

УДК 616.981.452:576.8

С.В. Дентовская, М.Е. Платонов, И.В. Бахтеева, А.П. Анисимов

НАЛИЧИЕ ПОЛНОЙ СТРУКТУРЫ КОРА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НЕОБХОДИМО ДЛЯ АКТИВАЦИИ ПЛАЗМИНОГЕНА ВОЗБУДИТЕЛЕМ ЧУМЫ

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

Ранее установлено, что S-форма липополисахарида (ЛПС) ингибирует активность активатора плазминогена (Pla) *Yersinia pestis*. В настоящей работе мы оценивали фибринолитическую и плазмокоагуляционную активности Pla у штаммов *Y. pestis* с мутациями в генах, ответственных за биосинтез ЛПС, по сравнению с таковыми у исходного штамма. Показано, что укорочение коровой части ЛПС ведет к исчезновению обеих активностей, тогда как снижение степени ацилирования липида А не влияет на фибринолитическую и плазмокоагуляционную способности.

Ключевые слова: *Y. pestis*, фибринолитическая и плазмокоагуляционная активности, ЛПС.

Для постоянной циркуляции в природных очагах возбудитель чумы должен проникнуть в организм, противодействовать защитным бактерицидным системам грызуна и размножиться для обеспечения бактериемии, необходимой для дальнейшей передачи блохами новому хозяину. Каждый из этапов циклического существования *Yersinia pestis* обеспечивается множеством факторов, действующих совместно или индивидуально на различных стадиях инфекционного процесса или трансмиссии. Но только в совокупности эти факторы обеспечивают циркуляцию возбудителя чумы в природных очагах, каким бы значительным или незначительным не был их индивидуальный эффект. Среди них следует отметить два полифункциональных фактора патогенности: липополисахарид (ЛПС) и активатор плазминогена (Pla), каждый из которых оказывает плеiotропное противодействие защитным механизмам хозяина и переносчика. ЛПС *Y. pestis* определяет устойчивость к бактерицидному действию катонных пептидов и сыворотки, а также индуцирует развитие эндотоксического шока [1].

Pla обладает плазмокоагуляционной активностью. В то же время, активируя плазминоген, он обеспечивает локальный фибринолиз в очагах воспаления,

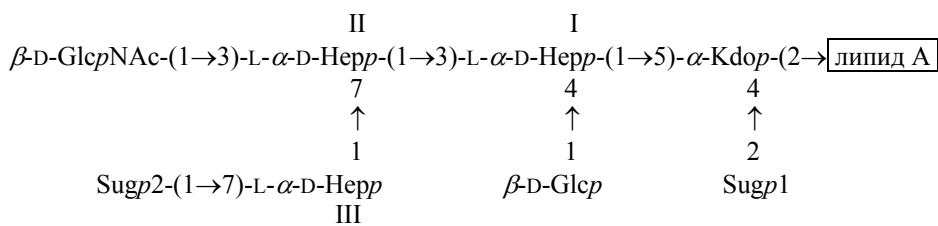
что способствует генерализации инфекции. Коагуляционная активность проявляется при температуре ниже 25 °С, а фибринолитическая - выше 30 °С. За счет способности связываться с экстрацеллюлярным матриксом Pla обладает адгезивной активностью в отношении ряда эукариотических клеток. Установлена способность активатора плазминогена обеспечивать инвазивность бактерий в отношении нефагоцитирующих эукариотических клеток. Протеазная активность обеспечивает способность Pla гидролизовать С3 компонент комплемента и цитокины такие, как фактор некроза опухолей α , интерферон γ , интерлейкин 8 и протеин 1 хемотаксиса моноцитов, а также посттрансляционную деградацию белков Yops [1, 10].

Недавно было показано, что для проявления способности Pla активировать плазминоген [9, 12] необходимо взаимодействие с R-формой ЛПС, образуемой клетками *Y. pestis* [7], а O-боковые полисахаридные цепи, характерные для S-формы ЛПС, синтезируемой *Yersinia pseudotuberculosis* и *Salmonella enterica*, ингибируют активаторную способность [9, 12]. В то же время показано, что изменение собственной структуры ЛПС *Y. pestis* - различный состав кора (олигосахарида) по терминальным остаткам са-

Таблица 1

Использованные в работе штаммы и плазмиды

Штамм / плазида	Характеристика	Источник / ссылка
<i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ	pFra ⁺ , pCD ⁺ , pPst ⁺ , <i>Δpgm</i> ; вакцинный штамм с типичной структурой ЛПС	Вакцина живая чумная (Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Россия)
<i>Y. pestis</i> EVΔYPO0054::kan	pFra ⁺ , pCD ⁺ , pPst ⁺ , <i>Δpgm</i> , Km ^R ; мутант вакцинного штамма EV, дефектный по гену, кодирующему LD-гептозилтрансферазу I	Авторская коллекция
<i>Y. pestis</i> EVΔYPO0057::kan	pFra ⁺ , pCD ⁺ , pPst ⁺ , <i>Δpgm</i> , Km ^R ; мутант вакцинного штамма EV, дефектный по гену, кодирующему LD-гептозилтрансферазу II	Авторская коллекция
<i>Y. pestis</i> EVΔYPO2063::kan	pFra ⁺ , pCD ⁺ , pPst ⁺ , <i>Δpgm</i> , Km ^R ; мутант вакцинного штамма EV, дефектный по гену <i>lpxM</i> , также обозначаемому как <i>msbB</i> или <i>waan</i> и кодирующему ацилтрансферазу LpxM, отвечающую за включение в липид А шестого жирнокислотного остатка - лауриновой кислоты	Авторская коллекция
<i>Y. pestis</i> EV11M	pFra ⁻ , pCD ⁻ , pPst ⁻ , <i>Δpgm</i> ; "глубокий R-мутант" вакцинного штамма EV с предполагаемой мутацией по гену, кодирующему LD-гептозилтрансферазу I	[4, 7]
<i>Y. pestis</i> EV11MрКР	Производный от штамма EV11, несущий плазмиду рКР	Настоящее исследование
рКР	<i>pla</i> ⁺ , <i>pst</i> ⁺ , <i>pim</i> ⁺ , <i>mob</i> ⁺ ; плазида рPst из штамма EV с ген-блоком Km ^R из плазмиды рUC4K, встроенным по сайту рестрикции PstI	Авторская коллекция



Схематическое изображение структуры ЛПС *Y. pestis*:

L- α -D-Нер – L-глицеро- α -D-манно-гептоза; Sug1 – 3-деокси- α -D-манно-окт-2-улозоновая кислота (α -Kdo) или D-глицеро- α -D-мало-окт-2-улозоновая кислота (α -Ko); и Sug2 – β -D-галактоза или D-глицеро- α -D-манно-гептоза; β -D-GlcNAc – β -D-глюкозамин; I, II или III – номера гептоз в коре. $\boxed{\text{липид A}}$ – у штаммов с ЛПС "дикого" типа представлен тетра-, пента- и гексаацильными формами, а у *lpxM* мутанта гексаацильные формы липида А не образуются.

харов - может влиять на проявление целого ряда биологических свойств возбудителя чумы, например, на изменение способности противостоять защитным факторам врожденного иммунитета [4].

Целью настоящего исследования было выяснение возможного влияния структуры кора и липида А ЛПС *Y. pestis* на плазмокоагулазную и фибринолитическую активности Pla.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Используемые в работе штаммы *Y. pestis* и плазмиды представлены в табл. 1.

Электростимулируемую трансформацию плазмиды рКР в клетки *Y. pestis* EV11М проводили в модификации С.А. Еремина с соавт. [2].

Определение фибринолитической и плазмокоагулазной активностей *Y. pestis* проводили с использованием донорской плазмы человеческой крови в соответствии с рекомендациями [3] при температуре 37 °С и 28 °С соответственно.

Результаты и обсуждение

Целый ряд патогенных бактерий взаимодействует с протеолитической плазминоген-плазмин системой млекопитающих. У многих из них на клеточной поверхности присутствуют рецепторы, иммобилизующие плазмин(оген), что способствует активации последнего активаторами плазминогена млекопитающего. Другие бактерии способны влиять на регуляцию системы млекопитающих путем деградации циркулирующих ингибиторов плазмينا, а также изменения уровня экспрессии активаторов плазминогена и активации его ингибиторов. Установлено, что воздействие на систему плазминогена приводит к повреждению экстрацеллюлярного матрикса и последующей диссеминации бактерий [8, 10]. До последнего времени при изучении взаимодействия бактерий с системой плазминогена млекопитающих основное внимание уделяли именно каскаду взаимодействий отдельных факторов системы плазминогена хозяина, но недавние исследования на модели активатора плазминогена *Y. pestis* показали, что активность Pla модулируется структурой ЛПС штамма продуцента – в случае присоединения к кору О-боковых полисахаридных цепей активность Pla не выявляется [9, 12]. Влияние отдельных структурных компонентов собственного ЛПС возбудителя чумы на плазмокоагулазную и фибринолитическую актив-

ности не изучено.

Результаты оценки влияния структуры кора и липида А ЛПС (рисунок) на плазмокоагулазную и фибринолитическую способности возбудителя чумы представлены в табл. 2.

Способность возбудителя чумы «дикого» типа образовывать различные сочетания тетра-гексаацильных форм ЛПС в зависимости от условий культивирования [6, 7] позволяет предположить, что изменение степени ацилирования в этих пределах должно оказывать угнетающее влияние на биологическую активность Pla. Действительно, результаты экспериментов (табл. 2) свидетельствуют, что снижение степени ацилирования липида А в результате мутации по гену *lpxM* не влияет на плазмокоагулазную и фибринолитическую активности Pla.

С другой стороны, редуцированные формы кора, образуемые использованными в нашем исследовании мутантами, несвойственны клеткам *Y. pestis* «дикого» типа [7]. Показано, что у R-мутантов *Escherichia coli* меняется процесс тримеризации поринов, расположенных на поверхности микробной клетки [11], а фолдинг ряда белков внешних мембран является ЛПС-зависимым [5]. Pla же является одним из представителей омпинов - белков внешних мембран энтеробактерий с функциями протеаз/адгезинов [8], и логично предположить, что зна-

Таблица 2

Взаимосвязь структуры ЛПС с плазмокоагулазной и фибринолитической активностями

Структура ЛПС	Плазмокоагулазная активность	Фибринолитическая активность
Sug ₂ ,GlcNAc ₁ Glc ₁ Hep ₃ Sug ₁ ₁ Kdo ₁ -липид A _{4.6}	++++	++++
Sug ₂ ,GlcNAc ₁ Glc ₁ Hep ₃ Sug ₁ ₁ Kdo ₁ -липид A _{4.5}	++++	++++
Glc ₁ Hep ₁ Sug ₁ ₁ Kdo ₁ -липид A _{4.6}	-	-
Sug ₁ ₁ Kdo ₁ -липид A _{4.6}	-	-

Примечания: 1. Подстрочные цифры указывают количество остатков сахаров в коре или жирных кислот в липиде А. Тетраацильные формы липида А содержат по четыре остатка 3-гидроксимиристиновой кислоты [4 × 14:0(3-ОН)], пентаацильные – дополнительно содержат остаток лауриновой кислоты (тетраацильная форма + 12:0), а гексаацильные пальмитолеиновой кислоты (тетраацильная форма + 12:0 + 16:1) [7].

2. Обозначения сахаров указаны в подписи к рисунку.

чительное изменение размера (структуры) ЛПС не только в сторону увеличения [9, 12], но и уменьшения может изменить фолдинг и, соответственно, биологические свойства Pla. Как мы и предполагали, редукция кора ЛПС *Y. pestis* приводила к исчезновению плазмокоагулазной и фибринолитической активностей у мутантов с нарушениями сборки олигосахарида на стадии присоединения первой и второй L- α -D-Нер.

Таким образом установлено, что укорочение коровой части ЛПС *Y. pestis* ведет к исчезновению фибринолитической и плазмокоагулазной активностей, тогда как снижение степени ацилирования липида А не влияет на эти свойства.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-49280-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П. // Молекул. генетика. – 2002. – № 3. – С. 3-23. – 2. Еремин С.А., Дроздов И.Г., Ежов И.Н. и др. // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. – Саратов, 1991. – С. 55-62. – 3. Руководство по профилактике чумы / Под ред. Н.И. Николаева. – Саратов, 1972. – 200 с. – 4. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Titareva G.M. *et al.* // Infect. Immun. - 2005. - Vol. 73. - P. 7324-7331. – 5. De Cock H., Brandenburg K., Wiese A. *et al.* // J. Biol. Chem. - 1999. - Vol. 274. - P. 5114-5119. – 6. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H. *et al.* // Infect. Immun. - 2002. - Vol. 70. - P. 4092-4098. – 7. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V. *et al.* // Biochemistry – 2005. – Vol. 45. – P. 1731-

1743. – 8. Kukkonen M., Korhonen T.K. // Int. J. Med. Microbiol. - 2004. - Vol. 294. - P. 7-14. – 9. Kukkonen M., Suomalainen M., Kyllonen P. *et al.* // Mol. Microbiol. - 2004. - Vol. 51. - P. 215-225. – 10. Lähteenmäki K., Kuusela P., Korhonen T.K. // FEMS Microbiol. Rev. - 2001. - Vol. 25. - P. 531-552. – 11. Laird M.W., Kloser A.W., Misra R. // J. Bacteriol. – 1994. – Vol. 176. – 2259-2264. – 12. Pouillot F., Derbise A., Kukkonen M. *et al.* // Microbiology. - 2005. - Vol. 151(Pt 11). - P. 3759-3768.

S.V. Dentovskaya, M.E. Platonov, I.V. Bakhteyeva, A.P. Anisimov

Presence of the Full Lipopolysaccharide Core Structure is Necessary for Activation of Plasminogen by *Yersinia pestis*

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Recently it was shown that the presence of smooth lipopolysaccharide (LPS) inhibits the activity of *Yersinia pestis* plasminogen activator (Pla). In this study, we tested Pla fibrinolytic and plasmocoagulase activities in *Y. pestis* strains with mutations in the genes responsible for LPS biosynthesis in comparison with those of their parent strain. It was found that reduction of the LPS core portion caused elimination of the both activities, while decrease of lipid A acylation degree did not affect the fibrinolytic and plasmocoagulase properties.

Key words: *Y. pestis*, fibrinolytic and plasmocoagulase activities, LPS.

Поступила 14.09.06.