

ОБЗОРЫ

УДК 579.222

©Коллектив авторов

БЕЛКИ МЕМБРАНЫ ВКЛЮЧЕНИЯ *CHLAMYDIACEAE*

*Е.С. Кострюкова**, *В.Н. Лазарев*, *В.М. Говорун*

ФГУ НИИ Физико-химической медицины Росздрава, 119992 Москва,
ул. Малая Пироговская, 1а; тел.: (495) 245-42-36; факс: (495) 246-4501;
эл. почта: eles@newmail.ru

Белки мембраны включения (Inc-белки) относятся к числу уникальных хламидийных белков. Представители данного семейства привлекают внимание исследователей, поскольку Inc-белки располагаются в мембране включения, они обнаружены у всех известных видов хламидий, экспрессия значительной части генов Inc-белков начинается в течение первых часов после заражения культуры клеток. На сегодняшний день биологические функции Inc-белков остаются практически неизвестными, но принято считать, что Inc-белки могут играть ключевые роли в процессах развития хламидийной инфекции.

Ключевые слова: *Chlamydiaceae*, *Chlamydia*, белки мембраны включения, Inc-белки.

ВВЕДЕНИЕ. Изучение взаимодействия внутриклеточных паразитов с клеткой-хозяином было и остается одной из самых сложных задач молекулярной микробиологии. Это объясняется невозможностью применения классических генетических методов к объекту исследования, а так же наличием у данных микроорганизмов большого числа патоген-специфических генов, не имеющих функциональных гомологов. Как правило, продукты именно этих генов используются внутриклеточными паразитами для подчинения метаболических процессов клетки-хозяина. Механизмы подобного подчинения весьма разнообразны: внутриклеточные паразиты синтезируют в клетке-хозяине различные макромолекулы, искусно имитирующие, либо модифицирующие процессы перестройки цитоскелета, функционирования ЭПР, созревания эндосом и многие другие [1-3]. До сегодняшнего дня расшифровка механизмов данных взаимодействий остается весьма непростой задачей.

Представители семейства *Chlamydiaceae* – облигатные внутриклеточные паразиты, поражающие слизистые оболочки глаза, урогенитального тракта и дыхательной системы и вызывающие ряд серьезных заболеваний у человека [4, 5]. Хламидии обладают уникальным двухфазным жизненным циклом [6] и относительно небольшим размером генома [7], что привлекает к ним пристальное внимание исследователей. Однако, на сегодняшний день большинство вопросов, касающихся физиологии хламидий, остаются неразрешенными.

Жизненный цикл хламидий представляет собой последовательную смену двух состояний микроорганизма – инфекционного, в виде небольших спороподобных элементарных телец (ЭТ) и вегетативного, в виде крупных репродуцирующихся ретикулярных телец (РТ) (рис. 1). При этом хламидии не способны к свободному существованию в цитоплазме клетки-хозяина [6]. Все события внутриклеточного этапа жизненного цикла происходят внутри особой мембранной вакуоли, называемой включением, которая позволяет хламидиям создавать необходимое для собственного развития микроокружение.

* - адресат для переписки

БЕЛКИ МЕМБРАНЫ ВКЛЮЧЕНИЯ *CHLAMYDIACEAE*

Непосредственно после проникновения в клетку и формирования первичного включения происходит дифференцировка ЭТ в более крупные метаболически активные и способные к размножению РТ, которые со временем начинают интенсивно делиться. По мере размножения хламидий включение увеличивается в размерах, к концу цикла оно может занимать практически весь объём клетки, за исключением ядра [8]. На поздних стадиях развития инфекции ретикулярные тельца претерпевают обратную дифференцировку в элементарные тельца, которые в результате лизиса клетки освобождаются во внешнее пространство, замыкая жизненный цикл. Хламидиям удается с удивительной легкостью подчинять собственным потребностям метаболизм клетки-хозяина, при этом ускользая как от контроля иммунной системы, так и от развития апоптоза. Жизненный цикл различных представителей семейства *Chlamydiaceae* длится от 48 до 72 часов; всё это время метаболизм клетки-хозяина поддерживается на достаточном для сохранения жизнедеятельности уровне, вплоть до ее лизиса [1].

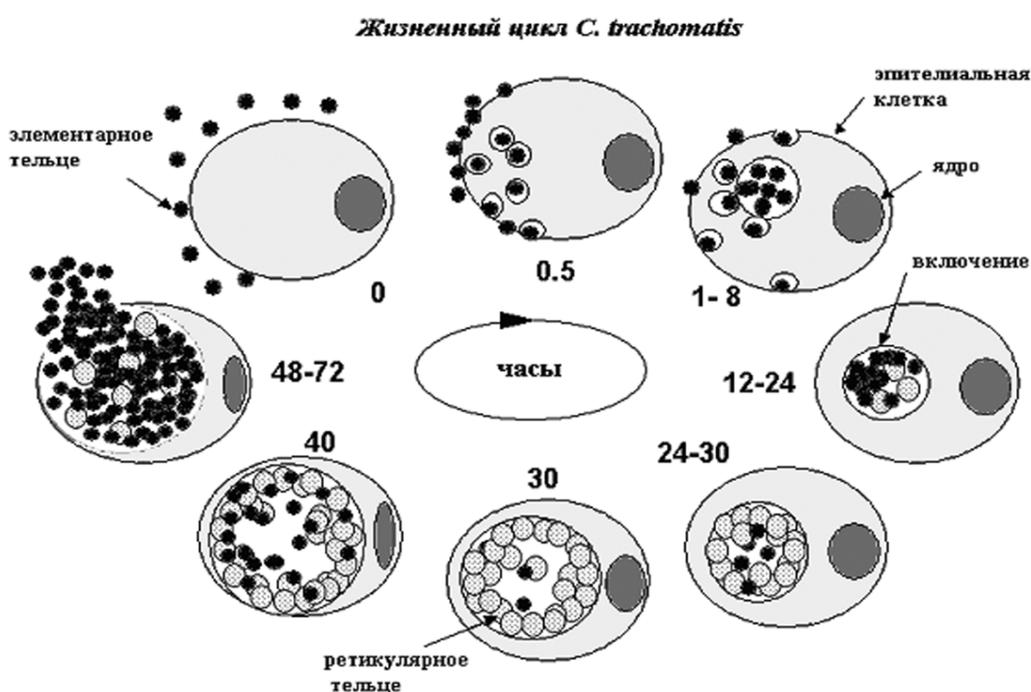


Рисунок 1.
Жизненный цикл *C. trachomatis*.

Как и для большинства внутриклеточных паразитов, основной задачей хламидий является создание и поддержание необходимых для собственного существования условий в ограниченном компартменте клетки-хозяина [9]. Хламидийное включение уникально среди всех известных паразитарных вакуолей [6]. Оно полностью исключается из процессов эндоцитоза на самых ранних стадиях инфекции и уже через два часа после ее начала не содержит маркеров ранних и поздних эндосом и лизосом, в отличие от *Coxiella* [10], *Salmonella* [11], *Mycobacterium* [12], *Ehrlichia* [13] и *Leishmania* [14]. Включение не обладает маркерами, предполагающими взаимодействия с эндоплазматическим ретикуломом, что характерно для *Legionella* [15] и *Brucella* [16]. Мембрана включения непроницаема для низкомолекулярных флуоресцентных маркеров, в отличие от вакуоли *Toxoplasma gondii* [17], его содержимое не закисляется [18], и концентрация ионов внутри включения и в цитоплазме клетки-хозяина одинакова [19].

На сегодняшний день известны только три хламидийных белка, обнаруживаемые в цитоплазме клетки-хозяина в процессе инфекции: к ним относятся СРАF [20] и два потенциальных эффектора системы секреции III типа у хламидий: вызывающий реорганизацию актина TARP (translocated actin-recruiting phosphoprotein) [21] и ССА00037, функции которого неизвестны [22]. Возможно, хламидийные белки транспортируются через мембрану включения в столь незначительных количествах, что современные методы детекции не позволяют регистрировать эти процессы. С другой стороны, хламидии активно модифицируют поверхность включения с помощью собственных белков. Эти белки привлекают внимание в качестве потенциальных медиаторов взаимодействия хламидий с эукариотической клеткой. Первые хламидийные белки в составе мембраны включения были обнаружены более десяти лет назад, с тех пор их число значительно увеличилось, в основном благодаря данным о хламидийных геномах - *C. trachomatis* [7, 23], *C. pneumoniae* [24-26], *C. psittaci* GPIC [27]. Однако более чем за десять лет пристального изучения функции хламидийных белков мембраны включения остаются загадкой.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА INC-БЕЛКОВ.

Первые белки мембраны включения (Inclusion membrane proteins, Inc-белки) были обнаружены в результате поиска хламидийных антигенов, присутствующих в зараженной *C. psittaci* культуре клеток, но не в ее элементарных тельцах [28]. Скрининг клонов экспрессирующей библиотеки *C. psittaci* позволил вывить три белка - IncA [29], IncB и IncC [30], для которых с помощью специфических поликлональных антител была показана локализация в мембране включения.

Обнаруженные белки значительно отличались по первичной структуре не только друг от друга, но и от каких-либо других известных белков, что не позволило сделать предположения об их функциях. Однако все три белка обладали явным сходством на уровне вторичной структуры – выраженным двудольным гидрофобным доменом, состоящим из 50-80 аминокислотных остатков (а.о.) [30]. После анализа генома *C. trachomatis* были найдены гомологи генов данных Inc-белков *C. psittaci*, причем для *incB* и *incC* было показано схожее расположение в геноме, в области начала репликации. Гомологи *incA* также были обнаружены у *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* [31, 32].

Дальнейший поиск белков мембраны включения с использованием сыворотки против мембранной фракции клеток HeLa, зараженных *C. trachomatis*, привел к выявлению еще четырех Inc-белков [33]. Эти белки, гены которых располагаются в одном опероне, получили названия IncD, IncE, IncF и IncG. Данные белки обладали характерным двудольным гидрофобным доменом, локализовались в мембране включения и отсутствовали в ЭТ. Их распределение в мембране включения через 18 часов после начала инфекции оказалось неравномерным – Inc-белки образовывали видимые скопления в зонах контакта мембраны включения с РТ, что было особенно характерно для IncF. Гомологи генов оперона D, E, F, G были обнаружены только в геноме *C. trachomatis* MoPn [24], и отсутствовали в геномах остальных хламидий [25-27].

На основе анализа последовательностей Inc-белков было сделано предположение, что наличие гидрофобного домена определяет их локализацию в мембране включения. Для проверки этой гипотезы были получены поликлональные антитела к шести Inc-подобным белкам *C. trachomatis*, выявленным в результате компьютерного анализа ее генома [32]. С помощью непрямой иммунофлуоресценции было показано, что пять из них располагаются в мембране включения, кроме белка D484. Его вторичная структура сходна с IncA, однако, гидрофобный профиль более выражен, чем у других Inc-подобных белков, что может объяснять локализацию D484 в РТ, а не в мембране хламидийного включения. Позднее с помощью непрямой иммунофлуоресценции было показано, что еще 16 Inc-подобных белков *C. trachomatis* так же локализуются в мембране включения [34].

Как минимум три Inc-белка *C. trachomatis* – IncA, IncF и IncG – связаны с поверхностью везикул, образующихся в области мембраны включения при воздействии на инфицированную хламидиями клетку азитромицином [35]. Данные везикулы содержат продукты деградации ретикулярных телец, образующиеся в результате их гибели. Сформировавшиеся везикулы отрываются от поверхности включения, перемещаются в цитоплазму инфицированной клетки, а затем к ее плазматической мембране, с дальнейшим высвобождением хламидийных антигенов во внеклеточное пространство. Образование подобных Inc-связанных везикул наблюдается и при физиологических условиях культивирования хламидий, хотя и в значительно меньших количествах. Было сделано предположение, что с помощью данного механизма может осуществляться доставка хламидийных антигенов, и в том числе Inc-белков, как в цитоплазму клетки-хозяина, так и во внеклеточное пространство.

Ещё один подход к поиску белков, связанных с мембраной включения, был предложен Sisko и соавторами в 2006 году. Авторы получили библиотеку дрожжевых клонов, экспрессирующих гены уникальных хламидийных белков. В число исследуемых генов входили *incA – incG*, а так же гены, кодирующие еще 26 Inc-подобных белков *C. trachomatis*. Затем библиотека анализировалась методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием кроличьей сыворотки против мембранной фракции эукариотических клеток, инфицированных *C. trachomatis* [36]. К удивлению авторов, данная сыворотка взаимодействовала только с тремя из известных Inc-белков, а именно IncA, IncD и IncE, а так же CT249, CT288 и CT813 [32]. Остальные Inc-белки не распознавались сывороткой, что может объясняться их меньшей иммуногенностью, либо значительно меньшим содержанием в составе мембраны включения.

Микроинъекции специфических антител против Inc-белков в инфицированные хламидиями клетки показали, что гидрофильные домены как минимум шести из них располагаются на цитоплазматической поверхности мембраны включения и теоретически могут взаимодействовать с белками клетки-хозяина – IncA *C. psittaci* [37], IncA, IncF, IncG *C. trachomatis* [38], а так же CT226 и CT229 *C. trachomatis* [9]. Кроме того, IncA *C. psittaci* и IncG *C. trachomatis* фосфорилируются киназами клетки-хозяина [37, 39], что характерно для белков, принимающих участие в каскадных путях передачи сигналов у эукариот.

2. ПОИСК ХЛАМИДИЙНЫХ БЕЛКОВ МЕМБРАНЫ ВКЛЮЧЕНИЯ *IN SILICO*.

Поскольку все известные белки мембраны включения характеризуются наличием двудольного гидрофобного домена, в 1999 году была предпринята попытка поиска генов, кодирующих белки, обладающие сходным гидрофобным профилем, с помощью компьютерного анализа всех известных геномных последовательностей хламидий [32]. В качестве критериев поиска использовали наличие двудольного гидрофобного домена размером не менее 50 аминокислотных остатков (а.о.). В геноме *C. trachomatis* были найдены 46 открытых рамок считывания (ОРС), а в геноме *C. pneumoniae* – 70 ОРС, отвечающих данным условиям, причем подобные гены отсутствовали в геномах других организмов. Гены, кодирующие Inc-подобные белки, оказались распределены в обоих геномах случайным образом, за исключением *incD-G* оперона и кластера из семи генов, расположенного рядом с генами аминокислотного и Na-зависимого транспортеров у *C. trachomatis* [32, 33]. По крайней мере для 22 генов, кодирующих Inc-подобные белки *C. trachomatis*, показано существование гомологов в геноме *C. pneumoniae*, остальные являются уникальными для каждого из видов. Кроме того, для *C. pneumoniae* характерно наличие нескольких копий генов, кодирующих Inc-подобные белки, в геноме. Например, для CT358 найдены три гомолога у *C. pneumoniae* - CPn367, CPn 369, CPn 370 [32].

В дальнейшем, анализ последовательностей Inc-белков, для которых подтвердили локализацию в мембране включения [32], привел к их разделению на

три типа согласно положению и структуре гидрофобного домена (рис. 2). У Inc-белков I типа гидрофобный домен расположен за 20-100 а.о. от N-конца молекулы, у II типа – приблизительно за 100 а.о. от С-конца, а белки III типа обладают несколькими гидрофобными доменами [40]. В следующей работе был произведен компьютерный поиск генов, кодирующих Inc-подобные белки, в четырех известных на тот момент хламидийных геномах с более жесткими критериями, чем в предыдущей работе [32] – размер гидрофобного домена не менее 55-65 а.о., его локализация либо в области 20-100 аминокислот от N-конца, либо за 100 а.о. до С-конца белка, а так же отсутствие классических сигнальных последовательностей и дополнительных гидрофобных доменов крупнее 20 аминокислот, не имеющих характерной двудольной структуры [40].

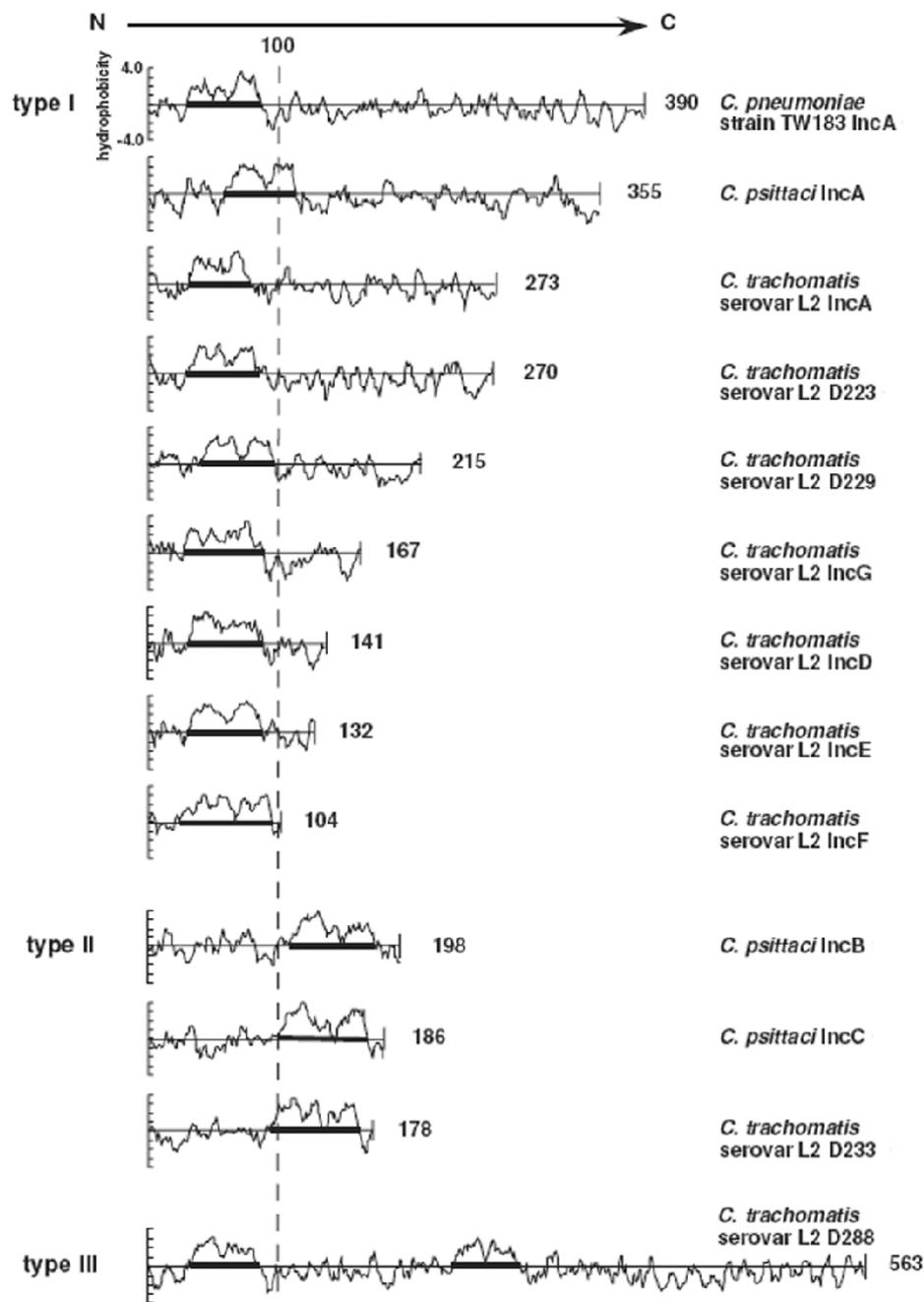


Рисунок 2.

Классификация Inc-белков, для которых подтверждена локализация в мембране хламидийных включений, согласно профилям гидрофобности (адаптировано из [40]).

БЕЛКИ МЕМБРАНЫ ВКЛЮЧЕНИЯ *CHLAMYDIACEAE*

В результате поиска в геноме *C. trachomatis* UW-3/Cx обнаружили 34 соответствующих заданным параметрам ОРС, в трех геномах *C. pneumoniae* [24-26] – 67 и 69 ОРС (табл. 1). Более того, в геномах *C. pneumoniae* было обнаружено от 14 до 17 гомологов генов Inc-подобных белков, которые лишены характерного гидрофобного домена (split-тип) либо утратили 20 N-концевых аминокислот перед ним (del-тип). Функции обнаруженных белков неизвестны, возможно, они представляют собой секретируемые формы Inc-белков. В общей сложности, в геноме *C. trachomatis* UW-3/Cx оказалось 36 генов Inc-подобных белков, а в геномах *C. pneumoniae* – от 90 до 93 (табл. 1). Аналогичный поиск во всех известных геномах – 48 эубактерий, 16 археобактерий, 6 эукариот – подтвердил абсолютную уникальность Inc-белков для хламидий [40].

Таблица 1. Общее число Inc-подобных ОРС в геномах *C. pneumoniae* J138, CWL029, AR39 и *C. trachomatis* D/UW-3/Cx (адаптировано из [40]).

Inc-подобные ОРС	<i>C. pneumoniae</i>			<i>C. trachomatis</i>
	J138	CWL029	AR39	D/UW-3/Cx
Тип I	61	61	59	29
Тип II	2	2	2	2
Тип III	6	6	6	3
Del-тип	6	7	9	2
Split-тип	15	17	14	0
Общее количество	90	93	90	36

3. ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ INC-БЕЛКИ ХЛАМИДИЙ.

Изучение экспрессии генов, кодирующих белки мембраны включения *C. trachomatis*, показало, что большая их часть, а именно 29, относятся к числу ранних [34], а экспрессия по крайней мере *incD*, *incE*, *incF*, *incG*, *CT228* и *CT229* начинается уже в течение первого часа после инфекции [41]. Вообще, на ранней фазе инфекции у хламидий начинается экспрессия генов, продукты которых по большей части вовлечены в основные клеточные процессы – репликацию, транскрипцию, трансляцию и процессинг белков, а так же обеспечивают транспорт макроэргических молекул и аминокислот из цитоплазмы клетки-хозяина (табл. 2). В то же время, на этом этапе развития инфекции хламидии активно модифицируют мембрану включения с целью блокировки слияния с лизосомами [34]. Исходя из этого, ранняя экспрессия генов, кодирующих белки мембраны включения, может служить доводом в пользу гипотезы об участии Inc-белков в процессах избегания взаимодействия хламидий с путем эндоцитоза.

Девять генов Inc-белков, в том числе *incA*, относятся к средней фазе инфекции, наравне с генами белков, вовлеченных в процессы гликолиза и пентозофосфатного пути, синтеза МОМР, пептидогликана и липополисахарида, а так же структурных компонентов системы III типа секреции. На поздней фазе инфекции начинается экспрессия генов, продукты которых принимают участие в формировании плотной наружной мембраны ЭТ – (цистеин-богатые белки, взаимодействующие с МОМР, тиол-редуктазы и тиоредоксин-дисульфидизомеразы), а так же генов нескольких белков с неизвестной функцией, в том числе Inc-подобного белка CT850 (табл. 2) [34, 41].

Таблица 2. Немедленно-ранние и поздние гены *C. trachomatis* D/UW-3/Cx (адаптировано из [41]).

ОРС	Ген	Функция	ОРС	Ген	Функция
Немедленно-ранние гены			Поздние гены		
CT035	<i>bpI</i>	Биотин-протеин лигаза	CT046	<i>hctB</i>	Гистон-подобный белок 2
CT065	<i>nptI</i>	ADP/ATP трансфераза	CT080	<i>hctB</i>	Белок поздней транскрипции В
CT110	<i>groE_L</i>	Шаперонин (60 кДа)	CT214	-	неизвестна
CT111	<i>groES</i>	Шаперонин (10 кДа)	CT356	<i>yyaL</i>	Мультидоменный белок
CT115	<i>incD</i>	Белок мембраны включения	CT443	<i>omcB</i>	Цистеин-богатый белок (60 кДа)
CT116	<i>incE</i>	Белок мембраны включения	CT444	<i>omcA</i>	Цистеин-богатый белок (9 кДа)
CT117	<i>incF</i>	Белок мембраны включения	CT546	-	Белок наружной мембраны
CT118	<i>incG</i>	Белок мембраны включения	CT565	-	неизвестна
CT133	<i>rrm</i>	метилаза	CT576	<i>hctH.1</i>	Шаперон ССТГ
CT147	-	ЕЕА-1-подобный белок	CT578	-	неизвестна
CT228	-	Белок мембраны включения	CT579	-	неизвестна
CT229	-	Белок мембраны включения	CT659	-	ДНК-связывающий белок
CT288	-	неизвестна	CT660	<i>gyrA.2</i>	субъединица А ДНК-гиразы 2
CT365	-	неизвестна	CT694	-	неизвестна
CT375	<i>aad</i>	Дегидрогеназа D-аминокислот	CT712	-	неизвестна
CT376	<i>adhC</i>	Малая дегидрогеназа	CT743	<i>hctA</i>	Гистон-подобный белок 1
CT446	<i>avo</i>	ДНК-связывающий белок	CT780	-	Тиоредоксин дисульфид изомераза
CT473	<i>yidD</i>	A-гемолитин	CT783	-	Тиоредоксин дисульфид изомераза
CT474	-	неизвестна	CT798	<i>glgA</i>	Гликогенсинтетаза
CT480	<i>oppA₄</i>	Опигонептид-пермеаза	CT814	-	неизвестна
CT495	<i>npt2</i>	Транспортер NTP	CT814.1	-	неизвестна
CT529	-	неизвестна	CT847	-	неизвестна
CT648	-	неизвестна	CT867	<i>mtpA</i>	Мембранная тирозин протеаза
CT734	-	неизвестна	CT868	<i>mtpB</i>	Мембранная тирозин протеаза
CT735	<i>degA</i>	D-амино-глицерин пермеаза	CT871	<i>rtmG</i>	Полиморфный мембранный белок
CT774	<i>cysQ</i>	Бифосфат фосфатаза	CT872	<i>rtmH</i>	Полиморфный мембранный белок
CT795	-	неизвестна			
CT850	-	неизвестна			

Таким образом, различные сроки начала экспрессии генов, кодирующих Inc-подобные белки, могут свидетельствовать об их значимости для развития хламидийной инфекции, а так же о возможной специфичности выполняемых ими функций на определенных этапах жизненного цикла. Nicholson и соавторы показали, что экспрессия всех исследуемых генов, кодирующих Inc-подобные белки, вне зависимости от сроков её начала, быстро достигает конститутивного

уровня и не меняется вплоть до завершения жизненного цикла хламидий. Только для *incC* показаны колебания уровня экспрессии на ранних этапах хламидийной инфекции, что может свидетельствовать о его участии в регуляторных процессах [42].

4. СВЯЗЬ INC-БЕЛКОВ С СИСТЕМОЙ СЕКРЕЦИИ III ТИПА.

Обнаружение Inc-белков в мембране хламидийного включения поставило перед исследователями вопрос о механизме, обеспечивающем их транспортировку из ретикулярных телец. Отсутствие у Inc-белков канонических сигнальных последовательностей для встраивания в мембрану включения привело к возникновению гипотезы о возможном использовании хламидиями для этой цели системы секреции III типа (ССТТ) [43].

Впервые наличие генов, кодирующих белки ССТТ, у *C. psittaci* было показано в 1997 году [44], что позволило предположить возможность существования у хламидий полноценного секреторного аппарата для транспорта хламидийных белков в цитоплазму клетки-хозяина [45]. Действительно, в геномах *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* присутствуют гомологи генов, кодирующих практически все белки, необходимые для формирования аппарата секреции (рис. 3) [7, 25]. Однако, их расположение в геноме значительно отличается от характерного для всех других бактерий, обладающих ССТТ [45]. Транскрипционный анализ показал, что большая часть генов, предположительно кодирующих белки ССТТ у хламидий, относится к группе генов средней фазы инфекции, то есть сборка аппарата ССТТ *de novo* возможна только на поздних стадиях инфекции [34, 43, 46]. Однако, присутствие белков, формирующих секреторную пору в элементарных тельцах и в ретикулярных тельцах с первых часов после инфекции, позволяет предположить существование функционально активного аппарата ССТТ на всех этапах жизненного цикла хламидий [46].

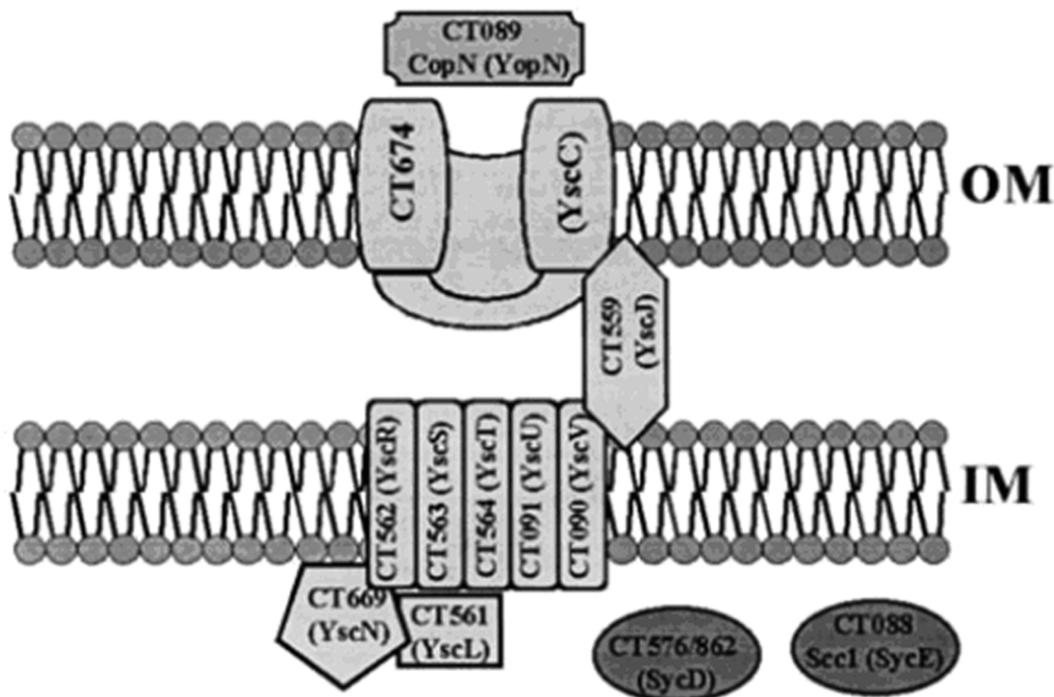


Рисунок 3.

Предполагаемая структура аппарата ССТТ у хламидий (адаптировано из [57]).

Поскольку контакт с мембраной эукариотической клетки является одним из обязательных условий секреции, ССТТ может быть востребована хламидиями на двух этапах жизненного цикла – при проникновении в клетку и при секреции хламидийных белков через мембрану включения [22]. Поиск белков-эффекторов ССТТ у хламидий оказался достаточно сложной задачей. Структурные белки аппарата ССТТ у различных бактерий характеризуются высокой консервативностью, но секретируемые белки отличаются значительным разнообразием и не обладают характерными сигнальными последовательностями [47]. Предполагается, что секреция осуществляется с помощью цитоплазматических шаперонов [48] и/или с помощью сигнальной последовательности, которая кодируется в 3'-области мРНК эффектора [49, 50]. Поэтому для хламидий были предложены два пути поиска белков-эффекторов [43]. Во-первых, по аналогии с другими бактериями, в числе секретируемых могли оказаться белки, гены которых расположены внутри или неподалеку от субкластеров генов ССТТ в хламидийном геноме. Во-вторых, эффекторы могли быть обнаружены среди уникальных хламидийных белков, в том числе принадлежащих семейству Inc.

К сожалению, доказать наличие собственной секреции хламидиями белков-эффекторов в эукариотическую клетку оказалось невозможным, что может быть объяснено крайне низкими концентрациями секретируемых субстратов. Однако для других бактерий была показана возможность гетерологичной секреции эффекторов ССТТ [51-53]. Поэтому для подтверждения гипотезы о возможной принадлежности Inc-белков к числу эффекторов ССТТ в качестве модельного организма была выбрана *Shigella flexneri*. Для этого были получены рекомбинантные экспрессирующие конструкции, содержащие 5'-участки генов *incA*, *incB* и *incC* *S. pneumoniae*, не захватывающие гидрофобный домен и ген *суа*, кодирующий кальмодулин-зависимую аденилатциклазу *Bordetella pertussis*. Полученными конструкциями трансформировали *S. flexneri*, наличие составных белков, получивших названия IncA/суа, IncB/суа и IncC/суа, в ростовой среде выявляли с использованием антител к аденилатциклазе [54]. Секреция химерных белков IncB/суа и IncC/суа наблюдалась при стандартных условиях, секрецию IncA/суа удалось получить только при использовании мутантного штамма *S. flexneri ipaB*, характеризующегося нерегулируемой секрецией [55]. Вероятно, при использовании штамма *S. flexneri* дикого типа, уровень секреции IncA/суа оказался слишком низким для детекции. Это может объясняться отличиями во вторичной структуре исследуемых Inc-белков, поскольку у IncB и IncC *S. pneumoniae* гидрофобный домен располагается на С-конце, а у IncA – на N-конце молекулы.

Помимо IncA, IncB и IncC были исследованы пять случайным образом выбранных Inc-подобных белков *S. pneumoniae*, а именно CPn026, CPn146, CPn308, CPn367, CPn585. Три из них, CPn026, CPn308 и CPn367, секретируются мутантным штаммом *S. flexneri ipaB*, хотя и в меньших количествах, чем собственный эффектор *S. flexneri* (5%, 50% и менее 1% от общего содержания химеры в клетках и ростовой среде). Гидрофобные домены этих Inc-белков также располагаются на N-конце белка. Попытки секреции полноразмерных Inc-белков *S. pneumoniae* окончились неудачей, что может быть следствием их нерастворимости при экспрессии в гетерологичных системах. Возможно, хламидии используют специальные шапероны, обеспечивающие растворимость Inc-белков при секреции [54].

Для IncC *S. trachomatis* была показана возможность секреции с помощью ССТТ *Yersinia pseudotuberculosis* в виде составного белка, состоящего из аминокотерминального фрагмента IncC и неомицинфосфотрансферазы [46]. В более поздних работах, направленных на поиск потенциальных белков-эффекторов у хламидий, IncA, IncB и IncC *S. pneumoniae* использовались в качестве положительного контроля, подтверждающего факт гетерологичной секреции хламидийных белков в выбранной модельной системе [22]. Весомым аргументом в пользу гипотезы о принадлежности Inc-белков к числу эффекторов ССТТ у

хламидий может считаться наблюдение, что под воздействием ингибитора секреции III типа INP04000 нарушается распределение IncA и IncG *C. trachomatis* в мембране включения, а так же частично блокируются биологические функции данных белков [56]. В настоящее время так же показана возможность секреции в гетерологичных системах большого числа хламидийных белков, не относящихся к Inc-семейству [57-59], причем два из них – Tarp (translocated actin-recruiting phosphoprotein) *C. trachomatis* и ССА 00037 *C. psittaci* были обнаружены непосредственно в цитоплазме инфицированных клеток [21, 22].

5. ЛОКАЛИЗАЦИЯ INC-БЕЛКОВ ПРИ ЭКСПРЕССИИ КОДИРУЮЩИХ ИХ ГЕНОВ В ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКЕ.

Одним из подходов, предложенных для определения функции Inc-белков хламидий, стало изучение их локализации при эндогенной экспрессии кодирующих их генов в эукариотической клетке. Применение данного метода на практике осложнялось нерастворимостью полноразмерных Inc-белков и их токсичностью для клетки в гетерологических системах, в том числе и в виде составных белков [22, 32, 46, 60, 61].

В результате экспрессии рекомбинантных конструкций, кодирующих пять Inc-белков *C. trachomatis* в виде слитых с GFP (green fluorescent protein) белков в клетках линии HeLa было показано, что их локализация может различаться в зависимости от расположения молекулы GFP [62]. В случае карбокситерминального расположения GFP слитый с IncC белок формировал гранулы в цитоплазме клетки, а в случае аминотерминального расположения GFP слитый белок практически полностью локализовался в области плазматической мембраны клетки, четко прорисовывая все поверхностные образования клетки (рис. 4). Для слитых белков IncE-GFP и GFP-IncE так же наблюдалась различная клеточная локализация. Слитый белок IncE-GFP гомогенно распределялся по всей клетке, включая ядро, подобно свободному GFP. Слитый белок GFP-IncE образовывал скопления преимущественно в полярной околоядерной области, что может свидетельствовать о его взаимодействии с какими-либо клеточными органеллами, находящимися в этой области, в частности, с аппаратом Гольджи. Локализация слитых с IncA, IncB и IncF белков не зависела от расположения молекулы GFP. При этом слитые с IncA белки локализовались в клетках в виде гранул различной величины, равномерно распределенных по всей цитоплазме, в то время как составные белки с IncB и IncF связывались с мембранными структурами клетки.

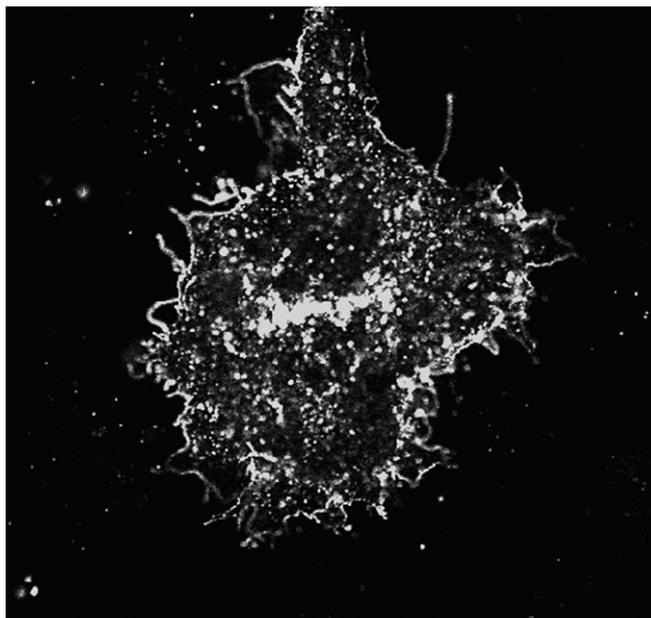


Рисунок 4.

Локализация составного белка GFP-IncC в клетке линии HeLa [62].

В работе, посвящённой изучению влияния экспрессии хламидий-специфических белков на клеточные процессы у *Saccharomyces cerevisiae*, в числе прочих были исследованы 33 Inc и Inc-подобных белка [36]. Было показано, что шесть из них, а именно IncE, СТ618, СТ179, СТ192, СТ813 и СТ837, могут приводить к существенным нарушениям роста дрожжевых клеток. Кроме того, оказалось, что связывание гидрофильных доменов Inc-белков с поверхностью дрожжевых эндосом повышает токсичность некоторых из них для дрожжей. При изучении локализации Inc и Inc-подобных белков в дрожжевых клетках не было обнаружено их тропности к каким-либо органеллам. Только один из исследуемых Inc-подобных белков демонстрировал специфическую локализацию. Химерный белок, состоящий из гидрофильного домена Inc-подобного белка СТ005 и GFP оказался нуклеотропным, а при экспрессии соответствующей рекомбинантной конструкции в зараженных хламидиями клетках линии Her2 данный составной белок располагался в области мембраны включения. Возможно, при развитии хламидийной инфекции гидрофильный домен СТ005 отделяется от гидрофобного и перемещается в ядро, либо полноразмерный СТ005 в составе мембраны включения взаимодействует с каким-либо белком, предназначенным для транспорта в ядро клетки-хозяина.

Столь незначительное влияние экспрессии генов, кодирующих Inc и Inc-подобные белки, на клеточные процессы у дрожжей по сравнению с генами других хламидий-специфических белков может свидетельствовать о их принадлежности к белковым комплексам, выполняющим функцию, которая не может проявляться в обычной эукариотической клетке в отсутствие хламидийной инфекции (например, транспорт через мембрану включения, поддержание ее стабильности), либо не является консервативной у дрожжей [36].

6. IncA.

IncA является первым из обнаруженных белков мембраны включения [29]. Белок располагается в мембране включения и может распознаваться сыворотками крови людей и приматов, выздоравливающих после хламидийной инфекции [31]. У *C. psittaci* GPIC IncA присутствует в РТ в виде белка массой 39 кДа, в то время как две дополнительные формы белка, с более высокими молекулярными массами, обнаруживаются в лизатах зараженных эукариотических клеток [37], что свидетельствует о его посттрансляционной модификации. Было показано, что данный белок подвергается фосфорилированию киназами клетки-хозяина, причем не только в процессе развития хламидийной инфекции, но и при эндогенной экспрессии *incA* в эукариотических клетках.

Хотя гомология между IncA *C. trachomatis*, IncA *C. pneumoniae* и IncA *C. psittaci* не превышает 20%, третичные структуры данных белков подобны друг другу. Было показано, что карбокситерминальные домены трех перечисленных белков могут формировать спиральные структуры, способные принимать участие в белок-белковых взаимодействиях [63]. Обработка инфицированных хламидиями культур клеток дитио-бис-сукцинимидилпропионатом, “сшивающим” взаимодействующие белки за счет формирования дисульфидных связей, показала способность IncA *C. psittaci* и *C. trachomatis* образовывать высокомолекулярные комплексы (37-75-150 кДа для *C. psittaci* и 42-90-180 кДа для *C. trachomatis*), чувствительные к β-меркаптоэтанолу. Аналогичная картина наблюдалась и при экспрессии *incA* в эукариотической клетке, то есть образующиеся комплексы представляют собой гомодимеры и гомотетрамеры, для формирования которых не требуются дополнительные хламидийные белки.

Анализ последовательности IncA показал сходство данного белка со SNARE (Soluble NSF-sensitive attachment receptor) доменом белкового комплекса, ответственного за слияние мембранных структур у эукариот [64]. Отличительной особенностью SNARE-домена является консервативная семичленная аминокислотная последовательность, формирующая спираль с глутамином или аргинином в центре комплекса. IncA *C. psittaci* обладает так называемой

"лейциновой застёжкой" из 140-178 аминокислотных остатков, состоящей из шести семичленных повторов, где в первой позиции находится лейцин, а в четвёртой – другая гидрофобная аминокислота, исключая глутамин в центре домена. Аналогичной структурой обладает IncA *C. trachomatis*. Таким образом, четыре молекулы IncA могут формировать тетрамерную структуру, подобную SNARE-комплексу. Предполагаемая структура обладает значительной стабильностью, даже превышающей таковую у известных SNARE-комплексов. При этом не исключено, что IncA может взаимодействовать с собственными SNARE-комплексами эукариотической клетки [63].

Известно, что для *C. trachomatis* характерно образование единого включения даже при высокой множественности заражения клетки. Это является результатом слияния первично образующихся включений в единую вакуоль через несколько часов после заражения [65, 66], причем данный процесс нарушается при понижении температуры [67]. Микроинъекции антител к карбокситерминальным доменам IncF и IncG не влияют на формирование включения, в то время как микроинъекция антител к IncA *C. trachomatis* в клетки с высокой множественностью инфекции приводит к образованию многодольного включения [38]. Данная структура напоминает включения *C. psittaci* штамма GPIC [68], не способного образовывать единое включение даже при заражении клетки единичным ЭТ.

Экспрессия *incA* у *C. trachomatis* детектируется через 10 часов после начала инфекции, а присутствие IncA в мембране включения отмечается через 11 часов после начала инфекции, что совпадает по срокам с процессом слияния везикул в единое включение, который происходит в период от 10 до 18-24 часов после заражения. Дальнейшее изучение роли IncA в формировании единого включения показало, что ингибирование слияния при понижении температуры культивирования до 32°C коррелирует с нарушением экспорта синтезируемого IncA из РТ в мембрану включения [69]. Однако, при увеличении времени эксперимента оказалось, что понижение температуры только откладывает, но не полностью предотвращает экспорт IncA в мембрану включения и слияние индивидуальных везикул.

В результате исследования клинических изолятов *C. trachomatis* с использованием флуоресцентной микроскопии с помощью видо- и серовар-специфических моноклональных антител были обнаружены изоляты, отличающиеся неспособностью к слиянию индивидуальных включений в одно единое при стандартных условиях культивирования [70]. Иммунофлуоресцентный анализ с использованием антител к IncA показал отсутствие этого белка в мембране включения у большинства из неспособных к слиянию мутантов. Оказалось, что данные изоляты *C. trachomatis* действительно не в состоянии продуцировать полноценный белок из-за нарушения целостности гена *incA*. Поскольку ранее было показано существование не способных к формированию единого включения изолятов, обладающих полноценным геном *incA* [71, 72], был сделан вывод, что наличие интактного гена *incA* является важным, но не единственным фактором, обеспечивающим слияние включений у *C. trachomatis*. Попытки связать наличие данного мутантного фенотипа клинических изолятов с бессимптомным течением заболевания у женщин и снижением числа формирующихся включений привели к получению противоречивых данных [73, 74], что может объясняться крайне низкой частотой встречаемости не способных к формированию единого включения изолятов *C. trachomatis* в исследуемых популяциях.

При гетерологичной экспрессии в эукариотических клетках IncA *C. trachomatis* и *C. psittaci* локализуется в эндоплазматическом ретикулуме, что было подтверждено путем колокализации данного белка с калнексинном. Предполагается, что связь IncA с эндоплазматическим ретикулумом возникает в результате котрансляционной ассоциации, либо за счет тропности белка к липидам

и/или белкам эндоплазматического ретикулума [63]. Дальнейший анализ показал, что делеция 53 аминотерминальных аминокислот не влияет на распределение IncA в эукариотической клетке, делеция 118 аминотерминальных аминокислот, включающих в себя гидрофобный домен, приводит к перемещению Inc-белка в цитоплазму, а при делеции 135 карбокситерминальных аминокислот он обнаруживается как в эндоплазматическом ретикулуме, так и в плазматической мембране. На основе этого был сделан вывод, что гидрофобный домен IncA отвечает за локализацию белка в мембранных структурах клетки, а карбокситерминальный домен – именно за связь с эндоплазматическим ретикулумом.

При заражении эукариотических клеток, экспрессирующих *incA*, как *C. trachomatis*, так и *C. psittaci*, успешно проникали в клетку, но не размножались. С течением времени зараженные трансфицированные клетки гибли, что может объясняться слиянием незрелых включений с эндоплазматическим ретикулумом в результате IncA-IncA взаимодействия [63]. Мутационный анализ показал, что делеция 53 аминотерминальных аминокислот не влияет на наблюдаемый эффект, а собственный гидрофобный домен IncA может быть заменен на трансмембранный белок NS5B вируса гепатита В, обладающий тропностью к эндоплазматическому ретикулуму. И только отсутствие 118 карбокситерминальных аминокислот снимает эффект ингибирования размножения хламидий.

Однако, Alzhanov с соавторами лишь частично согласны с результатами данной работы [75]. Согласно их данным, при экспрессии кодирующего его гена, IncA *C. psittaci* равномерно распределяется в цитоплазме клетки, не вызывая заметных морфологических изменений. Экспрессия *incA* блокирует развитие *C. psittaci*, причем даже если включение образуется, то его морфология изменена – индивидуальные везикулы не образуют характерную плотную группу, содержащиеся в них РТ увеличены в размере, и их количество снижено. Мутационный анализ IncA показал, что для достижения данного эффекта важно наличие Ser17, по которому происходит фосфорилирование [37]. Экспрессия *incA* *C. psittaci* так же приводит к снижению числа включений при инфекции *C. trachomatis*, но не нарушает их морфологию. Однако, экспрессия *incA* *C. trachomatis* не приводит к ингибированию развития инфекции *C. trachomatis* [75].

7. INCG.

В поисках возможных партнеров Inc-белков Scidmore и соавторы провели скрининг кДНК библиотеки *C. trachomatis* с помощью двугибридной системы дрожжей [39]. В качестве "наживки" был использован карбокситерминальный домен IncG, для которого ранее была показана локализация на цитоплазматической поверхности включения [38]. В результате были отобраны два клон, содержащие полный кодирующий регион гена 14-3-3β, причем с обоими клонами взаимодействовали как карбокситерминальный домен IncG, так и полноразмерный белок.

14-3-3β является представителем семейства высококонсервативных димер-образующих фосфосерин-связывающих белков, которые присутствуют у множества эукариот – млекопитающих, растений, грибов [76]. Данные белки вовлечены в ряд путей передачи сигнала, причем за счет образования гомодимеров они могут одновременно взаимодействовать с двумя различными лигандами, образуя между ними "мостик". 14-3-3β может связывать такие белки, как Raf-1 [77, 78], протеинкиназа С [79] и триптофангидроксилаза [80]. Взаимодействуя с лигандами, он приводит к их перераспределению между цитоплазмой, ядром и митохондриями, а так же принимает участие в процессах везикулярного транспорта, поскольку способен комплементировать отсутствие тяжелой цепи клатрина у дрожжевых мутантов [81].

Анализ последовательности IncG показал наличие трех потенциальных сайтов связывания, характерных для белков, взаимодействующих с представителями семейства 14-3-3β. Два из них располагаются в карбокситерминальной области белка, которая и обеспечивает взаимодействие

с 14-3-3β. Мутационный анализ потенциальных сайтов связывания (Ser164→Ala, Ser166→Ala) показал, что и Ser164, и Ser166 вовлечены во взаимодействие с 14-3-3β. При этом наличие фосфорилированного Ser166 является необходимым условием, а Ser164 не фосфорилируется и, скорее всего, принимает участие в стабилизации комплекса [39].

Изучение локализации 14-3-3β в культурах клеток, инфицированных сероварами *C. trachomatis* A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2 и L3, показало, что данный белок обнаруживается в области мембраны включения и колокализуется с IncG. При этом в культурах клеток, инфицированных *C. pneumoniae*, *C. psittaci* и *C. trachomatis* MoPn, не наблюдалось локализации 14-3-3β в области мембраны включения. Полученные данные подтверждают *in vivo* взаимодействие IncG с 14-3-3β, поскольку IncG обнаружен только у *C. trachomatis* и отсутствует у *C. pneumoniae* и *C. psittaci*, а у *C. trachomatis* MoPn его последовательность значительно изменена [39].

Связь IncG и 14-3-3β может быть подтверждением того факта, что несмотря на схожесть в биологии, взаимодействие представителей различных видов хламидий с эукариотической клеткой может происходить по-разному.

8. CT229.

Еще в 2003 году Rzomp и соавторы показали, что несколько белков, принадлежащих семейству Rab GTPаз, локализуются в области мембраны включения [82]. У млекопитающих белки этого семейства принимают участие в регуляции процессов везикулярного транспорта. Поскольку каждая из Rab GTPаз является специфичной к выполняемой функции в клетке, было сделано предположение, что различные Rab GTPазы могут взаимодействовать с различными белками на поверхности мембраны включения. С целью поиска возможных партнеров Rab4A GTPазы был проведен скрининг среди Inc-подобных белков *C. trachomatis* с помощью дрожжевой двугибридной системы [61]. Из 27 белков, включенных в исследование, только CT229 взаимодействовал с Rab4A. Для подтверждения полученного результата проверяли взаимодействие составных белков GFP-Rab4A и RFP-CT229 при экспрессии кодирующих их генов в клетках линии HeLa, а так же определяли локализацию GFP-Rab4A в клетках, инфицированных *C. trachomatis*. Оказалось, что данный составной белок колокализуется с CT229 и IncG на поверхности мембраны включения, причем для данного взаимодействия необходимо наличие GTP-связывающего домена.

CT229 относится к числу белков ранней фазы инфекции. Экспрессия гена начинается в течение первого часа после инфекции [41]. Кроме того, микроинъекция антител, полученных против 15 карбокситерминальных аминокислот CT229, ингибирует развитие *C. trachomatis* серовара L2 в клетках линии HeLa, что подтверждает значимость функции этого белка для хламидийной инфекции. Rzomp и соавторы предположили, что взаимодействие CT229 и Rab4A может играть роль при перемещении хламидийного включения в перинуклеарную область, поскольку одним из эффекторов Rab4A является динеин [83, 84]. Внимание привлек тот факт, что гомолог CT229 отсутствует в геноме *C. pneumoniae* [25], однако Rab4A GTPазы все равно локализуется в области ее мембраны включения [82]. Вероятно, *C. pneumoniae* обладает неким функциональным гомологом CT229, возможно даже из числа Inc-подобных белков [61].

9. БЕЛКИ МЕМБРАНЫ ВКЛЮЧЕНИЯ ХЛАМИДИЙ, НЕ ПРИНАДЛЕЖАЩИЕ СЕМЕЙСТВУ INC.

Большая часть белков, локализующихся в мембране включения, относится к семейству Inc-белков. Кроме них в мембране включения были обнаружены несколько белков, не обладающих характерным двудольным гидрофобным доменом.

Два из них, CopN и Cap1, входят в число хламидийных белков, секретлируемых гетерологичными ССТТ [57, 22]. Возможно, ССТТ хламидий может обеспечивать перемещение данных белков в область мембраны включения [70]. Предполагается, что CopN, гомологичный YopN *Yersinia*, играет роль

периферического регулятора аппарата ССТТ, предотвращающего секрецию в отсутствие подтверждающего сигнала со стороны клетки-хозяина [57]. Функция Cap1 неизвестна, однако, он может служить протективным антигеном в модельной системе хламидийной инфекции у мышей [85].

Еще один белок, локализующийся в области мембраны включения, СТ147, был обнаружен в результате анализа белков немедленно-ранней фазы инфекции *C. trachomatis* [41]. Этот уникальный хламидийный белок характеризуется значительной степенью гомологии с EEA1 (human early endosomal antigen 1), вовлеченным в процессы перемещения и слияния эндосом в клетках млекопитающих [86, 87].

Кроме того, по данным Sisko с соавторами, к числу белков, связанных с мембраной включения *C. trachomatis*, относятся СТ668 и СТ670, принадлежащие к кластеру генов ССТТ, протеазы CPAF, СТ113, СТ344, вызывающих деградацию транскрипционных факторов клетки [20, 88] и еще три белка, функция которых неизвестна - СТ472, СТ049 и СТ050. С использованием флуоресцентной микроскопии было подтверждено, что по крайней мере один из них - СТ050 - действительно располагается в мембране включения в области ее контакта с РТ [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Первые хламидийные белки в составе мембраны включения были обнаружены в начале девяностых годов [29, 30, 33], с тех пор их число значительно увеличилось, в основном благодаря расшифровке нескольких хламидийных геномов. Спустя десять лет пристального изучения, функции белков мембраны включения остаются загадкой. На долю генов, кодирующих Inc-белки, приходится более 12% ОРС *C. trachomatis* и 18% ОРС *C. pneumoniae*; данные белки располагаются на поверхности мембраны включения, обладают предполагаемыми трансмембранными доменами, могут модифицироваться ферментами клетки-хозяина и являются потенциальными эффекторами ССТТ. Кодирующие их гены экспрессируются на всех этапах внутриклеточного существования хламидий, но в большинстве своем – на ранней фазе инфекции. На основании этого вполне логичным и обоснованным выглядит предположение, что именно Inc-белки играют ключевую роль во взаимодействии хламидий с эукариотической клеткой. При этом на сегодняшний день только для трех из них показаны биологические функции – IncA принимает участие в процессах формирования единого включения у *C. trachomatis* и ингибирует развитие инфекции при эндогенной экспрессии кодирующего его гена в эукариотической клетке, IncG взаимодействует с эукариотическим белком 14-3-3 β , СТ229 связывается с Rab4A GTPазой. Функции других Inc-белков остаются неизвестными и продолжают интриговать исследователей недоступностью своей расшифровки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hackstadt T. (1998) Curr. Opin. Microbiol., **1**, 82–87.
2. Hackstadt T. (2000) Traffic., **1**, 93–99.
3. Salcedo S.P., Holden D.W. (2005) Curr. Opin. Microbiol., **8**, 92–98.
4. Peeleng R.W., Brunham R.C. (1996) Emerg. Infect. Dis., **2**, 307-319.
5. Schachter J. (1999) Sex Transm. Dis., **26**, 279-280.
6. Moulder J.W. (1991). Microbiol. Rev., **55**, 143–190.
7. Stephens R.S., Kalman S., Lammel C., Fan J., Marathe R., Aravind L., Mitchell W., Olinger L., Tatusov R.L., Zhao Q., Koonin E.V., Davis R.W. (1998) Science, **282**, 754–759.
8. Wyrick P.B. (2000) Cell. Microbiol., **2**, 275-282.
9. Fields K.A., Hackstadt T. (2002) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **18**, 221–245.
10. Heinzen R.A., Scidmore M.A., Rockey D.D., Hackstadt T. (1996) Infect. Immun., **64**, 796–809.

БЕЛКИ МЕМБРАНЫ ВКЛЮЧЕНИЯ *CHLAMYDIACEAE*

11. *Garcia-del Portillo F., Zwick M.B., Leung K.Y., Finlay B.B.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10544–10548.
12. *Sturgill-Koszycki S., Schaible U.E., Russell D.G.* (1996) *EMBO J.*, **15**, 6960–6968.
13. *Mott J., Barnewall R.E., Rikihisa Y.* (1999) *Infect. Immun.*, **67**, 1368–1378.
14. *Lang T., Hellio R., Kaye P.M., Antoine J.C.* (1994) *J. Cell Sci.*, **107**, 2137–2150.
15. *Swanson M.S., Isberg R.R.* (1995) *Infect. Immun.*, **63**, 3609–3620.
16. *Pizarro-Cerda J., Meresse S., Parton R.G., van der Goot G., Sola-Landa A., Lopez-Goni I., Moreno E., Gorvel J.P.* (1998) *Infect. Immun.*, **66**, 5711–5724.
17. *Heinzen R. A., Hackstadt T.* (1997) *Infect. Immun.*, **65**, 1088–1094.
18. *Griehaber S., Swanson J.A., Hackstadt T.* (2002) *Cell. Microbiol.*, **4**, 273–284.
19. *Kiviat N.B., Paavonen J.A., Brockway J., Critchlow C.W., Brunham R.C., Stevens C.E., Stamm W.E., Kuo C.C., DeRouen T., Holmes K.K.* (1985) *JAMA*, **253**, 989–996.
20. *Zhong G., Fan P., Ji H., Dong F., Huang Y.* (2001) *J. Exp. Med.*, **193**, 935–942.
21. *Clifton D.R., Fields K.A., Griehaber S.S., Dooley C.A., Fischer E.R., Mead D.J., Carabeo R.A., Hackstadt T.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10166–10171.
22. *Subtil A., Deievoye C., Balana M.-E., Tastevin L., Perrinet S., Dautry-Varsat A.* (2005) *Mol. Microbiol.*, **56**, 1636–1647.
23. *Carlson J.H., Porcella S.F., McClarty G., Caldwell H.D.* (2005) *Infect. Immun.*, **73**, 6407–6418.
24. *Read T.D., Brunham R.C., Shen C., Gill S.R., Heidelberg J.F., White O.* (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1397–1406.
25. *Kalman S., Mitchell W., Marathe R., Lammel C., Fan J., Hyman R.W., Olinger L., Grimwood J., Davis R.W., Stephens R.S.* (1999) *Nat. Genet.*, **21**, 385–389.
26. *Shirai M., Hirakawa H., Kimoto M., Tabuchi M., Kishi F., Ouchi K., Shiba T., Ishii K., Hattori M., Kuhara S., Nakazawa T.* (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2311–2314.
27. *Read T.D., Myers G.S., Brunham R.C., Nelson W.C., Paulsen I.T., Heidelberg J., Holtzapple E., Khouri H., Federova N.B., Carty H.A., Umayam L.A., Haft D.H., Peterson J., Beanan M.J., White O., Salzberg S.L., Hsia R.C., McClarty G., Rank R.G., Bavoil P.M., Fraser C.M.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2134–2147.
28. *Rockey D.D., Rosquist J.L.* (1994) *Infect. Immun.*, **62**, 106–112.
29. *Rockey D.D., Heinzen R.A., Hackstadt T.* (1995) *Mol. Microbiol.*, **15**, 617–626.
30. *Bannantine J.P., Rockey D.D., Hackstadt T.* (1998) *Mol. Microbiol.*, **28**, 1017–1026.
31. *Bannantine J.P., Stamm W.E., Suchland R.J., Rockey D.D.* (1998). *Infect. Immun.*, **66**, 6017–6021.
32. *Bannantine J.P., Griffiths R.S., Viratyosin W., Brown W.J., Rockey D.D.* (1999) *Cell. Microbiol.*, **2**, 35–47.
33. *Scidmore-Carlson M.A., Shaw E.I., Dooley C.A., Fischer E.R., Hackstadt T.* (1999) *Mol. Microbiol.*, **33**, 753–765.
34. *Shaw E.I., Dooley C.A., Fischer E.R., Scidmore M.A., Fields K.A., Hackstadt T.* (2000) *Mol. Microbiol.*, **37**, 913–925.
35. *Giles D.K., Whittimore J.D., LaRue R.W., Raulston J.E., Wyrick P.B.* (2006) *Microbes Infect.*, **8**, 1579–1591.
36. *Sisko J.L., Spaeth K., Kumar Y., Valdivia R.H.* (2006) *Mol. Microbiol.*, **60**, 51–66.
37. *Rockey D.D., Grosenbach D., Hruby D.E., Peacock M.G., Heinzen R.A., Hackstadt T.* (1997) *Mol. Microbiol.*, **24**, 217–228.
38. *Hackstadt T., Scidmore-Carlson M.A., Shaw E.I., Fischer E.R.* (1999) *Cell. Microbiol.*, **1**, 119–130.
39. *Scidmore M.A., Hackstadt T.* (2001) *Mol. Microbiol.*, **39**, 1638–1650.
40. *Toh H., Miura K., Shirai M., Hattori M.* (2003) *DNA Research*, **10**, 9–17.
41. *Belland R.J., Zhong G., Crane D.D., Hogan D., Sturdevant D., Sharma J., Beatty W.L., Caldwell H.D.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8478–8483.

42. *Nicholson T.L., Olinger L., Chong K., Schoolnik G., Stephens R.S.* (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 3179-3189.
43. *Subtil A., Blocker A., Dautry-Varsat A.* (2000) *Microbes Infect.*, **2**, 367-369.
44. *Hsia R.C., Pannekoek Y., Ingerowski E., Bavoil P.M.* (1997) *Mol. Microbiol.*, **25**, 351-359.
45. *Bavoil P.M., Hsia R.* (1998) *Mol. Microbiol.*, **28**, 859-862.
46. *Fields K.A., Mead D.J., Dooley C.A., Hackstadt T.* (2003) *Mol. Microbiol.*, **48**, 671-683.
47. *Hueck C.J.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 379-433.
48. *Wattiau P., Bernier B., Desle, P., Michiel, T., Cornelis G.R.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10493-10497.
49. *Anderson D.M., Fouts D.E., Collmer A., Schneewind O.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12839-12843.
50. *Anderson D.M., Schneewind O.* (1997) *Science*, **278**, 1140-1143.
51. *Rosqvist R., Hakansson S., Forsberg A., Wolf-Watz H.* (1995) *EMBO J.*, **14**, 4187-4195.
52. *Frithz-Lindsten E., Du Y., Rosqvist R., Forsberg A.* (1997) *Mol. Microbiol.*, **25**, 1125-1139.
53. *Anderson D.M., Schneewind O.* (1999) *Mol. Microbiol.*, **31**, 1139-1148.
54. *Subtil A., Parsot C., Dautry-Varsat A.* (2001) *Mol. Microbiol.*, **39**, 792-800.
55. *Menard R., Sansonetti P.J., Parsot C.* 1993. *J. Bacteriol.*, **175**, 5899-5906.
56. *Muschiol S., Bailey L., Gylfe A., Sundin C., Hultenby K., Bergstrom S., Elofsson M., Wolf-Watz H., Normark S., Henriques-Normark B.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14566-14571.
57. *Fields K.A., Hackstadt T.* (2000) *Mol. Microbiol.*, **38**, 1048-1060.
58. *Ho T.D., Starnbach M.N.* (2005) *Infect. Immun.*, **73**, 905-911.
59. *Slepenkin A., Motin V., de la Maza L.M., Peterson E.M.* (2005) *J. Bacteriol.*, **187**, 473-479.
60. *Кострюкова Е.С., Лазарев В.Н., Тутова Г.А., Акопиан Т.А., Левицкий С.А., Говорун В.М.* (2006) *Биохимия*, **71**, 333-340.
61. *Rzomp K.A., Moorhead A.R., Scidmore M.A.* (2006) *Infect. Immun.*, **74**, 5362-5373.
62. *Кострюкова Е.С., Коробова Ф.В., Лазарев В.Н., Шкарупета М.М., Тутова Г.А., Акопиан Т.А., Говорун В.М.* (2005) *Бюлл. экспер. биол. мед*, **139**, 562-567.
63. *Delevoeye C., Nilges M., Dautry-Varsat A., Subtil A.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 46896-46906.
64. *Fasshauer D., Sutton R.B., Brunger A.T., Jahn R.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15781-15786.
65. *Blyth W.A., Taverne J.* (1972) *J. Hyg.*, **70**, 33-37.
66. *Ridderhof J.C., Barnes R.C.* (1989) *Infect. Immun.*, **57**, 3189-3193.
67. *Van Ooij C., Homola E., Kincaid E., Engel J.* (1998) *Infect. Immun.*, **66**, 5364-5371.
68. *Rockey D.D., Fischer E.R., Hackstadt T.* (1996) *Infect. Immun.*, **64**, 4269-4278.
69. *Fields K.A., Fischer E.R., Hackstadt T.* (2002) *Infect. Immun.*, **70**, 3816-3823.
70. *Rockey D.D., Viratyosin W., Bannantine J.P., Suchland R.J., Stamm W.E.* (2002) *Microbiology*, **148**, 2497-2505.
71. *Suchland R.J., Rockey D.D., Bannantine J.P., Stamm W.E.* (2000) *Infect. Immun.*, **68**, 360-367.
72. *Pannekoek Y., van der Ende A., Eijk P.P., van Marle J., de Witte M.A., Ossewaarde J.M., van den Brule A.J., Morre S.A., Dankert J.* (2001) *Infect. Immun.*, **69**, 4654-4656.
73. *Geisler W.M., Suchland R.J., Rockey D.D., Stamm W.E.* (2001) *J. Infect. Dis.* **184**, 879-884.
74. *Pannekoek Y., Spaargaren J., Langerak A.A., Merks J., Morre S.A., van der Ende A.* (2005) *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2441-2443.
75. *Alzhanov D., Barnes J., Hruby D.E., Rockey D.D.* (2004) *BMC Microbiol.*, **4**, 24-29.

БЕЛКИ МЕМБРАНЫ ВКЛЮЧЕНИЯ *CHLAMYDIACEAE*

76. Fu H., Subramanian R.R., Masters S.C. (2000) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 617-647.
77. Fantl W.J., Muslin A.J., Kikuchi A., Martin J.A., MacNicol A.M., Gross R.W., Williams L.T. (1994) *Nature*, **371**, 612-614.
78. Thorson J.A., Yu L.W.K., Hsu A.L., Shih N.-Y., Graves P.R., Tanner J.W. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5229-5238.
79. Meller N., Liu Y.-C., Collins T.L., Bonnefoy-Berard N., Baier G., Isakov N., Altman A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5782-5791.
80. Banik U., Wang G.-A., Wagner P.D., Kaufman S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 26219-26255.
81. Gelperin D., Weigle J., Nelson K., Roseboom R., Irie K., Matsumoto K., Lemmon S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11539-11543.
82. Rzomp K.A., Scholtes L.D., Briggs B.J., Whittaker G.R., Scidmore M.A. (2003) *Infect. Immun.*, **71**, 5855-5870.
83. Grieshaber S.S., Grieshaber N.A., Hackstadt T. (2003) *J. Cell Sci.*, **116**, 3793-3802.
84. Bielli A., Thornquist P.O., Hendrick A.G., Finn R., Fitzgerald K., McCaffrey M.W. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 1141-1153.
85. Starnbach M.N., Bevan M.J., Lampe M.F. (1994) *J. Immunol.*, **153**, 5183-5189.
86. Mu F.T., Callaghan J.M., Steele-Mortimer O., Stenmark H., Parton R.G., Campbell P.L., McCluskey J., Yeo J.P., Tock E.P., Toh B.H. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 13503-13511.
87. Christoforidis S., McBride H.M., Burgoyne R.D., Zerial M. (1999) *Nature*, **397**, 621-625.
88. Dong F., Su H., Huang Y., Zhong Y., Zhong G. (2004) *Infect. Immun.*, **72**, 3863-3868.

Поступила: 15. 07. 2007.

INCLUSION MEMBRANE PROTEINS OF *CHLAMYDIACEAE*

E.S. Kostrjukova, V.N. Lazarev, V.M. Govorun

Research Institute for Physico-Chemical Medicine, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119992 Russia; tel.: (495) 245-42-36; fax: (495) 246-45-01; e-mail: eles@newmail.ru

Inclusion membrane proteins belong to the family of unique chlamydial proteins. Members of this family attract attention of scientists because of the following characteristics: Inc-proteins are localized in the inclusion membrane, these proteins have been found in all chlamydial species, expression of the most part of its genes begins during first hours from the infection of cell culture. Biological functions of Inc-proteins remain unknown, but these proteins are suggested to play a key role in process of the development the chlamydial infection.

Key words: *Chlamydiaceae, Chlamydia*, inclusion membrane proteins, Inc-proteins.