечена в широкий спектр механизмов проникновения в клетки хозяина и выживания в них. Коксиелла обладает тропностью к профессиональным фагоцитам и проникает в такие клетки путем классического фагоцитоза, который основан на взаимодействии рецептора с лигандом. Внутри клетки хозяина *C. burnetii* способствует созреванию фаголизосомоподобного компартмента, известного как коксиелла-содержащая вакуоль, внутри которого происходит репликация бактерий [40].

Патотип-специфическая вирулентность *C. burnetii* — длительно существующая гипотеза, основанная на возможности ряда изолятов вызывать преимущественно острую или хроническую Ку-лихорадку у людей [88]. Филогенетический анализ показал, что изоляты, вызывающие острую и хроническую Ку-лихорадку, распределяются по разным геногруппам, включающим в состав генома различные плазмиды, что является подтверждением существования отдельных патотипов коксиелл [80].

До недавнего времени ЛПС были единственным охарактеризованным фактором вирулентности коксиелл. Идентификация и ха-

рактеристика новых факторов вирулентности стала возможной после появления бесклеточной среды для культивирования и улучшения инструментов для генетических манипуляций, что явилось важной вехой в исследовании молекулярного патогенеза *C. burnetii*. Об этих механизмах молекулярного патогенеза коксиеллы пойдет речь в настоящем обзоре.

Инфекционный цикл. Адгезия и инвазия

Как и у многих других облигатных внутриклеточных патогенов, инвазия *C. burnetii* в клетку хозяина является первым шагом инфекции. При аэрозольном пути передачи коксиелла поражает альвеолярные макрофаги и проникает в них посредством актин-зависимого фагоцитоза. Отсутствие транспортной системы III типа позволило предположить, что для адгезии и инвазии этот микроорганизм использует механизм «застежки-молнии». Идентификация транспортной (секреторной) системы IV типа указывала на возможное использование бактерией активного триггерного цикла, осуществляемого за счет секретируемых через транспортную систему эффекторных белков, чтобы индуцировать инвазию после адгезии на поверхности клетки хозяина [81]. Исследование мутантов по транспортной системе IV типа показало, что эти бактерии не являются дефектными по способности проникать в фагоцитирующие (моноциты и макрофаги) и не фагоцитирующие клетки. Следовательно, вероятнее всего проникновение в фагоциты происходит за счет пассивного актин-зависимого фагоцитоза, а в непрофессиональные фагоциты — путем активного механизма «застежки-молнии» [10, 19]. Вирулентные *C. burnetii* связываются с фагоцитирующими клетками, используя интегрин $\alpha V\beta 3$ в качестве основного рецептора, и входят в клетку путем RAC1-зависимого фагоцитоза, который требует ундуляции мембраны [18, 27]. Что интересно, интегрин $\alpha V\beta 3$ обычно вовлечен в устранение апоптотических клеток путем фагоцитоза и связан с ингибированием воспаления. Таким образом, способность коксиелл использовать этот интегрин для инвазии может служить одним из механизмов избегания индукции воспалительного ответа. Согласно этому предположению, *C. burnetii* характеризуется как скрытый патоген, который проникает в клетки без «оповещения» иммунной системы. Хотя идентичность бактериального лиганда для интегрин $\alpha V\beta 3$ не была установлена, в классе

возможных кандидатов могут быть связанные с мембраной белки, содержащие интегрин-связывающий домен «аргинин-глицин-аспартамовая кислота» (RGD-мотив). Интегрин $\alpha V\beta 3$ мало секретируется в находящихся в покое моноцитах, и, по-видимому, *C. burnetii* использует другие рецепторы для проникновения в эти клетки [25].

Хотя идентичность рецепторов в непрофессиональных фагоцитах в настоящее время неизвестна, механизм, посредством которого коксиелла проникает в клетки, видимо, тоже связан с перестройкой актиновых филаментов. Поскольку субъединица $\beta 3$ слабо экспрессируется в бронхиальном эпителии, непохоже, чтобы интегрин $\alpha V\beta 3$ был первичным рецептором при проникновении в непрофессиональные фагоциты. Гистопатологический анализ, проведенный на легких животных с моделью коксиеллезной пневмонии и у пациентов с атипичной пневмонией, вызванной *C. burnetii*, позволил идентифицировать моноциты и макрофаги в первичных сайтах инфекции, но в этих сайтах также были обнаружены эпителиальные и эндотелиальные клетки [78]. Кинетика коксиелл различных фазовых вариантов в клеточных культурах была представлена по-разному, причем авирулентные клетки фазы II интернализировались быстрее, чем полностью вирулентные бактерии в фазе I [6, 93]. *C. burnetii* фазы I и II реплицируются со сходной кинетикой в одинаковых по структуре, протеолитически активных коксиелла-содержащих вакуолях, что важно отметить, поскольку многие исследования внутриклеточного траффика проведены с использованием авирулентной фазы II. Обе фазы привлекают рецептор интегрин $\alpha V\beta 3$ в моноцитах, но крупная реорганизация актинового цитоскелета наблюдается только при инфицировании бактериями фазы I [18]. Изменения в цитоскелете в процессе инвазии являются обычным эффектом для некоторых других инвазивных патогенов, которые способствуют фагоцитозу посредством секреции эффекторов, активирующих хозяйские ГТФазы [31]. Хотя секреторная система IV типа не является обязательной для проникновения в клетку хозяина, не установлено, необходимы ли ее эффекторы для реорганизации актинового цитоскелета в ходе инфекции. Что интересно: ундуляция актинового цитоскелета индуцируется через SRC-тирозинкиназу вслед за связыванием коксиелл фазы I [62]. Эта ундуляция мембраны требует контакта между *C. burnetii* и хозяйской клеткой и может быть индуцирована очищенными липополисахаридами

(ЛПС) фазы I [62, 63]. Способность индуцировать ундуляцию также зависит от экспрессии TLR4 на поверхности клетки хозяина [37]. Эти наблюдения позволяют предположить, что ЛПС индуцируют изгибание мембраны, и эффекторы секреторной системы IV типа временно контролируют последующие сигнальные каскады после интернализации патогена, но экспериментально это не было доказано.

Хотя основные бактериальные факторы, которые опосредуют инвазию патогена в клетку остаются неизвестными, полагают, что их идентификация возможна при скрининге мутантных клеток коксииелл, у которых изменена интернализация. Так, мутанты по CBU_1260 способны проводить репликацию внутри клетки хозяина, но в меньшей степени по сравнению с изолятом дикого типа. Это один из трех белков со структурой, сходной с белком наружной мембраны OmpA (CBU_0307, CBU_0936 и CBU_1260). Полагают, что эти белки играют важную роль в адгезии и интернализации коксииеллы, в том числе клетками, не являющимися профессиональными фагоцитами [57]. На данный момент это первый инвазин коксииеллы. Также известно, что OmpA-белки участвуют в адгезии и интернализации других бактериальных патогенов [8, 22].

От фагосомы к коксииелла-содержащим вакуолям

Фагоцитоз приводит к формированию фагосомы, которая созревает в фаголизосому посредством серии поочередных и регулируемых событий слияния и разделения компартментов. Вскоре после интернализации патогена на поверхности клетки наивная фагосома развивается в раннюю фагосому и приобретает ГТФазу RAB5. Эта ГТФаза стимулирует слияние с ранними эндосомами, приводя к закислению примерно до pH 5,4 и приобретению раннего эндосомального маркера EEА1. Одним из самых поразительных свойств фагосомы является то, что размер ее остается постоянным, что свидетельствует о непрерывном удалении компонентов мембраны после процесса слияния. В поздней фагосоме отсутствует RAB5, но присутствует ГТФаза RAB7, лизосома-ассоциированные мембранные гликопротеины LAMP1 и LAMP2 и вакуолярная АТФаза, которая вводит протоны в созревающую фагосому, уменьшая pH до 5. В итоге фагосома сливается с лизосомальным компартментом и приобретает на своей поверхности катепсины и гидролазы, а вакуолярная АТФаза уменьшает pH

до 4,5 [30, 44]. Сайленсинг хозяйских генов, кодирующих регуляторы мембранного транспорта RAB5 и RAB7, мешает транслокации эффекторных протеинов патогена. Этот факт указывает на то, что эффекторы не транслоцируются до тех пор, пока бактерия не окажется в позднем эндоситозном компартменте клетки хозяина [69]. Также на ранних стадиях инфекции паразитофорная вакуоль декорируется хозяйским маркером RAB1, малой ГТФазой, вовлеченной в антероградный транспорт, который функционирует на поверхности аппарата Гольджи [17].

В ответ на закисление паразитофорной вакуоли *C. burnetii* становится метаболически активной, что приводит к синтезу бактериальных протеинов, необходимых для созревания вакуоли. Биогенез паразитофорной вакуоли включает слияние вакуоли с пузырьками, имеющими эндоситозное, аутофагическое и связанное с секреторными путями происхождение, через процессы, контролируемые множественными факторами клетки хозяина, включая RAB-ГТФазы и растворимые SNARE-белки [48, 60].

Созревание коксииелла-содержащих вакуолей в основном следует по каноническому эндосомальному пути, но есть многочисленные различия, которые основаны на бактериальных протеинах. После интернализации бактерии коксииелла-содержащая вакуоль по размерам сходна с нарождающейся фагосомой и последовательно приобретает RAB5 и RAB7, что показывает, что она проходит через типичный эндосомальный каскад, описанный ранее. Тем не менее, созревание паразитофорной вакуоли включает увеличение этого компартмента в размерах, когда он почти полностью занимает хозяйскую цитоплазму, что значительно отличается от не изменяющейся в размерах созревающей фаголизосомы. Совместное функциональное ингибирование RAB5 и RAB7 через доминантный негативный мутагенез нарушает экспансию коксииелла-содержащей вакуоли, в то время как ингибирование только RAB5 (но не только RAB7) блокирует интернализацию коксииелл [77]. Более того, формирование крупной коксииелла-содержащей (паразитофорной) вакуоли зависит от активного синтеза коксииеллой протеинов, возможно, из-за требований к синтезу и последующей секреции эффекторов между мембраной паразитофорной вакуоли и цитоплазмой клетки хозяина. Однако в отсутствие синтеза протеинов малая коксииелла-содержащая вакуоль продолжает приобретать маркеры LAMP и закисляться. Это позволяет предположить,

что приобретение LAMP и закисление являются пассивными процессами, сходными с нормальным процессом созревания фагосомы.

Большинство внутриклеточных патогенов нарушают эндосомальный каскад и блокируют созревания фагосомы на ранней стадии, избегая слияния с лизосомами. Но в случае *C. burnetii*, лизосомальные энзимы, включая катепсин D и кислую лизосомальную фосфатазу, аккумулируются в коксIELла-содержащей вакуоли, хотя и с задержкой на 2 ч после инфекции (по сравнению с 15 мин после их интернализации для фагосомы, содержащей инертные частицы). Полагают, что эта задержка вызвана взаимодействием коксIELла-содержащей вакуоли с компонентами пути аутофагии [77]. По-видимому, секреторная система IV типа коксIELлы в данный процесс не вовлечена, поскольку транслокации эффекторов не происходит по крайней мере в течение 8 ч после инфекции. Это позволяет предположить, что бактериальные протеины, которые взаимодействуют с путем аутофагии, еще предстоит определить [19]. Однако существует точка зрения, что транслокация секреторных субстратов происходит только после закисления коксIELла-содержащей вакуоли [69]. Аутофагия осложняется хозяйским влиянием через врожденный и приобретенный иммунитет к внутриклеточным патогенам, и, уже спустя 5 мин после интернализации, коксIELла-содержащая вакуоль декорируется маркером аутофагии — микротрубочко-ассоциированным протеином легкой цепи 3 (LC3) [77]. Роль аутофагии в патогенезе *C. burnetii* остается неясной: недавние исследования не показали, что аутофагия является важной для роста коксIELл. Одним из потенциальных преимуществ аутофагического взаимодействия может быть то, что аутофагические полости часто заполнены питательными веществами и мембранами из их деградировавших грузов, и эти компоненты могут служить «топливом» для конверсии из малой клеточной формы в большую [34, 77]. Установлено, что связанные с аутофагическим путем белки LC3 и p62 локализуются в фаголизосомах, содержащих коксIELлы дикого типа, но не мутанты по генам секреторной системы IV типа [107]. Известен белок Sig2, который нарушает аутофагические пути, необходим для обеспечения слияния коксIELла-содержащей вакуоли с аутофагосомами в течение инфекции и связан с процессами, которые поддерживают фузогенные свойства этой специфической органеллы; мутанты по гену, кодирующему данный белок, представлены мультивакуолярным фенотипом [68].

Конверсия в большую клеточную форму происходит одновременно с блокадой эндосомального созревания коксIELла-содержащей вакуоли; процент большой клеточной формы (как пропорция общего числа большой и малой клеточной форм) спустя 1 ч после инфекции составляет 80%, а спустя 16 ч коксIELла-содержащая вакуоль содержит только большую клеточную форму [21, 38]. Значительное число эффекторов секреторной системы IV типа необходимо для биогенеза коксIELла-содержащей вакуоли. Так, было показано, что локализованный в ней эффекторный протеин CvpA обеспечивает внутриклеточный рост коксIELлы и экспансию паразитофорной вакуоли [48]. CvpA участвует в биогенезе коксIELла-содержащей вакуоли за счет механизма, включающего клатрин-опосредованный везикулярный трафик [40]. Секреторные белки CvpB, CvpC, CvpD и CvpE метят везикулярные компоненты на начальных стадиях созревания паразитофорной вакуоли [48]. Эти белки при эктопической экспрессии эукариотическими клетками маркируют компоненты поздней эндосомальной системы, а CvpC также метит рециклизирующиеся эндосомы. CvpA содержит множественные дилейциновые и тирозиновые мотивы, связанные с эндоцитозным сортированием, подобные тем, что распознаются адаптерными клатриновыми белками (AP1-AP3 и тяжелой цепью клатрина). Репликация бактерий, мутантных по этим генам, значительно нарушена; также у них нарушено формирование крупной паразитофорной вакуоли [48].

Между 8 ч и двумя днями после инфекции коксIELла-содержащая вакуоль значительно увеличивается в размере и может занимать практически весь объем хозяйской клетки [76]. Крупная коксIELла-содержащая вакуоль формируется как результат гомотипического слияния многочисленных малых вакуолей, и это может продолжаться как гетеротипическое слияние с аутофагическими, эндоцитозными и лизосомальными пузырьками [40]. Поддержание крупной коксIELла-содержащей вакуоли не только требует продукции протеинов бактерией, но также зависит от актинового цитоскелета; так, обработка инфицированных клеток актин-деполимеризующими агентами приводит к формированию только маленьких вакуолей [1]. Кроме того, инфицирование *C. burnetii* активирует ряд хозяйских белков из семейства киназ — протеинкиназу C, протеинкиназу A и киназу легкой цепи миозина, которые требуются для формирования и поддержания крупной коксIELла-содержащей вакуоли [43]. Более того, на этой стадии инфек-

ционного процесса вакуоль взаимодействует с ранними секреторными путями (что подтверждается аккумуляцией RAB18 на ее мембране), которые необходимы для формирования крупной коксIELла-содержащей вакуоли [17]. Взаимодействие с эндоплазматическим ретикуломом через ранние секреторные пути может обеспечивать источник липидов для формирования крупной вакуоли. Эти взаимодействия, по-видимому, организованы эффекторами *C. burnetii*, поскольку продукция бактериальных протеинов требуется для формирования крупной коксIELла-содержащей вакуоли; однако идентичность и специфические функции этих возможных эффекторов только еще предстоит установить [17]. Интересно, что мембрана коксIELла-содержащей вакуоли содержит сравнимые с плазматической мембраной количества холестерина, что в два раза больше, чем в нормальном лизосомальном компартменте [39]. Более того, гены хозяина, вовлеченные в синтез холестерина, усиленно экспрессируются на фоне инфекции *C. burnetii*, и ингибирование метаболизма холестерина негативно влияет на формирование вакуоли. Это позволяет предположить, что коксIELла напрямую влияет на метаболизм холестерина, вероятно, через взаимодействие с эндоплазматическим ретикуломом [29, 39, 41]. Хотя эти события достаточно хорошо охарактеризованы, факторы вирулентности *C. burnetii*, которые напрямую влияют на формирование коксIELла-содержащей вакуоли, еще предстоит идентифицировать.

Зрелая коксIELла-содержащая вакуоль

Примерно через 6 ч после инфекции коксIELла-содержащая вакуоль заполнена большими клеточными формами бактерии, которые начинают дифференцироваться обратно в малую клеточную форму [21]. Зрелая вакуоль обладает в основном теми же характеристиками, что и зарождающаяся: рН остается низким (рН в значениях примерно 4,5–5, такая же рН у фаголизосом неинфицированных клеток) и вакуоль содержит те же маркеры, а также обладает фузогенными свойствами, которые влияют на синтез протеинов *C. burnetii* [40]. Что удивительно: жизнеспособность хозяйской клетки не зависит от значительного увеличения вакуоли, которая занимает большую часть цитоплазмы и объем которой значительно больше необходимого для *C. burnetii* [101]. Кроме того, время генерации и геномная стабильность хозяйской клетки остаются без изменений [5]. КоксIELла продлевает жизнеспособность хо-

зяйской клетки двумя способами: она активно ингибирует апоптотический сигнальный каскад и индуцирует способствующие выживанию факторы. Например, *C. burnetii* блокирует апоптоз, индуцированный обработкой культуры клеток млекопитающих проапоптотическим веществом стауроспорином, и этот ингибирующий эффект зависит от продукции бактерией протеинов [101]. Антиапоптотическое действие может быть результатом взаимодействия между беклином 1 (BECN1) и регулятором апоптоза BCL2. Беклин 1 является белком инициации аутофагии, который взаимодействует с антиапоптотическим протеином BCL2, причем оба находятся в коксIELла-содержащей вакуоли. Взаимодействие с беклином 1 останавливает высвобождение цитохрома с из митохондрий и, таким образом, ведет к ингибированию апоптоза, что является феноменом, ассоциированным с инфекцией *C. burnetii* и функциями BCL2 [51, 94]. Второй тип антиапоптотической деятельности, инициализируемой после инфицирования *C. burnetii*, — это поддерживаемая активация необходимых для выживания клетки сигнальных протеинов киназного каскада ERK1 (также известного как MAPK3), ERK2 (также известного как MAPK1) и семейства АКТ [103]. Было обнаружено три секретиремых коксIELлой эффектора — CBU_0388, CBU_1676 и CBU_0885, которые модулируют MAP-киназные пути в клетке хозяина, однако точная их функция остается неизвестной [50].

Выживание инфицированных клеток является важным для поддержания хронической коксIELлезной инфекции. Это позволяет предположить, что в течение цитокинеза хозяйской клетки крупная коксIELла-содержащая вакуоль сегрегируется только у одной дочерней клетки, другая же остается не инфицированной [75]. Способность предупреждать развитие апоптоза и стимулировать необходимые для выживания пути может быть полезным и для персистирующей инфекции, так как эта активность поддерживает хозяйскую клетку в таком состоянии, чтобы могла продолжаться репликация бактерии. В течение острой инфекции инфицирующая доза может быть очень низкой (1–10 бактериальных клеток). Это позволяет предположить, что существуют другие механизмы для поддержания распространения реплицирующихся бактерий для поражения других чувствительных клеток [90]. Последние исследования показали, что коксIELла также способна индуцировать апоптоз через высвобождение цитохрома с посредством механизма, который зависит от синте-

за бактериальных протеинов [112]. Более того, предупреждение апоптоза, по-видимому, используется коксиеллой, чтобы вызвать персистирующую инфекцию, в то время как индукция апоптоза — чтобы осуществить распространение инфекции на близлежащие чувствительные клетки. Эта стратегия также применяется другими патогенами: например, *M. tuberculosis* ингибирует апоптоз на ранних стадиях инфекции, но индуцирует клеточную гибель на поздних стадиях инфекции.

Секреторная система IV типа (Dot/Icm секреторная система)

Секвенирование генома *C. burnetii* выявило присутствие генов трех секреторных систем: секреторной системы I типа, родственному секреторной системе II типа комплекса биогенеза пилей и родственной конъюгационному комплексу секреторной системы IV типа [9, 72, 82]. В настоящее время мало известно о роли секреторных систем I и II типа в патогенезе коксиеллезной инфекции. Биоинформационный анализ генома коксиеллы выявил канонические компоненты секреторной системы I типа, доставляющей протеины напрямую из бактериальной цитоплазмы в окружение микроорганизма, в присутствии гомолога *tolC* (CBU_0056) [9]. Типичные составляющие секреторной системы II типа у коксиеллы отсутствуют, но организм кодирует некоторые гены, вовлеченные в сборку пилей IV типа, являющихся частью этой системы [72]. Доступность *Legionella pneumophila* в качестве суррогатного хозяина для экспрессии возможных эффекторов секреторной системы IV типа, обеспечило значительные успехи в исследовании этой секреторной системы.

Транспортная система IV типа коксиеллы гомологична связанной с вирулентностью транспортной (секреторной) системой IV типа *L. pneumophila*, кодирующей дефектные в трафике органелл (*dot*) и связанные с внутриклеточной репликацией (*icm*) гены, поэтому она также носит название Dot/Icm-системы. Секреторная система IV типа транслоцирует эффекторные субстраты из бактериального цитозоля напрямую в цитозоль эукариотной клетки хозяина и является тесно вовлеченной в патогенез многих бактерий [10, 19]. Многокомпонентный белковый комплекс может быть подразделен на многие субструктуры, включая пили, коровый транспортный комплекс и связывающий протеиновый комплекс IV типа [111]. Секреторная систе-

ма IV типа представлена двумя подтипами (A и B) на основе гомологии с *Agrobacterium tumefaciens* и *L. pneumophila* соответственно [2]. Секреторная система типа IVB, также известная как Dot/Icm-система, имеет сходство с конъюгационным комплексом, кодируемым плазмидами IncI. Исследования *L. pneumophila* выявили некоторые коровые комплексы, которые определяют топологию Dot/Icm-аппарата, такого, как подкомплекс, состоящий из DotC, DotD, DotF (также известный как IcmG), DotG (также известный как IcmE) и DotH (также известный как IcmK), которые соединяют внутреннюю и внешнюю бактериальную мембраны и функционально являются коровым транспортным комплексом [98]. Второй подкомплекс включает в себя связывающий протеин DotL (также известный как IcmO; захватывает IcmSW-зависимые субстраты в секреторный аппарат) и DotM (также известный как IcmP), IcmS и IcmW [99]. Штамм *C. burnetii* Nine Mile I кодирует гомологи 24 из 27 протеинов Dot/Icm-системы, найденных у *L. pneumophila*, и эта высокая степень сходства между двумя системами позволяет предположить, что они структурно похожи [81]. В геноме коксиеллы отсутствуют гены *dotV* (также известный как *icmC*), *icmR* и *dotJ* (также известный как *icmM*), но имеется дупликация гена *dotI* (также известного как *icmL*, что приводит к появлению генов *icmL1* и *icmL2*). Сходство *dotJ* и *dotI* позволяет предположить, что эта дупликация *dotI* может заменить отсутствие *dotJ*, функционального гомолога *icmR* [67]. Существует консервативность между двумя этими секреторными системами IV типа: *dotB*, *icmS*, *icmT* и *icmW* *C. burnetii* могут быть комплементарными для внутриклеточного роста дефектных по этим генам штаммов *L. pneumophila*, у которых эти гены мутировали [108]. Это было первое доказательство того, что коксиелла кодирует функциональную Dot/Icm-систему, и оно привело к использованию *L. pneumophila* в качестве суррогатного хозяина с целью идентификации и характеристики эффекторных протеинов коксиеллы [20]. Транскрипционный анализ с использованием этой системы продемонстрировал, что некоторые гены *dot/icm* у коксиеллы активно транскрибируются на ранних стадиях после инфекции [66], и, подобно *L. pneumophila*, Dot/Icm-система локализуется в районе клеточных полюсов *C. burnetii* в ходе инфекции [65]. Используя транспозонных и сайт-специфичных мутантов, исследователи подтвердили зависимость *C. burnetii* от Dot/Icm-системы в процессе выживания внутри клетки хозяина [10, 19].

Штаммы коксииелл, содержащие транспозон *Himar1* в последовательностях генов *icmL* или *icmD* или делеции генов *dotA* или *dotB*, не способны секретировать эффекторы и приобретают различные дефекты при внутриклеточном росте [10, 12, 19].

Использование транспозонного мутагенеза позволило выявить, что ключевыми для репликации *C. burnetii* в клетках хозяина являются гены *icmD*, *dotA* и *icmL1* [19]. У этих мутантов, а также у мутантов по гену *dotB*, была сохранена способность проникать в клетку хозяина, но нарушена способность формировать крупную паразитофорную вакуоль и реплицироваться внутри нее [12]. Значительный интерес также представляет ген *icmS*: его продукт — шаперонин, который опосредует секрецию целого подкласса бактериальных эффекторов [113]. Мутанты по этому гену представлены мультивакуолярным фенотипом, что позволяет предположить, что *IcmS* вовлечен в секрецию эффекторов, опосредующих события слияния мембран, необходимых для биогенеза коксииелла-содержащей вакуоли; субстраты *IcmS* пока остаются не известными [57].

Идентификация и характеристика субстратов Dot/Icm-системы

Изначально эффекторы *C. burnetii* исследовались с использованием легионеллы как суррогатного хозяина [71, 102]. Проведенные недавно генетические и биоинформатические скрининги идентифицировали 60 субстратов Dot/Icm-системы у коксииеллы, и еще более 60 предполагаемых субстратов недавно было добавлено в этот список [49, 55, 105, 106]. Функции большинства из этих почти 130 субстратов Dot/Icm-системы остаются неустановленными. Большая часть кодирующих генов (23 из 60 генов охарактеризованных субстратов) имеют GC-состав, значительно отличающийся от среднего GC-состава генома коксииеллы [20]. Облигатная внутриклеточная природа коксииеллы и присутствие похожих на эукариотические доменов (суперспиральные домены и лейцин-богатые повторы, служащие для распознавания лигандов, а также трансмембранные домены, связанные с прикреплением к мембране) во многих субстратах позволяют предположить, что гены, кодирующие эти субстраты, были приобретены путем междоменного горизонтального переноса генов от эукариотного источника [23]. Более того, как и у легионеллы, многие субстраты секреторной системы IV типа коксииеллы со-

держат карбокситерминальный мотив или распознаются последовательностями, необходимыми для транслокации [20, 102, 105].

Вслед за транслокацией в клетку хозяина, многие эффекторный протеины метят специфические клеточные компартменты или декорируют мембрану паразитофорной вакуоли, где они взаимодействуют с хозяйскими протеинами [20, 52, 105]. Мутанты по части транслоцируемых эффекторов проявляют сниженную способность при репликации внутри клетки хозяина [106].

Бактериальные патогены используют секреторную систему IV типа в процессе реализации вирулентности, чтобы контролировать активность различных эффекторных протеинов с целью обеспечения правильной прогрессии инфекции. Например, у *L. pneumophila* эффекторный протеин LubX действует как лигаза убиквитина E3, который метит эффектор SidH для деградации в течение нескольких часов после инфекции, представляя механизм временного контроля [46]. Эффекторные функции у коксииеллы, по-видимому, контролируются сходными временными механизмами, включая транскрипционный контроль, эффективность транслокации и стабильность протеинов в клетке хозяина. Эта гипотеза подтверждается недавними наблюдениями, что эффекторы Dot/Icm-системы у коксииеллы не транслоцируются в течение 8 ч после инфекции и также требуют закисления коксииелла-содержащих вакуолей для транслокации [19, 69]. Хотя эти экспрессионные паттерны связаны со способностью dot/icm-мутантов к пассивному трафику через эндоцитозный путь, это не объясняет того, как *C. burnetii* способна влиять на процесс аутофагии сразу после попадания в клетку хозяина [10, 19]. Таким образом, возможно, что независимые от секреторной системы IV типа эффекторы, воздействуя на процессы аутофагии, задерживают слияние коксииелла-содержащей вакуоли с лизосомой.

Обнаружен специфический фактор вирулентности, представленный белком Mir (усилитель инфекционности для макрофагов). Это секреторируемый иммунофилин, вовлеченный в выживание патогена внутри клетки хозяина. Mir принадлежит к семейству пептидилпролил-цис-транс-изомераз и участвует в реализации вирулентности у ряда других микроорганизмов [64, 92]. Кроме того, обнаружено еще три белка, поддерживающих инфекционный потенциал коксииелл (CBU_0085, CBU_0318 и CBU_1138) [86].

В геноме коксииеллы обнаружены гены, кодирующие четыре двукомпонентные системы:

PhoB-PhoR, GacA-GacS, PmrA-PmrB и RstB-подобную систему [12]. Мутации в ряде этих систем приводят к формированию клеточных фенотипов патогена, у которых нарушена репликация внутри клетки хозяина, как, например, в случае встраивания транспозона в CBU_2006, часть RstB-подобной системы [57].

Другой механизм контроля реализуется на транскрипционном уровне двухкомпонентной регуляторной системой PmrAB, которая, как было показано, напрямую регулирует систему секреции Dot/Icm у *L. pneumophila* и *C. burnetii* [113]. У других патогенных бактерий, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, система PmrAB регулирует гены вирулентности в ответ на низкие уровни магния, высокие уровни железа и низкий pH [61]. Биоинформационный анализ выявил, что гены, кодирующие пять структурных протеинов Dot/Icm (*dotP* (также известный как *icmD*), *icmQ*, *icmV*, *icmW* и *dotD*) содержат PmrA-связывающие последовательности, расположенные правее –10 региона их промоторов. Более того, 20 возможных PmrA-регулируемых генов коксииеллы, как было показано, являются субстратами Dot/Icm-системы, которая может представлять глобальный регулятор вирулентности *C. burnetii* [20, 71, 113]. Биоинформационный анализ также предполагает, что существуют другие неизвестные механизмы для регуляции не регулируемых PmrA эффекторов, поскольку многие вновь идентифицированные эффекторы не содержат PmrA-связывающих последовательностей, но продолжают секретироваться. Наличие реагирующих на PmrA генов без специфичных к нему регуляторных элементов позволяет высказать предположение, что двухкомпонентная система PmrAB контролирует экспрессию регуляторных систем, ассоциированных с продукцией коксииеллой дополнительных белков, вовлеченных в паразитизм [11]. Обнаружена сниженная способность к репликации у транспозонных мутантов коксииеллы по генам, кодирующим CBU_1761 (возможная сенсорная гистидинкиназа с неизвестным родством к регуляторам) и VacB (экзорибонуклеаза РНаза R). По-видимому, VacB опосредует регуляторный контроль за счет способности процессировать мРНК. Это позволяет предположить, что, в дополнение к PmrAB, необходимы транскрибирующиеся гены для работы регулона Dot/Icm-системы [68].

Хотя *L. pneumophila* и *C. burnetii* филогенетически родственны, всего десять из идентифицированных субстратов Dot/Icm коксииеллы имеют значительное сходство с почти 300 субстратами секреторной системы IV типа

легионеллы. Это неудивительно, принимая во внимание то, что легионелла и коксииелла реплицируются в разных вакуолярных компартментах при совместной и при отдельной инфекции [49]. Возможно Dot/Icm-эффекторы легионеллы и коксииеллы выполняют специфические функции, создавая отдельное, окружение для каждой бактерии, обеспечивающее возможность репликации.

Пластичность и избыточность субстратов Dot/Icm у различных патотипов *C. burnetii*

Эффекторы Dot/Icm проявляют поразительную гетерогенность у полностью отсекаемых изолятов *C. burnetii*, принадлежащих к различным патотипам [19]. Всего 19 из идентифицированных в настоящее время эффекторов являются полностью консервативными у «острых» и «хронических» изолятов. Тот факт, что эти эффекторы поддерживаются у всех изолятов коксииелл, позволяет предположить, что они играют важную роль для выживания внутри клетки хозяина. Пластичность остальных эффекторов может быть опосредована частично экстенсивной рекомбинацией между имеющимися в избытке инсерционными последовательностями, обнаруженными в геноме *C. burnetii* [9]. У изолятов, вызывающих хроническое или бессимптомное заболевание, большинство гомологов эффекторов штамма *C. burnetii* Nine Mile I представлены либо в усеченном виде, либо в виде псевдогенов. Это позволяет предположить, что усеченные гомологи нефункциональны. Гипотеза поддерживается наблюдением, что эктопическая экспрессия CBU_1532 (присутствующего у штамма Nine Mile I) приводит к округлению клетки хозяина, в то время как альтернативный старт гомолога CBU_D0454 (у штамма Dugway) не приводит к образованию данного фенотипа [19]. Предполагается, что некоторые группоспецифичные эффекторы Dot/Icm принимают участие в патотип-специфичной вирулентности, что также является гипотезой, которая в настоящее время проверяется методами сайт-специфичного мутагенеза [12, 70].

Разные изоляты *C. burnetii* связаны с некоторыми уникальными характеристиками вызываемого ими заболевания, характеризующимися определенными патологическими свойствами. Например, штамм Dugway, выделенный от грызунов, авирулентен по сравнению с референсным штаммом Nine Mile I,

выделенным из клешей, а штаммы Graves и Kearns проявляют инфекционные свойства, выражающиеся в меньшей степени воспаления и диссеминации [79]. Сравнение этих изолятов выявило множество эффекторов, которые интактны у одних изолятов, но нарушены у других. Это может быть связано с тем, что различные эффекторы могут быть причиной разных вариантов ответа клетки хозяина и, следовательно, разных характеристик заболевания [9, 104]. Исследование вышеназванных четырех изолятов показало, что среди всех эффекторных белков лишь 12 полностью консервативны, среди остальных же зачастую у некоторых штаммов обнаруживаются вставки, ведущие к образованию псевдогенов [106]. Исследование региона *cirA-cirE* показало, что лишь четыре из пяти субстратов полностью консервативны (*cirA-cirD*), но значительная гетерогенность представлена в последовательности *cirE*. У ряда изолятов наблюдаются сдвиги рамки считывания, что может быть важно для решения вопроса о том, секретируется ли данный субстрат у этих изолятов [20].

Большое семейство белков, содержащих анкириновые повторы (Ank-белки) — одно из первых обнаруженных у коксиеллы эффекторов транспортной системы IV типа, показавших значительное разнообразие у изолятов, относящихся к разным патотипам. Например, у штамма Nine Mile I обнаружено всего четыре интактных Ank-белка, а у штамма Dugway — 11. Эти исследования свидетельствуют о наличии изолят-специфических эффекторов в дополнение к эффекторам, консервативным у всех изолятов [104]. Был также идентифицирован патотип-специфичный субстрат, связывающийся с тиоредоксином, — *ElpA*, который содержит специфический для эндоплазматического ретикулума (ЭР) мотив, транспортируется в хозяйский ЭР и нарушает секреторный транспорт. Этот белок был обнаружен у всех изолятов *S. burnetii*, кроме штамма Nine Mile I, вызывающего острую Ку-лихорадку, что позволяет предположить, что данный штамм адаптирован выживать в отсутствие этого эффектора, возможно, за счет использования протеинов со сходными функциями [33]. Nine Mile I кодирует два других субстрата Dot/Icm-системы, *CBU_0372* и *CBU_1576*, локализующихся в ЭР, однако эти эффекторы не нарушают секреторный транспорт [106]. Только Nine Mile I и Dugway содержат эти белки, в то время как остальные изоляты — *ElpA*. Таким образом, Dugway кодирует все три белка, и это позволяет предположить, что данный патотип может кодировать множество субстратов

Dot/Icm-системы со сходными функциями. Хотя белки *CBU_0019*, *CBU_0635*, *CBU_1556* и *CBU_1825* не транспортируются в ЭР, эти эффекторы негативно влияют на секреторный транспорт клетки хозяина. Наличие нескольких эффекторов, связывающихся с ЭР или нарушающих секреторный транспорт, свидетельствует о важности взаимодействия с данной органеллой в процессе инфекции [33].

При анализе кодируемых плазмидными генами эффекторов Dot/Icm-системы, были обнаружены белки *CpeG-CpeL* [58, 105]. Из них четыре (*CpeI-CpeL*) кодируются плазмидой *QpDG*, которая обнаруживается у аттенуированных изолятов *S. burnetii*, например, штамма Dugway; у изолятов с плазмидой *QpH1* гены, кодирующие эти белки, отсутствуют [58]. *CpeL* локализуется вокруг коксиелла-содержащей вакуоли вместе с убиквитиновыми белками таким же образом, что и специфичный для плазмиды *QpH1* белок *CpeC* [105]. Это позволяет предположить, что штамм Dugway кодирует белок, который может регулировать модификацию хозяйских и бактериальных белков посредством убиквитинирования. По-видимому, существуют специфические эффекторы, которые могут влиять на патогенный потенциал возбудителя; у штаммов, не имеющих данных эффекторов, вирулентность значительно повышена.

Стоит отметить, что не только разные эффекторы секреторной системы IV типа представлены у штаммов коксиеллы различного патотипа. Есть определенные различия в секретируемых с помощью Sec-системы субстратах. Так, гены, кодирующие *CBU_0400* и *CBU_0562a*, отсутствуют у штаммов Q154 и Q212, а у четырех генов обнаружены укорочения: *CBU_0110* и *CBU_1822* у Q212, *CBU_1429a* у Q212 и Q154 и *CBU_1822* (*SodH*) у штамма Dugway [87]. Белки, транспортируемые с помощью Sec-системы, являются важными для модификации хозяйской клетки и репликации патогена.

По сравнению с другими секреторными системами, Dot/Icm-система *L. pneumophila* имеет значительно большее число субстратов. Dot/Icm-система способна транслоцировать почти 10% протеома *L. pneumophila* (что соотносится с приблизительно 300 из 2943 открытых рамок считывания) [49]. Почему у данного патогена так много эффекторов? Результаты недавних исследований позволяют предположить, что по крайней мере 30% Dot/Icm-эффекторов *L. pneumophila* не вовлечены в прохождение инфекции в клетках млекопитающих, но требуются для адаптации к широкому спектру

хозяев [42]. По-видимому, значительная часть протеома *C. burnetii* — на данный момент 5,8% — служит субстратами секреторной системы IV типа [19, 20, 49, 71, 105]. *C. burnetii* способна колонизировать широкий спектр млекопитающих и членистоногих хозяев, и пул субстратов секреторной системы IV типа может обеспечивать инфицирование различных животных. Кроме того, *L. pneumophila* кодирует некоторые множественные эффекторы, имеющие своей целью те же механизмы клетки хозяина, которые способствуют выживанию внутриклеточных бактерий [47]. Это позволяет предположить, что коксии используют сходную стратегию, поскольку были идентифицированы три эффектора, ингибирующие апоптоз (AnkG, SaeA, SaeB) [45, 52]. Установлено, что SaeB влияет на процесс апоптоза за счет индукции экспрессии белка Bax, а не каспазы-3 [14]. Также был обнаружен субстрат секреторной системы IV типа CBU_A0020, колокализующийся после трансляции с митохондриальным маркером CoxIV; возможно, этот протеин также связан с ингибированием апоптоза [106].

Различные цитозольные функции эффекторов Dot/Icm-системы

Большинство идентифицированных субстратов Dot/Icm аннотировано как гипотетические протеины со специфическими сигнальными последовательностями на С-конце [49]. Однако многие кодируют один или более доменов, подобных эукариотическим, вовлеченных в белок-белковые взаимодействия, что говорит о функциональности белков. Эти домены включают анкириновые и тетрапептидные повторы и суперспиральные домены [20, 102]. Другие субстраты имеют подобные эукариотическим домены, которые вовлечены в посттрансляционные модификации, такие как серин-треонин киназы, домены с F-боксом и Fic-домены [20, 105]. Эукариотические белки, несущие эти мотивы, вовлечены в широкий спектр процессов у хозяина, включая апоптоз, убиквитилирование, метаболизм липидов и трафик мембран, что позволяет предположить вовлеченность эффекторов коксии в модуляцию многих из этих клеточных процессов [7, 16, 24, 32, 84]. Например, эффекторы секреторной системы IV типа AnkG, SaeA и SaeB ингибируют апоптоз [45, 52]. Модуляция апоптоза AnkG зависит от способности AnkG связывать хозяйский митохондриальный матричный протеин p32 (также известный как C1QBP). Механизм действия p32 в течение

апоптоза еще не установлен, но полагают, что протеин регулирует открытие митохондриальной поры переходной проницаемости [52]. Установлено, что в процессе ингибирования апоптоза AnkG движется к ядру клетки хозяина, что связано с его способностью связывать хозяйский белок p32. Это происходит только в условиях апоптоза и клеточного стресса и, по-видимому, задействует специфический стрессовый сенсор клетки хозяина [28]. SaeB локализован на митохондриях и ингибирует пермеабиллизацию митохондриальной мембраны, стабилизируя потенциал мембраны, и таким образом предупреждая высвобождение проапоптотических протеинов [45]. Эти два эффектора имеют своей целью одни и те же клеточные пути, хотя и через различные механизмы. Хотя SaeA локализован в ядре, точный механизм ингибирования апоптоза этим белком еще не установлен [45].

Баланс про- и антиапоптотических митохондриальных белков является критичным для апоптоза. Упомянутый выше белок BCL2 обеспечивает выживание клетки за счет ингибирования проапоптотических белков. Есть также группа белков, известных как проапоптотические BH3-протеины, включающие Bad, Bid и Bim, которые формируют димеры с BCL2 и ингибируют антиапоптотический эффект [95]. Было установлено, что фосфорилирование белка Bad значительно увеличивается в процессе инфицирования *C. burnetii* [53]. Возможно, что патоген регулирует активность Bad для поддержания выживания клетки хозяина. Эукариотические cAMP-зависимые протеинкиназы необходимы для опосредованного коксией выживания клетки хозяина; патоген также захватывает белок Bad в паразитарную вакуоль, где этот белок фосфорилируется и инактивируется [54].

Как обсуждалось выше, для *C. burnetii* ингибирование апоптоза необходимо для поддержания жизнедеятельности клетки хозяина, несмотря на то, что коксия-содержащая вакуоль занимает практически весь ее объем. Респираторные патогены, такие как *M. tuberculosis* и *L. pneumophila*, противостоят проапоптотической активности пораженных макрофагов, манипулируя путями их выживания для успешной репликации. В отличие от них, коксия длительное время способна реплицироваться в одной и той же клетке, причем период удвоения составляет около 12 ч [21]. Такой жизненный цикл требует длительной жизнеспособности клетки хозяина, и *C. burnetii* обеспечивает ее зависимым от секреторной системы IV типа спо-

собом. Таким образом, коксипелла вовлекает механизмы для предотвращения ответа альвеолярных макрофагов на инфекцию, позволяя наращивать бактериальную популяцию до гематогенного распространения по другим сайтам инфекции.

Функциональные исследования служат стартовой точкой для характеристики многих эффекторных функций *C. burnetii*, и эктопическая экспрессия эффекторных протеинов в эукариотических клетках показала, что многие эффекторы имеют своей целью строго определенные органеллы хозяина [102, 105]. Например, по крайней мере три эффектора (CaeA, CBU1314 и CBU1976) ассоциированы с ядром клетки хозяина [20], и, вероятно, зависят от наличия мотивов ядерной локализации. Поскольку было показано, что инфицирование коксипеллами влияет на транскрипцию генов хозяина [74], имеются основания предположить, что эти возможные ядерные эффекторы вовлечены в процесс инфекции. Помимо этого, некоторые эффекторы, являющиеся везикулярными мембранными белками, имеют целью своей локализации коксипелла-содержащую вакуоль и аутофагосому [102]. В настоящее время исследователи идентифицировали семейство связанных с коксипелла-содержащей вакуолью протеинов, некоторые из которых являются необходимыми для внутриклеточной репликации. Эти эффекторы могут служить для стабилизации коксипелла-содержащей вакуоли или как точки докинга для сигнальных молекул, и, таким образом, они могут обеспечивать фузогенную активность коксипелла-содержащей вакуоли. Поскольку коксипелла влияет на фузогенные свойства коксипелла-содержащей вакуоли, идентификация эффекторов, которые нарушают секреторные пути эукариотической клетки, является очень важной. *C. burnetii* активно модулирует пути везикулярного трафика захватом мембран для коксипелла-содержащей вакуоли. Это является свидетельством того, что ранние секреторные пути вовлечены в биогенез этой вакуоли [17]. Эффекторы Dot/Icm-системы, которые включаются в секреторные пути хозяина, были идентифицированы у *L. pneumophila* с использованием секретируемой эмбриональной щелочной фосфатазы [56]. У коксипеллы был обнаружен эффектор CBU_0635, нарушающий секреторные пути клеток млекопитающих с использованием этой же методики; он локализуется в связке с аппаратом Гольджи [19]. Дальнейший анализ необходим для установления точного механизма действия CBU_0635 и его связи с вирулентностью коксипеллы.

Родственные убиквитину, содержащие F-бокс, белки представляют интересную группу эффекторов Dot/Icm-системы. Подобно *L. pneumophila*, *C. burnetii* кодирует паралоги содержащих F-бокс белков; три из них являются эффекторами Dot/Icm-системы, а один (CpeC) ассоциирован с убиквитином [20, 105]. В эукариотической клетке эта группа белков может обеспечивать связанную с протеасомами деградацию [73]. Например, у легионеллы содержащий F-бокс протеин AnkV метит второстепенные протеины хозяина (через убиквитинилирование) для деградации протеасомой 26S, обеспечивая источник аминокислот для роста бактерий [73]. Играют ли F-бокс протеины коксипеллы подобную роль — еще только предстоит установить.

Стратегии ухода от механизмов иммунного ответа

C. burnetii использует несколько стратегий ухода от иммунного ответа, которые связаны со структурой ее липополисахаридов (ЛПС). Вирулентная фаза I коксипеллы продуцирует ЛПС с полноразмерным O-антигеном [100]. Более того, структура этих так называемых гладких ЛПС препятствует обнаружению бактерии паттернами распознавания Toll-подобного рецептора TLR2 [83], который распознает лиганды внутри ЛПС. Напротив, авирулентная фаза II *C. burnetii* продуцирует шероховатые ЛПС, у которых отсутствует терминальный сахар O-антигена и которые легко детектируются TLR2; их распознавание индуцирует продукцию интерлейкина-12 (IL-12) и фактора некроза опухолей (TNF) и активирует макрофаги для опосредованного бактериального клиренса [110]. В противоположность этому, фаза I *C. burnetii* не индуцирует созревание первичных дендритных клеток и индуцирует продукцию относительно низких уровней IL-12 и TNF [83]. Это позволяет предположить, что ЛПС фазы I, содержащие полноразмерный O-антиген, защищают лиганды TLR2 на поверхности бактериальной клеточной стенки. Другие исследования показали, что ЛПС фаз I и II индуцируют продукцию TNF макрофагами. Однако индукция этого процесса, по видимому, происходит из-за контаминирующих лигандов TLR2, поскольку очищенные ЛПС (которые могут содержать контаминирующие лиганды TLR) индуцируют сигналинг TLR2. Очищенный хроматографией липид A (компонент ЛПС, распознаваемый TLR4) подобным свойством не обладает [27, 36, 110].

Исследования показали, что ЛПС коксиелл являются примерно в тысячу раз менее токсичными, нежели ЛПС бактерий кишечной группы, например, *E. coli* [3]. Далее было установлено, что коксиелла использует вторую ЛПС-зависимую собственную стратегию ухода от иммунного ответа: чаще, чем агонист сигналинга TLR4, липид А коксиеллы служит в качестве антагониста TLR4 [110]. Липид А *C. burnetii* (фазовых вариантов I и II) состоит из тетраациллированной структуры. Такая форма липида А связана с антагонизмом к TLR4-сигналингу у некоторых других бактериальных патогенов, в частности, у *Yersinia pestis* [89, 91]. Выяснение роли TLR4 в патогенезе *C. burnetii* было осложнено тем, что рецепторы клеточной поверхности, по видимому, вовлечены в перестройку актиновых филаментов и фагоцитоз вирулентной фазы I [37]. Предполагается, что способность TLR4 различать липополисахариды фазы I и II не зависит от структуры липида А, но зависит от новых сигнальных механизмов, включающих опосредованный О-антигеном фагоцитоз (О-антиген отсутствует у ЛПС фазы II) [110]. Дальнейшие исследования требуются для того, чтобы объяснить полученные данные, в том числе, потому что транскрипционный профиль клетки хозяина, инфицированной коксиеллами фазы I или II, не выявляет экспрессии генов, необходимых для TLR4-сигналинга [13].

Способность *C. burnetii* избегать детекции рецепторами распознавания патогенов предупреждает активацию инфицированных макрофагов и обеспечивает внутриклеточную нишу, поддерживающую репликацию патогена. Большое число исследований показало, что активация инфицированных клеток IFN γ ингибирует репликацию коксиелл [26, 109], прежде всего за счет продукции активных форм кислорода (ROS) и активных форм азота (RNS) [15]. *C. burnetii* предотвращает продукцию ROS через секрецию кислой фосфатазы (CBU0335), механизм действия которой пока не установлен, но известно, что этот протеин препятствует сборке NADPH-оксидазного комплекса, хотя этот механизм может быть неэффективен в защите от высоких уровней ROS, которые индуцируются IFN γ [35, 85]. Продукция RNS требует синтеза *de novo* индуцибельной NO-синтазы (iNOS), которая происходит после индукции провоспалительными цитокинами, образующимися после стимуляции TLR [97]. В отличие от ЛПС *E. coli*, которые стимулируют макрофаги на синтез нитратов, экспозиция макрофагов с *C. burnetii* не приво-

дит к секреции нитратов, что неудивительно, учитывая, что *C. burnetii* поражает клетки без стимуляции TLR [13].

Гибель клетки хозяина часто индуцируется в процессе инфекции как механизм иммунной защиты. Это служит двум целям: элиминирует инфицированные клетки и позволяет окружить дендритными клетками пораженные апоптотические бляшки и произвести последующую презентацию антигена через молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса, которые индуцируют протективный иммунитет к внутриклеточным патогенам [4]. Таким образом, способность *C. burnetii* ингибировать апоптоз представляет стратегию ухода от иммунного ответа. Аутофагия является другим механизмом, используемым системой врожденного иммунитета для устранения внутриклеточных патогенов. Однако, как уже упоминалось, коксиелла активно задействует компоненты аутофагии в формировании коксиелла-содержащей вакуоли, и индукция аутофагии на самом деле способствует внутриклеточной репликации патогена [96, 107].

Заключение

C. burnetii является широко распространенной во внешней среде бактерией, имеет широкий круг хозяев и способна вызывать эпидемические вспышки благодаря аэрозольному пути заражения и чрезвычайной стабильности в условиях внешней среды. Понимание механизмов патогенности этого микроорганизма является приоритетным направлением исследований. Активация или подавление процессов внутриклеточного трафика в ходе инфекции позволяет *C. burnetii* адаптироваться к существованию в коксиелла-содержащей вакуоли с низким рН. Кроме того, *C. burnetii* ингибирует активацию макрофагов для того, чтобы избежать распознавания системой врожденного иммунитета.

Длительное время существовавшая идея, о том, что только ЛПС являются детерминантами вирулентности, признана неверной, и в настоящее время значительное число исследований посвящено важной роли функциональной секреторной системы IV типа в обеспечении внутриклеточного роста. Секреторная система IV типа коксиелл транспортирует более сотни известных субстратов, но какие из них являются необходимыми для внутриклеточной репликации еще только предстоит установить. Недавние исследования показали, что, по сравнению с *L. pneumophila*,

у *C. burnetii* есть некоторые особенные эффекторы, которые секретируются через транспортную систему IV типа, что демонстрирует некоторую избыточность этой системы у коксиеллы по сравнению с легионеллой. В настоящее время разрабатывается высокопроизводительный скрининг случайных и целевых мутантных

библиотек, который позволит идентифицировать новые гены, важные для внутриклеточного роста этого патогена *in vitro* и *in vivo*. Наконец, развитие методов сайт-специфического мутагенеза позволит установить роль предполагаемых путей и факторов в получении знаний о молекулярном патогенезе Ку-лихорадки.

Список литературы/References

1. Aguilera M., Salinas R., Rosales E., Carminati S., Colombo M.I., Beron W. Actin dynamics and Rho GTPases regulate the size and formation of parasitophorous vacuoles containing *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, no. 10, pp. 4609–4620. doi: 10.1128/IAI.00301-09
2. Alvarez-Martinez C.E., Christie P.J. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2009, vol. 73, no. 4, pp. 775–808. doi: 10.1128/MMBR.00023-09
3. Amano K., Williams J.C., Missler S.R., Reinhold V.N. Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, no. 10, pp. 4740–4747.
4. Ashida H., Mimuro H., Ogawa M., Kobayashi T., Sanada T., Kim M., Sasakawa C. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J. Cell. Biol.*, 2011, vol. 195, no. 6, pp. 931–942. doi: 10.1083/jcb.201108081
5. Baca O.G., Scott T.O., Akporiaye E.T., De Blasiis R., Crissman H.A. Cell cycle distribution patterns and generation times of L929 fibroblast cells persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.*, 1985, vol. 47, no. 2, pp. 366–369.
6. Baca O.J., Klassen D.A., Aragon A.S. Entry of *Coxiella burnetii* into host cells. *Acta Virol.*, 1993, vol. 37, no. 2–3, pp. 143–155.
7. Banga S., Gao P., Shen X., Fiscus V., Zong W.X., Chen L., Luo Z.Q. *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, vol. 104, no. 12, pp. 5121–5126.
8. Bartra S.S., Gong X., Loricca C.D., Jain C., Nair M.K., Schifferli D., Qian L., Li Z., Plano G.V., Schlessner K. The outer membrane protein A (OmpA) of *Yersinia pestis* promotes intracellular survival and virulence in mice. *Microb. Pathog.*, 2012, vol. 52, no. 1, pp. 41–46. doi: 10.1016/j.micpath.2011.09.009
9. Beare P.A., Unsworth N., Andoh M., Voth D.E., Omsland A., Gilk S.D., Williams K.P., Sobral B.V., Kupko J.J. 3rd, Porcella S.F., Samuel J.E., Heinzen R.A. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, no. 2, pp. 642–656. doi: 10.1128/IAI.01141-08
10. Beare P.A., Gilk S.D., Larson C.L., Hill J., Stead C.M., Omsland A., Cockrell D.C., Howe D., Voth D.E., Heinzen R.A. Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages. *MBio*, 2011, vol. 2, no. 4, e0017511. doi: 10.1128/mBio.00175-11
11. Beare P.A., Sandoz K.M., Larson C.L., Howe D., Kronmiller B., Heinzen R.A. Essential role for the response regulator PmeA in *Coxiella burnetii* type IVB secretion and colonization of mammalian host cells. *J. Bacteriol.*, 2014, vol. 196, no. 11, pp. 1925–1940. doi: 10.1128/JB.01532-14
12. Beare P.A., Larson C.L., Gilk S.D., Heinzen R.A. Two systems for targeted gene deletion in *Coxiella burnetii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 78, no. 13, pp. 4580–4589. doi: 10.1128/AEM.00881-12
13. Benoit M., Barbarat B., Bernard A., Olive D., Mege J.L. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 2008, vol. 38, no. 4, pp. 1065–1070. doi: 10.1002/eji.200738067
14. Berens C., Bisle S., Klingenberg L., Luhrmann A. Applying an inducible expression system to study interference of bacterial virulence factors with intracellular signaling. *J. Vis. Exp.*, 2015, vol. 100, e52903. doi: 10.3791/52903
15. Brennan R.E., Russell K., Zhang G.E., Samuel J. Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infections. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 11, pp. 6666–6675.
16. Campodonico E.M., Chesnel L., Roy C.R. A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol. Microbiol.*, 2005, vol. 56, no. 4, pp. 918–933.
17. Campoy E.M., Zoppino F.C., Colombo M.I. The early secretory pathway contributes to the growth of the *Coxiella*-replicative niche. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, no. 1, pp. 402–413. doi: 10.1128/IAI.00688-10
18. Capo C., Lindberg F.P., Meconi S., Zaffran Y., Tardei G., Brown E.J., Raoult D., Mege J.L. Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin and CR3. *J. Immunol.*, 1999, vol. 163, no. 11, pp. 6078–6085.
19. Carey K.L., Newton H., Luhrmann A.J., Roy C.R. The *Coxiella burnetii* Dot/Icm system delivers a unique repertoire of type IV effectors into host cells and is required for intracellular replication. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 5, e1002056. doi: 10.1371/journal.ppat.1002056
20. Chen C., Banga S., Mertens K., Weber M.M., Gorbaslieva I., Tan Y., Luo Z.Q., Samuel J.E. Large-scale identification and translocation of type IV secretion substrates by *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 50, pp. 21755–21760. doi: 10.1073/pnas.1010485107
21. Coleman S.A., Fischer E.R., Howe D., Mead D.J., Heinzen R.A. Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 21, pp. 7344–7352.
22. Datta D., Vaidehi N., Floriano W.B., Kim K.S., Prasadarao N.V., Goddard W.A. 3rd. Interaction of *E. coli* outer-membrane protein A with sugars on the receptors of the brain microvascular endothelial cells. *Proteins*, 2003, vol. 50, no. 2, pp. 213–221.
23. De Felipe K.S., Pampou S., Jovanovic O.S., Pericone C.D., Ye S.F., Kalachikov S., Shuman H.A. Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, no. 22, pp. 7716–7726.

24. De Felipe K.S., Glover R.T., Charpentier X., Anderson O.R., Reyes M., Pericone C.D., Shuman H.A. Legionella eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog.*, 2008, vol. 4, no. 8, e1000117. doi: 10.1371/journal.ppat.1000117
25. De Fougerolles A.R., Kotliansky V.E. Regulation of monocyte gene expression by the extracellular matrix and its functional implications. *Immunol. Rev.*, 2002, vol. 186, pp. 208–220.
26. Dellacasagrande J., Capo C., Raoult D., Mege J.L. IFN- γ -mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, no. 4, pp. 2259–2265.
27. Dellacasagrande J., Ghigo E., Machergui-El S., Hammami S.M., Toman R., Raoult D., Capo C., Mege J.L. $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin and bacterial lipopolysaccharide are involved in *Coxiella burnetii*-stimulated production of tumor necrosis factor by human monocytes. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, no. 10, pp. 5673–5678.
28. Eckart R.A., Bisle S., Schulze-Luehrmann J., Wittman I., Jantsch J., Schmid B., Berens C., Luhrmann A. Antiapoptotic activity of *Coxiella burnetii* effector protein AnkG is controlled by p32-dependent trafficking. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 7, pp. 2763–2771. doi: 10.1128/IAI.01204-13
29. Espenshade P.J., Hughes A.L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 2007, vol. 41, pp. 401–427.
30. Flannagan R.S., Jaumouillé V., Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.*, 2012, vol. 7, pp. 61–98. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445
31. Fu Y., Galan J.E. Salmonella protein antagonizes Rac1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*, 1999, vol. 401, pp. 293–297. doi: 10.1038/45829
32. Ge J., Xu H., Li T., Zhou Y., Zhang Z., Li S., Liu L., Shao F. A Legionella type IV effector activates the NF κ B pathway by phosphorylating the I κ B family of inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 33, pp. 13725–13730. doi: 10.1073/pnas.0907200106
33. Graham J.J., Winchell C.J., Sharma U.M., Voth D.E. Identification of ElpA, a *Coxiella burnetii* pathotype-specific Dot/Icm type IV secretion system substrate. *Infect. Immun.*, 2015, vol. 83, no. 3, pp. 1190–1198. doi: 10.1128/IAI.02855-14
34. Gutierrez M.G., Vazques C.L., Munafo D.B., Zoppino F.C., Beron W., Rabinovitch M., Colombo M.I. Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell Microbiol.*, 2005, vol. 7, no. 7, pp. 981–993. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00527.x
35. Hill J., Samuel J.E. *Coxiella burnetii* acid phosphatase inhibits the release of reactive oxygen intermediates in polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, no. 1, pp. 414–420. doi: 10.1128/IAI.01011-10
36. Hirschfeld M., Ma Y., Weis J.H., Vogel S.N., Weis J.J. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine Toll-like receptor 2. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 2, pp. 618–622. doi: 10.4049/jimmunol.165.2.618
37. Honstetter A., Ghigo E., Moynault A., Capo C., Toman R., Akira S., Takeuchi O., Lepidi H., Raoult D., Mege J.L. Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, no. 6, pp. 3695–703. doi: 10.4049/jimmunol.172.6.3695
38. Howe D., Mallavia L.P. *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, no. 7, pp. 3815–3821. doi: 10.1128/IAI.68.7.3815-3821.2000
39. Howe D., Heinzen R.A. *Coxiella burnetii* inhabits a cholesterol-rich vacuole and influences cellular cholesterol metabolism. *Cell. Microbiol.*, 2006, vol. 8, no. 3, pp. 496–507. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00641.x
40. Howe D., Melnicakova J., Barak I., Heinzen R.A. Maturation of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole requires bacterial protein synthesis but not replication. *Cell. Microbiol.*, 2003, vol. 5, no. 7, pp. 469–480. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00293.x
41. Howe D., Heinzen R.A. Replication of *Coxiella burnetii* is inhibited in CHO K-1 cells treated with inhibitors of cholesterol metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2005, vol. 1063, pp. 123–129. doi: 10.1196/annals.1355.020
42. Huang L., Boyd D., Amyot W.M., Hempstead A.D., Luo Z.Q., O'Connor T.J., Chan C., Machner M., Montminy T., Isberg R.R. The E Block motif is associated with Legionella pneumophila translocated substrates. *Cell. Microbiol.*, 2011, vol. 13, no. 2, pp. 227–245. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01531.x
43. Hussain S.K., Broderdorf L.J., Sharma U.M., Voth D.E. Host kinase activity is required for *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole formation. *Front. Microbiol.*, 2010, vol. 1:137. doi: 10.3389/fmicb.2010.00137
44. Kinchen J.M., Ravichandran K.S. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, vol. 9, no. 10, pp. 781–795. doi: 10.1038/nrm2515
45. Klingenberg L., Eckart R.A., Berens C., Luhrmann A. The *Coxiella burnetii* type IV secretion system substrate CaeB inhibits intrinsic apoptosis at the mitochondrial level. *Cell. Microbiol.*, 2013, vol. 15, no. 4, pp. 675–687. doi: 10.1111/cmi.12066
46. Kubori T., Shinzawa N., Kanuka H., Nagai H. Legionella metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 6, no. 12, e1001216. doi: 10.1371/journal.ppat.1001216
47. Laguna R.K., Creasey E.A., Li Z., Valtz N., Isberg R.R. A Legionella pneumophila – translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 49, pp. 18745–18750. doi: 10.1073/pnas.0609012103
48. Larson C.L., Beare P., Howe D.A., Heinzen R.A. *Coxiella burnetii* effector protein subverts clathrin-mediated vesicular trafficking for pathogen vacuole biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, no. 49, E4770–4779. doi: 10.1073/pnas.1309195110
49. Lifshitz Z., Burstein D., Peeri M., Zusman T., Schwartz K., Shuman H.A., Pupko T., Segal G. Computational modeling and experimental validation of the Legionella and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, no. 8, E707–715. doi: 10.1073/pnas.1215278110
50. Lifshitz Z., Burstein D., Schwartz K., Shuman H.A., Pupko T., Segal G. Identification of novel *Coxiella burnetii* Icm/Dot effectors and genetic analysis of their involvement in modulating a mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 9, pp. 3740–3752. doi: 10.1128/IAI.01729-14
51. Luhrmann A., Roy C.R. *Coxiella burnetii* inhibits activation of host cell apoptosis through a mechanism that involves preventing cytochrome c release from mitochondria. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 11, pp. 5282–5289. doi: 10.1128/IAI.00863-07

52. Luhrmann A., Nogueira C.V., Carey K.L., Roy C.R. Inhibition of pathogen-induced apoptosis by a *Coxiella burnetii* type IV effector protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 44, pp. 18997–19001. doi: 10.1073/pnas.1004380107
53. MacDonald L.J., Kurten R.C., Voth D.E. *Coxiella burnetii* alters cyclic AMP-dependent protein kinase signalling during growth in macrophage. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 80, no. 6, pp. 1980–1986. doi: 10.1128/IAI.00101-12
54. MacDonald L.J., Graham J.J., Kurten R.C., Voth D.E. *Coxiella burnetii* exploits host cAMP-dependent protein kinase signalling to promote macrophage survival. *Cell. Microbiol.*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 146–159. doi: 10.1111/cmi.12213
55. Maffatt J.H., Newton P., Newton H.J. *Coxiella burnetii*: turning hostility into a home. *Cell. Microbiol.*, 2015, vol. 17, no. 5, pp. 621–631. doi: 10.1016/j.devcel.2006.05.013
56. Machner M.P., Isberg R.R. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev. Cell*, 2006, vol. 11, no. 1, pp. 47–56. doi: 10.1016/j.devcel.2006.05.013
57. Martinez E., Cantet F., Fava L., Norville I., Bonazzi M. Identification of OmpA, a *Coxiella burnetii* protein involved in host cell invasion, by multi-phenotypic high-content screening. *PLOS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 3, e1004013. doi: 10.1371/journal.ppat.1004013
58. Maturana P., Graham J.G., Sharma U.M., Voth D.E. Refining the plasmid-encoded type IV secretion system substrate repertoire of *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.*, 2013, vol. 195, no. 14, pp. 3269–3276. doi: 10.1128/JB.00180-13
59. Maurin M., Raoult D. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, vol. 12, no. 4, pp. 518–553.
60. McDonough J.A., Newton H.J., Klum S., Swiss R., Agaisse H., Roy C.R. Host pathways important for *Coxiella burnetii* infection revealed by genome-wide RNA interference screening. *mBio*, 2013, vol. 4, no. 1, e00606-12. doi: 10.1128/mBio.00606-12
61. McPhee J.B., Lewenza S., Hancock R.E. Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 2003, vol. 50, no. 1, pp. 205–217. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03673.x
62. Meconi S., Capo C., Remacle-Bonnet M., Pommier G., Raoult D., Mege J.L. Activation of protein tyrosine kinases by *Coxiella burnetii*: role in actin cytoskeleton reorganization and bacterial phagocytosis. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 4, pp. 2520–2526. doi: 10.1128/IAI.69.4.2520-2526.2001
63. Meconi S., Jacomo V., Boguet P., Raoult D., Mege J.L., Capo C. *Coxiella burnetii* induces reorganization of the actin cytoskeleton in human monocytes. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, no. 11, pp. 5527–5533.
64. Mo Y.Y., Cianciotto N.P., Mallavia L.P. Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. *Microbiology*, 1995, vol. 141, no. 11, pp. 2861–2871. doi: 10.1099/13500872-141-11-2861
65. Morgan J.K., Luedtke B.E., Thompson H.A., Shaw E.I. *Coxiella burnetii* type IVB secretion system region I genes are expressed early during the infection of host cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010, vol. 311, no. 11, pp. 61–69. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02072.x
66. Morgan J.K., Luedtke B.E., Shaw E.I. Polar localization of the *Coxiella burnetii* type IVB secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010, vol. 305, no. 2, pp. 177–183. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01926.x
67. Nagai H., Kubori T. Type IVB secretion systems of *Legionella* and other Gram-negative bacteria. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2:136, eCollection 2011, doi: 10.3389/fmicb.2011.00136
68. Newton H.J., Kohler L.J., McDonough J.A., Temoche-Diaz M., Crabill E., Hartland E.L., Roy C.R. A screen of *Coxiella burnetii* mutants reveals important roles for Dot/Icm effectors and host autophagy in vacuole biogenesis. *PloS Pathog.*, 2014, vol. 10, no. 7, e1004286, doi: 10.1371/journal.ppat.1004286
69. Newton H.J., McDonough J.A., Roy C.R. Effector protein translocation by the *Coxiella burnetii* Dot/Icm type IV secretion system requires endocytic maturation of the pathogen-occupied vacuole. *PloS One*, 2013, vol. 8, no. 1, e54566. doi: 10.1371/journal.pone.0054566
70. Omsland A., Beare P.A., Hill J., Cockrell D.C., Howe D., Hansen B., Samuel J.E., Hainzen R.A. Isolation from animal tissue and genetic transformation of *Coxiella burnetii* are facilitated by an improved axenic growth medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, vol. 77, no. 11, pp. 3720–3725. doi: 10.1128/AEM.02826-10
71. Pan X., Luhrmann A., Satoh A., Laskowski-Arce M.A., Roy C.R. Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science*, 2008, vol. 320, no. 5883, pp. 1651–1654. doi: 10.1126/science.1158160
72. Peabody C.R., Chung Y.J., Yen M.R., Vidal-Ingigliardi D., Pubsley A.P., Saier M.H. JR. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 2003, vol. 149, pt. 11, pp. 3051–3072. doi: 10.1099/mic.0.26364-0
73. Price C.T., Al-Quadan T., Santic M., Rosenshine I., Abu Kwaiq Y. Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science*, 2011, vol. 334, no. 6062, pp. 1553–1557. doi: 10.1126/science.1212868
74. Ren Q., Robertson S.J., Howe D., Barrows L.F., Heinzen R.A. Comparative DNA microarray analysis of host cell transcriptional responses to infection by *Coxiella burnetii* or *Chlamydia trachomatis*. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2003, vol. 990, pp. 701–713.
75. Roman M.J., Coriz P.D., Baca O.G. A proposed model to explain persistent infection of host cells with *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, no. 5, pp. 1415–1422.
76. Roman M.J., Crissman H.A., Samsonoff W.A., Hechemy K.E., Baca O.G. Analysis of *Coxiella burnetii* isolates in cell culture and the expression of parasite-specific antigens on the host membrane surface. *Acta Virol.*, 1991, vol. 35, no. 6, pp. 503–510.
77. Romano P.S., Gutierrez M.G., Beron W., Rabinovitch M., Colombo M.A. The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cell. Microbiol.*, 2007, vol. 9, no. 4, pp. 891–909. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00838.x
78. Russell-Lodrigue K.E., Zhang G.Q., McMurray D.N., Samuel J.E. Clinical and pathologic changes in a guinea pig aerosol challenge model of acute Q fever. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 11, pp. 6085–6091.
79. Russell-Lodrigue K.E., Andoh M., Poels M.W., Shive H.R., Weeks B.R., Zhang G.Q., Tersteeg C., Fukushi H., Hirai K., McMurray D.N., Samuel J.E. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, no. 12, pp. 5640–5650. doi: 10.1128/IAI.00851-09
80. Samuel J.E., Frazier M.E., Mallavia L.P. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.*, 1985, vol. 49, no. 3, pp. 775–779.

81. Seshadri R., Paulsen I.T., Eisen J.A., Read T.D., Nelson K.E., Nelson W.C., Ward N.L., Tettelin H., Davidsen T.M., Beanan M.J., Deboy R.T., Daugherty S.C., Brinkac L.M., Madupu R., Dodson R.J., Khouri H.M., Lee K.H., Carty H.A., Scanlan D., Heinzen R.A., Thompson H.A., Samuel J. E., Fraser C.M., Heidelberg J.F. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, no. 9, pp. 5455–5460.
82. Sexton J.A., Vogel J.P. Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic*, 2002, vol. 3, no. 3, pp. 178–185.
83. Shannon J.G., Howe D., Heinzen R.A. Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 24, pp. 8722–8727.
84. Shen X., Banga S., Liu Y., Xu L., Gao P., Shamovsky I., Nudler E., Luo Z.Q. Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response. *Cell. Microbiol.*, 2009, vol. 11, no. 6, pp. 911–926. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01301.x
85. Siemsen D.W., Kirpotina L.N., Jutila M.A., Quinn M.T. Inhibition of the human neutrophil NADPH oxidase by *Coxiella burnetii*. *Microbes Infect.*, 2009, vol. 11, no. 6–7, pp. 671–679. doi: 10.1016/j.micinf.2009.04.005
86. Skultety L., Hajduch M., Floraz-Ramirez G., Miernyk J.A., Ciampor F., Toman R., Sekeyova Z. Proteomic comparison of virulent phase I and avirulent phase II of *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J. Proteomics*, 2011, vol. 74, no. 10, pp. 1971–1984. doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.017
87. Stead C.M., Omsland A., Beare P.A., Sandoz K.M., Heinzen R.A. Sec-mediated secretion by *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.*, 2013, vol. 13, p. 222. doi: 10.1186/1471-2180-13-222
88. Stein A., Raoult D. Lack of pathotype specific genes in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microb. Pathol.*, 1993, vol. 15, no. 3, pp. 175–185.
89. Telepnev M.V., Klimpel G.R., Haithcoat J., Knirel Y.A., Anisimov A.P., Motin V.L. Tetraacylated lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* can inhibit multiple Toll-like receptor-mediated signaling pathways in human dendritic cells. *J. Infect. Dis.*, 2009, vol. 200, no. 11, pp. 1694–1702. doi: 10.1086/647986
90. Tigertt W.D., Benenson A.S., Gochenour W.S., Airborne Q fever. *Bacteriol. Rev.*, 1961, vol. 25, pp. 285–293.
91. Toman R., Garidel P., Andra J., Slaba K., Hussein A., Koch M.H., Brandenburg K. Physicochemical characterization of the endotoxins from *Coxiella burnetii* strain Priscilla in relation to their bioactivities. *BMC Biochem.*, 2004, vol. 5:1. doi: 10.1186/1471-2091-5-1
92. Tse M.K., Cheung S.K., Ke Y.H., Lau C.C., Sze K.H., Yuen K.Y. Backbone and side-chain 1H, 13C and 15N assignments of the PPIase domain of macrophage infectivity potentiator (Mip) protein from *Coxiella burnetii*. *Biomol. NMR Assign.*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 173–176. doi: 10.1007/s12104-013-9477-3
93. Tujulin E., Macellaro A., Lilliehook B., Norlander L. Effect of endocytosis inhibitors on *Coxiella burnetii* interaction with host cells. *Acta Virol.*, 1998, vol. 42, no. 3, pp. 125–131.
94. Yang J., Kiu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P., Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 1997, vol. 275, no. 5303, pp. 1129–1132. doi: 10.1126/science.275.5303.1129
95. Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, vol. 9, no. 1, pp. 47–59. doi: 10.1038/nrm2308
96. Vazquez C.L., Colombo M.I. *Coxiella burnetii* modulates Beclin 1 and Bcl2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. *Cell Death Differ.*, 2010, vol. 17, no. 3, pp. 421–438. doi: 10.1038/cdd.2009.129
97. Vila-del Sol V., Diaz-Munoz M.D., Fresno M. Requirement of tumor necrosis factor α and nuclear factor- κ B in the induction by IFN- γ of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, vol. 81, no. 1, pp. 272–283. doi: 10.1189/jlb.0905529
98. Vincent C.D., Friedman J.R., Jeong K.C., Buford E.C., Miller J.L., Vogel J.P. Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.*, 2006, vol. 62, no. 5, pp. 1278–1291.
99. Vincent C.D., Friedman J.R., Jeong K.C., Sutherland M.C., Vogel J.P. Identification of the DotL coupling protein subcomplex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.*, 2012, vol. 85, no. 2, pp. 378–391. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08118.x
100. Vishwanath S., Hackstadt T. Lipopolysaccharide phase variation determines the complement-mediated serum susceptibility of *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.*, 1988, vol. 56, no. 1, pp. 40–44.
101. Voth D.E., Howe D., Heinzen R.A. *Coxiella burnetii* inhibits apoptosis in human THP1 cells and monkey primary alveolar macrophages. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 9, pp. 4263–4271. doi: 10.1128/IAI.00594-07
102. Voth D.E., Heinzen R.A. *Coxiella* type IV secretion and cellular microbiology. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, vol. 12, no. 1, pp. 74–80. doi: 10.1016/j.mib.2008.11.005
103. Voth D.E., Heinzen R.A. Sustained activation of Akt and Erk1/2 is required for *Coxiella burnetii* antiapoptotic activity. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, no. 1, pp. 205–213. doi: 10.1128/IAI.01124-08
104. Voth D.E., Howe D., Beare P.A., Vogel J.P., Unsworth N., Samuel J.E., Heinzen R.A. The *Coxiella burnetii* ankyrin repeat domain-containing protein family is heterogeneous, with C-terminal truncations that influence Dot/Icm-mediated secretion. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 13, pp. 4232–4242. doi: 10.1128/JB.01656-08
105. Voth D.E., Beare P.A., Howe D., Sharma U.M., Samoilis G., Cockrell D.C., Omsland A., Heinzen R.A. The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates. *J. Bacteriol.*, 2011, vol. 193, no. 7, pp. 1493–1503. doi: 10.1128/JB.01359-10
106. Weber M.M., Cen C., Rowin K., Mertens K., Galvan G., Zhi H., Dealing C.M., Roman V.A., Bange S., Tan Y.Q., Luo Z.E., Samuel J. Identification of *Coxiella burnetii* type IV secretion substrates required for intracellular replication and *Coxiella*-containing vacuole formation. *J. Bacteriol.*, 2013, vol. 195, no. 17, pp. 3914–3924. doi: 10.1128/JB.00071-13
107. Winchell C.G., Graham J.G., Kurten R.C., Voth D.E. *Coxiella burnetii* type IV secretion-dependent recruitment of macrophage autophagosomes. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 6, pp. 2229–2238. doi: 10.1128/IAI.01236-13
108. Zamboni D.S., McGrath S., Rabinovitch M., Roy C.R. *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol. Microbiol.*, 2003, vol. 49, no. 4, pp. 965–976. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03626.x

109. Zamboni D.S., Rabinovitch M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, no. 3, pp. 1225–1233. doi: 10.1128/IAI.71.3.1225-1233.2003
110. Zamboni D.S., Campos M.A., Torrecilhas A.C., Kiss K., Samuel J.E., Golenbock D.T., Lauw F.N., Roy C.R., Almeida I.C., Gazinelli R.T. Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, no. 52, pp. 54405–54415. doi: 10.1074/jbc.M410340200
111. Zechner E.L., Lang S., Schildbach J.F. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 2012, vol. 367, no. 1592, pp. 1073–1087. doi: 10.1098/rstb.2011.0207
112. Zhang Y., Zhang G., Hendrix L.R., Tesh V.L., Samuel J.E. *Coxiella burnetii* induces apoptosis during early stage infection via a caspase-independent pathway in human monocytic THP1 cells. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 1, pp. e30841. doi: 10.1371/journal.pone.0030841
113. Zusman T., Aloni G., Halperin E., Kotzer H., Degtyar E., Feldman M., Segal G. The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol. Microbiol.*, 2007, vol. 63, no. 5, pp. 1508–1523. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05604.x

Автор:

Панферова Ю.А., младший научный сотрудник лаборатории зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Поступила в редакцию 22.12.2015
Отправлена на доработку 09.02.2016
Принята к печати 15.02.2016

Author:

Panferova Yu.A., Junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Received 22.12.2015
Revision received 09.02.2016
Accepted 15.02.2016