

Структура та біологічні властивості пластівцевоутворюючого фактора золотистого стафілокока

В. Д. Іванова, В. К. Позур

Київський університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

Пластівцевоутворюючий фактор — один із компонентів клітинної стінки Staphylococcus aureus — глікопротеїн, молекулярна маса якого складає 92 кДа. Фактор обумовлює плазмоаглютинацію, відіграє важливу роль в адгезії мікробних клітин до клітин організму, перешкоджає ефективному фагоцитозу бактерій, може викликати агрегацію тромбоцитів. Очищений фактор у суміші з ад'ювантом Фрейнда, а також у складі мікробної клітини призводить до появи специфічних антитіл в імунізованих тварин, здатний активувати комплемент in vitro.

Вступ. Антибактеріальний імунітет не завжди є досить ефективним проти стафілокової інфекції. Причини цього явища залишаються нез'ясованими. Проте однією з них є недостатність дослідження імунобіологічних властивостей компонентів клітинної стінки, що не дозволяє скласти чіткого уявлення про їхню роль у патогенезі стафілокової інфекції та в антистафілоковому імунітеті. Крім того, експериментальні дані щодо впливу поверхневих антигенних структур клітини та її екзопродуктів не завжди узгоджуються з результатами, отриманими при спостереженні за природними або експериментальними стафілоковими інфекціями. У зв'язку з цим актуальним є ретельне дослідження компонентів клітинної поверхні.

Однією з маловивчених структур клітинної стінки *Staphylococcus aureus* є пластівцевоутворюючий фактор, який містять біля 95 % штамів цього виду. Дані про його структуру та активність дуже розрізнені, проте свідчать про певний вплив на протікання захворювань, викликаних стафілококами, на активність імунної системи макроорганізму.

Пластівцевоутворюючий фактор як компонент клітинної стінки *S. aureus*. Основними морфологічними поверхневими компонентами клітини стафілококів є клітинна стінка та мембранні структури.

Клітинна стінка складається з трьох шарів, які добре ідентифікуються під електронним мікроскопом: зовнішній та внутрішній мають високу електронну щільність, а середній — низьку. Головними її складовими є пептидоглікан (складає до 60 % сухої маси клітинної стінки) та тейхоеві кислоти. Крім цих компонентів, клітинна стінка штамів *S. aureus* містить і білок А (біля 6 % її маси).

S. aureus експресують багато факторів патогенності та вірулентності (рис. 1): 1) розташовані на поверхні білки, які сприяють колонізації тканин хазяїна [1]; 2) фактори інвазії, необхідні для проникнення бактерій у тканини (лейкоцидин, гіалуронідаза, коагулаза, лецитиназа, фібринолізин, РНКаза); 3) поверхневі фактори, що знижують активність фагоцитозу (білок А, капсула); 4) речовини, що сприяють виживанню бактерій у фагоцитах (продукція каталази); 5) фактори, які обумовлюють імунологічне маскування (білок А, коагулаза); 6) токсини, що порушують цілісність мембран еукаріотичних клітин (лейкоцидини, гемолізину, лейкотоксини); 7) екзотоксини, які пошкоджують тканини хазяїна та викликають ознаки захворювання (ентеротоксин SEA-G; токсин, що призводить до виникнення синдрому токсичного шоку — TSST, exfoliatin toxin (ET)); такі антигени неспецифічно активують Т-клітини; цитокіни, що вивільняються при цьому, обумовлюють ознаки захворювання [2].

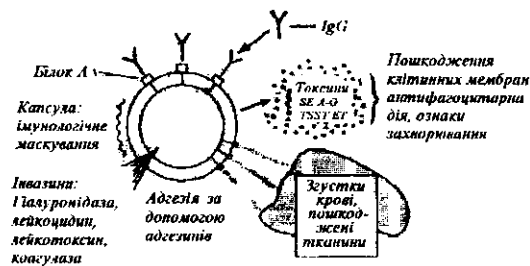


Рис. 1. Детермінанти вірулентності *S. aureus* [3]

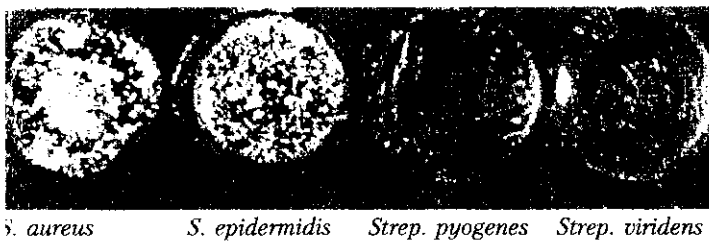


Рис. 2. Позитивний результат каталазного тесту — утворення пухирців газу. Фермент каталаза присутня у стафілококів (позитивний результат тесту), але відсутня у стрептококів (негативний результат)

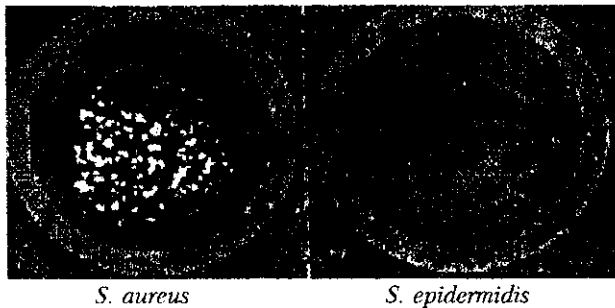


Рис. 3. Результат взаємодії пластівцеутворюючого фактора *S. aureus* з плазмою крові — агрегація бактерій, утворення пластівців бактерій (slide test)

В останні роки особливу увагу дослідників привертають антигенні структури клітини стафілококів, фізико-хімічні властивості, функції та роль яких у формуванні протимікробного імунітету практично не вивчені. Однією з таких структур є пластівцеутворюючий фактор (clumping factor — clfA), наявність якого в клітині є характерною ознакою виду *S. aureus*.

Пластівцевоутворюючий фактор *S. aureus* обумовлює феномен плазмоаглютинації, який виявляють на предметному склі (slide test). Це дослідження є одним з найважливіших при ідентифікації стафілококів виду *S. aureus*. Йому передують тести з визначення каталази (позитивний тест дає підставу віднести даний мікроорганізм до родини *Micrococcaceae*) (рис. 2), виявлення здатності розщеплювати глюкозу та маніт (для віднесення до роду *Staphylococcus*, представники якого, на відміну від *Micrococcus*, є факультативними анаеробами, тому мають таку властивість) [4; 5]. Для віднесення мікроорганізму до виду *S. aureus* проводиться реакція плазмокоагуляції, яка базується на наявності в бактеріальній клітині коагулази. Остання присутня у стафілококів, але відсутня у стрептококів. Результатом реакції є утворення згустків будь-якого розміру. Крім того, використовують тести з визначення лецитинази, ДНКази (99,3 % *S. aureus* проявляють ДНКази активність), гемолізини.

Дослідження з виявлення пластівцевоутворюючого фактора, результатом якого є утворення в плазмі крові кролів пластівців мікробних клітин, здійснюють у комплексі з коагулазним тестом (рис. 3). Розроблені модифікації тесту, в яких взаємодія відбувається 1) між мікробною клітиною та еритроцитами, вкритими фібриногеном, а позитивним результатом є склеювання еритроцитів або 2) бактеріями та частками латексу, покритими певною фракцією плазми людини й обробленими ферментами для зменшення неспецифічного зв'язування [6—9].

Таким чином, позитивний slide test дає підставу відносити мікроорганізм до виду *S. aureus*. Проте з'ясовано, що біля 5 % штамів *S. aureus* не містять пластівцевоутворюючого фактора (slide test негативний), а штами видів *S. lugdunensis*, *S. scale* і *S. intermedius*, навпаки, можуть його продукувати [10]. Так, наприклад, при дослідженні виділених з організму хворих людей бактерій виду *S. lugdunensis*, які за морфологічними характеристиками дуже схожі з представниками *S. aureus*, у всіх ізолятах було виявлено пластівцевоутворюючий фактор. Отже, присутність цієї субстанції може легко призводити до помилкових результатів при ідентифікації цих бактерій. Застосування допоміжного тесту — на наявність орнітиндекарбоксилази (ODC) — стало досить надійним скринінговим методом виявлення *S. lugdunensis* [11].

Схожий з пластівцевоутворюючим фактором компонент знайдено й у клітинній стінці *S. epidermidis*. Це білок з молекулярною масою приблизно 119 кДа, який обумовлює зв'язування бактеріальної клітини з іммобілізованим фібриногеном. Ген

fbe, який кодує фібриногензв'язуючий білок (Fbe) *S. epidermidis*, складається з 3276 пар нуклеотидів; його знайдено в 40 з 43 ізольованих штамів *S. epidermidis*. Повна структура білка Fbe схожа на таку інших поверхневих білків стафілококів та стрептококів. Порівняння структури білка *S. epidermidis* з раніше відомими фібриногензв'язуючими структурами бактерій показало, що він дуже схожий з пластівцевоютворючим фактором *S. aureus* [12].

При дослідженні метицилінрезистентних штамів *S. aureus* (MRSA) виявлено, що частина з них не містить на поверхні фібриногензв'язуючого рецептора. Антисироватка, отримана внаслідок імунізації кролів такими штамми, реагувала переважно з поверхневим білком з молекулярною масою 230 кДа, а також з білком масою 175 кДа та невеликою кількістю низькомолекулярних білків, які, очевидно, утворюються з головного внаслідок протеолізу. Отже, в клітинній стінці таких штамів присутній високомолекулярний білок, який не виявляється у штамів, що містять пластівцевоютворючий фактор [13].

У плазмі крові багатьох тварин, а також у розчині фібриногену з концентрацією, не нижче 1 мкг/мл, завдяки наявності пластівцевоютворючого фактора відбувається аглютинація стафілококів. Плазма таких тварин, як вівці, морські свинки, кози, слони, не аглютинують цих мікроорганізмів, що пов'язано, очевидно, з особливостями структури фібриногенів різного походження [14]. Феномен плазмааглютинації свідчить про поверхнє розташування означеного фактора в мікробній клітині. Непрямим свідченням цього є те, що L-форми *S. aureus* його позбавлені.

На відміну від стафілококів аналогічний фактор, який знайдено в клітинах стрептококів, реагує з плазмою морських свинок та овець. Крім того, стрептококовий фактор стійкий до нагрівання, ультразвуку, до дії протеолітичних ферментів та галактозооксидази. Пластівцевоютворючий фактор стрептококів є білком з вираженими кислотними властивостями, він вибірково реагує з фібриногеном плазми людини та викликає паракоагуляцію [15, 16].

Завдяки аглютинації стафілококів у плазмі крові пластівцевоютворючий фактор тривалий час називали «зв'язаною коагулазою», припускаючи, що він є особливою її формою або попередником, локалізованим на клітинній стінці. Коагулаза, як відомо, є зовнішньоклітинним білком, який зв'язується з протромбіном, формуючи комплекс, що має тромбіноподібну активність і сприяє перетворенню фібриногену у фібрин. Крім того, є дані про здат-

ність коагулази зв'язуватися з фібриногеном. Проте було показано, що мутанти, які втратили ген, кодуєчий коагулазу (*coa* ген), на фоні втрати коагулазної активності здатні взаємодіяти з фібриногеном так само, як і батьківський штам. Фібриногензв'язуючі детермінанти коагулази розташовані на С-кінці молекули на відміну від протромбінових ділянок, що знаходяться на N-кінці [17, 18]. До того ж існування коагулазонегативних та коагулазопозитивних по відношенню до пластівцевоютворючого фактора стафілококів [19—21] свідчить про самостійність обох субстанцій.

Показано, що коагулаза (кодується геном *coa*) відіграє важливу роль у зв'язуванні розчинного фібриногену, в той час як пластівцевоютворючий фактор (кодується геном *clfA*) зв'язує іммобілізований (твердофазний) фібриноген. Транскрипція гена *coa* відбувається в фазі експоненціального росту, тоді як *clfA* — головним чином під час фази сповільненого росту [22].

При дослідженні внеску пластівцевоютворючого фактора та коагулази в опосередковування адгезії *S. aureus* до поверхнево-адсорбованого фібриногену виявлено, що ClfA, а не коагулаза збільшує вірогідність прилипання бактерій до вкритої плазмою поверхні, проте обидві субстанції (хоча коагулаза в меншому ступені) обумовлюють зв'язування з поверхнею, вкритою фібриногеном. Результати досліджень [18] свідчать, що присутність пластівцевоютворючого фактора сприяє адгезії бактерій до поверхні з адсорбованим фібриногеном, збільшується при цьому й міцність зв'язку. При цьому наголошується на існуванні допоміжних, незалежних від коагулази та означеного фактора, структур, що підтримують цей процес [18, 22]. У клітинних екстрактах *S. aureus* знайдено допоміжний зв'язуючий компонент — білок з молекулярною масою 52 кДа, який відсутній у подвійних *coa-clfA* мутантів [22].

Деякі подібні властивості пластівцевоютворючого фактора та білка А (наявність лише у штамів *S. aureus*, розташування в клітинній стінці, відносна термостабільність, чутливість до протеолітичних ферментів) також наводили на думку про їхню ідентичність. Проте було доведено, що білок А не реагує з фібриногеном людини та великої рогатої худоби, не абсорбує з антимікробних сироваток антитіла до пластівцевоютворючого фактору. Таким чином, існування цього фактора як окремого компонента клітинної стінки є доведеним.

Структура та фізико-хімічні властивості пластівцевоютворючого фактора. Пластівцевоютворючий фактор найінтенсивніше синтезується молодими культурами та при вирощуванні стафі-

лококів в умовах аерації. Оптимальними для його утворення є середовища з лужними значеннями рН. Фактор міститься у штамів фагокомплексу 52А/80/81. При тривалому зберіганні культур рівень його в мікробній клітині значно знижується.

Вперше пластівцевоютворючий фактор був виділений в очищеному вигляді з мікробної клітини штаму Newman D2С у 1976 році. Для цього застосовували екстрагування в кислому середовищі, осадження етанолом, іонообмінну хроматографію та ізоелектричне фокусування в поліакриламідному гелі [23]. Отриманий препарат виявився гомогенним при дисковому електрофорезі та гель-фільтрації через сефадекс G-150.

Фактор є білком з залишками вуглеводів. Його ізоелектрична точка відповідає значенням рН 10,2—10,8. Було виявлено один головний та два

мінорних ланцюги, молекулярна маса яких складала відповідно 62, 61 та 59 кДа [15]. За останніми даними [24], нативний рецептор ClfA — це білок з молекулярною масою 92 кДа, який отримано з клітинної стінки *S. aureus*. Його структуру та послідовність, яка складається з 933 амінокислотних залишків, наведено нижче.

У найбільшій кількості пластівцевоютворючий фактор містить лізин, аланін, аргінін, глутамінову кислоту або глутамін, аспарагінову кислоту або аспарагін [15]. Імунні сироватки до даного фактора, виділеного з штаму Newman, аглютинують гомологічні та гетерологічні факторвміщуючі штами *S. aureus*. Отже, можна стверджувати, що пластівцевоютворючий фактор у різних штамів *S. aureus* має однорідну антигенну структуру.

С-кінець фібриногензв'язуючого рецептора за-

Локус	SACEG
Визначення	Ген <i>S. aureus</i> , що кодує пластівцевоютворючий фактор
Кодуюча послідовність	3499 пар нуклеотидів
Природа продукту	Білок з молекулярною масою 92 кДа
Джерело	Вид <i>S. aureus</i> , штам Newman
Послідовність	Розмір: 933 амінокислотних залишки MNMKKKEKHAIRKKSIGVASVLVGTLLIGFLLSSKEADA SENSVTQSDSASNESKSNDSVSAAPKDDTNVSDTK TSSNTNNGETSVAQNPAQQETTQSSSTNATTEETPVT GEATTTTNTQANTPATTQSSNTNAEELVNTSNETTF NDTNTVSSVNSPQNSTNAENVSTTQDTSTEATPSNN ESAPQSTDASNKDVVNQAVNTSAPRMRAFSLAAVAAD APAAGTDITNQLTNVTVGIDSGTTVYPHQAGYVKNLY GFSVPNSAVKGDTFKITVPKELNLNGVTSTAKVPPIMA GDQVLANGVIDSDGNVIYTFDYVNTKDDVKATI.TMP AYIDPENVKKTGNVTLATGIGSTTANKTVLVDYEKYKG FYNLSIKGTIDQIDKTNNTYRQTYVNPSPGDNVIAPVLG NLKPNTDSNALIDQNTSIKVKVDNAADLSESYFVNPE NFEDVTNSVNITFPNPNQYKVEFNTPDDQITTPYIVVN GHIDPNSKGDALRSTLYGYNSEIWRMSWDNEVAFN NGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPIPEDSDSDPGS DSGSDSNDSGSDSGSDSTSDSGSDSASDSDSASDSDS ASDSDSASDSDSASDSDSDNDSSDSDSDSDSDSDSD SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD SDSDSDSDSDSASDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD DSDSDSDSDSDSESDSDSESDSDSDSDSDSDSDSDSD DSDSASDSDSGSDSDSSSDSDSESDSNDSESGSNNN VVPPNSPKNGTNASNKNEAKDSKEPLPDTGSEDEANTSLI WGLLASIGSLLLFRRKKENKDKK

нурений в клітинну стінку, а N-кінцеві домени беруть участь у взаємодіях з розчинними білками організму та поверхнею клітин хазяїна. Доведено [25], що невелика частина молекул рецептора ClfA зв'язана з пептидогліканом дуже близько від верхньої клітинної стінки. Між пластівцевоютворюючим фактором та іншими фібриногензв'язуючими білками *S. aureus* знайдено значну гомологію, особливо в області C- та N-кінцевих ділянок.

Вважають [26], що здатність *S. aureus* до адгезії з фібриногеном та фібрином є найважливішим етапом в ініціації стафілококової інфекції. Фібриногеновий рецептор ClfA *S. aureus* штаму Newman — продукт гена *clfA* — відповідає за утворення пластівців бактерій в розчинному фібриногені і необхідний для адгезії їх до твердої фази фібриногену. Це було підтверджено [25] тим, що антитіла проти очищеної області A пригнічують обидві ці властивості. Область A розташована на бактеріальній поверхні клітини. В межах цієї області білка ClfA знаходиться єдина лігандзв'язуюча ділянка. Цей домен обмежений сегментом з 218 залишків (залишки 332—550) у межах області A.

При аналізі первинної структури пластівцевоютворюючого фактора виявлено наявність Ca^{2+} потенціалу в межах фібриногензв'язуючої ділянки. Іони Ca^{2+} (або Mn^{2+}) у концентрації 2—3 мМ можуть пригнічувати з'єднання γ -ланцюга фібриногену з рекомбінантною послідовністю Clf40 (залишки 40—559) та прилипання клітин *S. aureus* до іммобілізованого фібриногену. Проте іони Mg^{2+} або Na^+ при подібних концентраціях не впливають на взаємодію рецептора з фібриногеном. Можна припустити, що зв'язування Ca^{2+} з інгібіторною ділянкою в межах ClfA стимулює зміну конформації, яка є несумісною з закріпленням C-кінця γ -ланцюга фібриногену. Дослідження показали [27], що Ca^{2+} -залежна інгібіторна ділянка розташована в межах 310—321 амінокислотних залишків пластівцевоютворюючого фактора.

Останні дослідження [28] структури пластівцевоютворюючого фактора виявили, що цей білок *S. aureus* має незвичайні дипептидні повтори з аспарагіну та серину. Вони складають так звану R-ділянку, в якій міститься 308 залишків, що зв'язують ліганд та з'єднують його з частиною, зануреною в клітинну стінку, за рахунок послідовності з 28 амінокислотних залишків.

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції показано, що розмір послідовності, кодуєної повторення, змінюється від 580 до 1320 пар нуклеотидів, тоді як область A гена *clfA* має однаковий розмір у кожного штаму. Розмір області повторення фактора A не корелює зі здатністю цих штамів формувати

пластівці в присутності фібриногену: штам з найменшим розміром повторення 580 пар нуклеотидів утворює пластівці так само, як штам Newman. Кожен досліджений штам *S. aureus* містив кілька високомолекулярних білків, які реагували з анти-*clfA*-області A-антитілами. В деяких випадках молекулярна маса головного білка варіювала в залежності від довжини послідовності кодування області повторення R [29].

Виявлено [30], що один з локусів у геномі *S. aureus* Newman одночасно кодує і дипептидний повтор, і фібриногензв'язуючий білок, який було названо пластівцевоютворюючим фактором B (ClfB). Повна організація фактора B дуже подібна до такої ClfA, і білки мають значну ідентичність у сигнальній послідовності й доменах, розташованих у клітинній стінці. Проте білок ClfB реагує з α - і β -ланцюгами фібриногену на відміну від фактора ClfA, який зв'язується виключно з C-кінцевою частиною γ -ланцюга.

Аналіз білків, отриманих з клітинної стінки *S. aureus* Newman, в імуноблоті з використанням антитіл проти рекомбінантного A-області пластівцевоютворюючого фактора B показав, що білок з молекулярною масою 124 кДа є продуктом *clfB* гена. Цей білок ідентифікується тільки в клітинах, що знаходяться в ранній експоненціальній фазі росту. Він відсутній у клітин з пізньої експоненціальної або стаціонарної фаз культивування. Виявлено [30], що цей білок здатний обумовлювати 1) зв'язування фібриногену клітинами, що знаходяться в фазі експоненціального росту; 2) спорідненість таких бактерій до іммобілізованого фібриногену *in vitro*. Проте в експоненціальній фазі культивування дикого типу *S. aureus* Newman активність фактора B була замаскована білком ClfA, хоча це не вносило ніяких змін у взаємодію клітин із стаціонарної фази з фібриногеном. ClfB-залежна бактеріальна адгезивність до іммобілізованого фібриногену пригнічується мілімолярними концентраціями Ca^{2+} і Mn^{2+} . Це вказує на те, що подібно до фактора A зв'язування ліганду рецептором B регулюється низькоафінним інгібуванням катіонзв'язуючої ділянки.

Особливе значення у взаємодії фібриногену з пластівцевоютворюючим фактором *S. aureus* відіграють 15 C-кінцевих амінокислотних залишків (385—441) γ -ланцюга фібриногену, в тому числі й кінцевий залишок валіну. З трьох ланцюгів (α , β , γ) фібриногену людини саме γ -ланцюг містить головний сайт, що розпізнає стафілококовий пластівцевоютворюючий фактор. Зв'язування не відбувається, коли вказана послідовність втрачена або змінений її склад [31]; синтетичні поліпептидні

послідовності, приєднані до С-кінцевої ділянки фібриногену, також відмінюють його взаємодію з поверхнею мікробної клітини. Дослідження попередніх років показали, що С-кінцевий домен γ -ланцюга фібриногену містить сайт (27 амінокислотних залишків — 385—411), що може зв'язувати рецептор інтегрину α IIb β 3 (глікопротеїн gpIIb/IIIa) на тромбоцитах [32]. Крім того, тромбоцитарний рецептор, хоча з меншою авідністю, може зв'язуватися з сайтом α -ланцюга фібриногену. Тепер доведено [33], що ділянки, з якими з'єднуються тромбоцитарний інтегрин та стафілококовий адгезин, збігаються. Отже, С-термінальна послідовність γ -ланцюга фібриногену, що знаходиться між 385-м та 411-м залишками, виконує три важливі функції: 1) перехресно зв'язує фібрин; 2) обумовлює утворення пластівців стафілококами; 3) викликає агрегацію тромбоцитів.

Проведено дослідження по з'ясуванню впливу окремих генів на продукцію та активність пластівцевоютворюючого фактора *S. aureus* [34]. Так, при дослідженні штамів NCTC8325 і Newmap виявлено, що детермінанта *tec*, яка обумовлює стійкість бактерій до метициліну, призводить до втрати здатності зв'язувати іммобілізовані фібриноген та фібронектин незалежно від наявності або відсутності допоміжних мутацій в генах *femA*, *femB* або *femC*, які, як відомо, можуть знижувати рівень резистентності до метициліну. При цьому продукція пластівцевоютворюючого фактора в клітинах метицилінрезистентних штамів не змінюється в порівнянні з чутливими до нього штамми. Бактерії, в яких ген *tec* знаходиться в плазміді, не втрачають здатності взаємодіяти з фібриногеном. Таким чином, хромосомна вставка *tec*-елемента в геном *S. aureus* порушує функціональну активність фібриноген- та фібронектинзв'язуючих білків без впливу на їхнє утворення. Це свідчить про те, що отриманий результат не пов'язаний з діяльністю самого *tec*-елемента.

Експерименти [35, 36] по видаленню *sigB* гена *S. aureus*, який кодує σ -фактор В, показали, що отримані мутанти ростуть *in vitro* так само, як і батьківські форми, проте вони є дефіцитними по пластівцевоютворюючому фактору, коагулазі та пігменту. На моделях інфекції мишей та щурів було показано, що зниження вірулентності у таких мікроорганізмів не відбувається.

Імунобіологічна активність пластівцевоютворюючого фактора *S. aureus*. Взаємодію бактерій з фібриногеном можна вважати одним з елементів патогенності *S. aureus*, що сприяє закріпленню їх на вкритих фібриногеном поверхнях, стимулює утворення бактеріальних пластівців, які в свою

чергу захищають мікробну клітину від фагоцитів. На сьогодні визнано, що, хоча *S. aureus* має кілька фібриногензв'язуючих білків, асоційований з клітинною стінкою пластівцевоютворюючий фактор є найважливішим у бактеріальних взаємодіях з іммобілізованим або розчинним фібриногеном. Встановлено також, що клітини штамів *S. aureus*, які містять пластівцевоютворюючий фактор, менше захоплюються лейкоцитами кролів та великої рогатої худоби, ніж клітини, в яких він відсутній.

Є дані Маянського [37] про високоселективну і навіть штамоспецифічну взаємодію секреторних продуктів нейтрофілів з бактеріями. Виявлено, що нейтрофіли людини, стимульовані за різних умов (форболміристатацетат, формілметіоніллейцинілаланін, опсонізований зимозан, неопсонізовані стафілококи), синтезують фактор агрегації, позначений як *clumping* фактор, або CF, зі здатністю до високівибіркової агрегації та опсонізації стафілококів. З 68 досліджених штамів чутливим до цього фактора нейтрофілів виявився лише один — *S. epidermidis*. CF-негативні стафілококи були здатні стимулювати вивільнення фактора агрегації нейтрофілами, проте не зв'язувалися з ним. Субстанції, отримані шляхом механічного пошкодження нейтрофілів, повторним заморожуванням—відтаюванням, обробкою ультразвуком, не мають ніякої агрегуючої активності. Це може свідчити про те, що фактор знаходиться в нейтрофілах у вигляді неактивного попередника, активація якого відбувається в ході секреторного процесу.

Бактеріальний компонент, що відповідає за зв'язування з CF, є достатньо стабільним білком, активність якого в значній мірі залежить від вуглеводів. CF має молекулярну масу, що перевищує 100 кДа, позитивний заряд і руйнується при нагріванні до 100 °С. Здатність *S. epidermidis* 178 М до зв'язування з CF повністю втрачається після обробки бактерій проназою та частково зникає після кип'ятіння і обробки трипсином та перйодатом. Дія нейрамінідази та прогрівання до 80 °С не впливають на його активність. Припускають [37], що такий фактор нейтрофілів знаходиться в секреторних гранулах, що відрізняє його від інших відомих антимікробних пептидів, асоційованих з азурофільними гранулами.

Важливим є з'ясування впливу стафілококового пластівцевоютворюючого фактора на захисні механізми організму ссавців, у тому числі на бактерицидну активність групи ІІА фосфоліпази А2 (PLA2). Як відомо, цей фермент є головним зовнішньоклітинним агентом при запаленні, активним проти *S. aureus*. Виявлено [38], що фосфоліпаза може проникати через щільні бактеріальні скуп-

чення, а пластівцевоютворюючий фактор мало впливає на її активність. Додавання протеаз порушує скупчення, повертаючи фосфоліпазі антибактеріальну дію. Таким чином, зовнішньоклітинна мобілізація групи PLA2 впродовж запалення може опосередковувати механізми, за допомогою яких організм хазяїна керує проліферацією та виживанням стафілококів навіть після утворення пластівців.

На моделі легеневої інфекції мишей, викликаній внутрішньовенним введенням *S. aureus*, виявлено [39], що кількість бактерій, виділених з легеневої тканини, вже через 7 днів від початку інфекційного процесу корелює з титрами коагулази, але не з титрами пластівцевоютворюючого фактора, а інфекція, викликана коагулазодефектним мутантним штамом DU5843, у порівнянні з коагулазопозитивним батьківським штамом DU5789 супроводжується істотним зменшенням кількості життєздатних бактерій. Проте в розвитку ендокардиту щурів більша роль належить саме пластівцевоютворюючому факторові, а не коагулазі. У коагулазодефектних бактерій не змінювалася здатність до зв'язування фібриногену та до ініціювання інфекційного процесу, в той час як дефектні по ClfA рецептора мікроорганізми майже повністю втрачали таку здатність [40]. Таким чином, можна припустити, що вплив згаданих компонентів клітини залежить від локалізації інфекції та виду організму-хазяїна.

Встановлено [33], що важливу роль у патогенезі інфекційного ендокардиту відіграє агрегація тромбоцитів бактеріями. Механізми цього процесу чітко не встановлені. Проте відомо, що агрегація відбувається в дві стадії: перша залежить від співвідношення бактерії—тромбоцити з максимальною агрегацією останніх при відношенні 5:1, друга затримується в присутності ADP-гідролази, залежить від життєздатності бактеріальних клітин, цілісності клітинної стінки й пригнічується антитілами проти стафілококового пластівцевоютворюючого фактора. Мутанти, позбавлені цього фактора, характеризуються зниженою вірулентністю і нездатністю прикріплюватися до поверхні клітин серцевої тканини. Отже, агрегація тромбоцитів відбувається за умови з'єднання пластівцевоютворюючого фактора бактерій з фібриногеном, при цьому процес не залежить від двох головних фібриногензв'язуючих доменів рецептора GP IIb/IIIa тромбоцитів: сайта, який розпізнає послідовність Arg-Gly-Asp α -ланцюга та сайта впізнавання додекапептидної послідовності δ -ланцюга фібриногену.

Присутність фібриногену збільшує вірулентність стафілококів при експериментальному пери-

тоніті у мишей [41]. Проте роль пластівцевоютворюючого фактора в захворюваннях людей остаточно не з'ясована.

Пластівцевоютворюючий фактор є суттєвим для адгезії мікробних клітин до кератиноцитів шкіри, при цьому здатність до прилипання залежить від рН шкіри, посилюючись при лужних значеннях рН, характерних для станів з дисфункцією епідермального бар'єра. Мутанти DU5852, дефектні за цим фактором, характеризуються зниженою здатністю до адгезії до кератиноцитів, що становить у середньому 52 % в порівнянні з батьківським штамом Newman [42].

Очищений пластівцевоютворюючий фактор у суміші з ад'ювантом Фрейнда, а також у складі мікробної клітини має антигенні властивості, оскільки викликає появу специфічних антитіл в імунізованих тварин. Імунізація пластівцевоютворюючим фактором індукує істотне збільшення кількості антитіл, тоді як введення фібронектинзв'язуючого білка — слабку імунну відповідь. У всіх щурів, яких було імунізовано живими клітинами *S. aureus*, відмічено високий рівень продукції антитіл [43]. Таким чином, імунізація живими бактеріями або пластівцевоютворюючим фактором спричинює підвищення резистентності до стафілококової інфекції.

Пластівцевоютворюючий фактор активує комплекс *in vitro*, що забезпечує індукцію захисту імунізованих мишей проти *S. aureus*, які здатні викликати перитоніт. Показано [44], що в однакових молярних концентраціях означений фактор, виділений із штаму E2371, та білок А по-різному впливають на активацію комплексу: вплив пластівцевоютворюючого фактора виявляється інтенсивнішим. І фактор, і білок А здатні активувати комплекс альтернативним шляхом. У той же час фібронектинзв'язуючий білок не проявляє такої активності.

Закінчення. Узагальнюючи представлені літературні дані, можна стверджувати, що присутній в клітинній стінці 95 % штамів *S. aureus* пластівцевоютворюючий фактор є білком, молекулярна маса якого складає 92 кДа, а послідовність — 933 амінокислотних залишки.

В структурі рецептора є лігандзв'язуюча ділянка з 218 залишків (332—550), яка знаходиться в межах області А-білка, та R-ділянка, яку складають дипептидні повтори з аспарагіну та серину (308 залишків); вони зв'язують ліганд та з'єднують його з частиною, зануреною в клітинну стінку (послідовність з 28 амінокислотних залишків); інгібіторна ділянка розташована в межах 310—321 амінокислотних залишків. Фібриногензв'язуючий

рецептор кодується локусом SACFG (розмір кодувочної послідовності ДНК — 3499 пар нуклеотидів).

Фібриноген зв'язуючому рецепторові притаманна паракоагулююча активність, тобто він викликає неферментативну преципітацію фібриногену та розчинних мономерів фібрину. Пластівцевоютворюючий фактор як один з факторів патогенності *S. aureus* відіграє важливу роль в адгезії мікробних клітин до клітин організму, перешкоджає ефективному фагоцитозу мікроорганізмів, агрегуючи стафілококові клітини, може викликати агрегацію тромбоцитів.

Очищений пластівцевоютворюючий фактор у суміші з ад'ювантом Фрейнда, а також у складі мікробної клітини має антигенні властивості — спричинює появу специфічних антитіл в імунізованих тварин, може активувати комплемент *in vitro* класичним та альтернативним шляхами більш інтенсивно, ніж білок А. Роль рецептора в розвитку захворювань, викликаних *S. aureus*, залежить від локалізації інфекції та виду організму-хазяїна.

Таким чином, пластівцевоютворюючий фактор має суттєве значення у розвитку стафілококових інфекцій та впливає на деякі ланки імунної системи, але зв'язок між його наявністю та вірулентністю штаму до цих пір не встановлено. Невідома також роль антитіл до нього в протистафілококовому імунітеті.

В. Д. Иванова, В. К. Позур

Структура и биологические свойства хлопьеобразующего фактора золотистого стафилококка

Резюме

В обзоре проанализированы данные новейших исследований структуры, физико-химических свойств и биологической активности хлопьеобразующего фактора *Staphylococcus aureus*, рассмотрены кодирующие его гены и влияние на них других локусов генома *S. aureus*, охарактеризованы подобные структуры других микроорганизмов. Описано влияние хлопьеобразующего фактора на некоторые звенья иммунной системы и на протекание заболеваний, вызванных золотистым стафилококком.

V. D. Ivanova, V. K. Pozur

Structure and biological properties of clumping factor of *Staphylococcus aureus*

Summary

The data of the recent investigations of structure, physico-chemical properties and biological activity of the staphylococcal clumping factor, genes encoding the factor, the influence of other *S. aureus* genome locus as well as similar structure of other microorganisms are analysed in the present review. The influence of the clumping factor on some parameters of the immune system and pathogenesis of staphylococcal diseases is described.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Foster T. J., McDevitt D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence // FEMS Microbiol. Lett.—1994.—118, N 3.—P. 199—205.
2. Иммунология инфекционного процесса / Под ред. В. И. Покровского, С. П. Гордиенко.—М., 1994.—306 с.
3. Bacteriology 330 lecture topics: *Staphylococcus*.—Madison: Kenneth Todor Univ. press, 1998.
4. Tenover F., Arbeit R., Archer G. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus* // J. Clin. Microbiol.—1994.—32.—P. 407.
5. Freney J., Kloos W. E., Hajek V., Webster J. A., Bes M., Brun Y., Vernozy-Rozand C. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. Subcommittee on the taxonomy of staphylococci and streptococci of the International Committee on Systematic Bacteriology // Int. J. Syst. Bacteriol.—1999.—49, N 2.—P. 489—502.
6. Croize J., Gialanella P., Monnet D., Okada J., Orsi A., Voss A., Merlin S. Improved identification of *Staphylococcus aureus* using a new agglutination test. Results of an international study // APMIS.—1993.—101, N 6.—P. 487—491.
7. Kochman M., Lawrynowicz M., Fordymacki P., Kaluzewski S. Evaluation of external laboratory test results for the correct identification and determination of chemotherapeutic sensitivity of staphylococci in bacteriologic provincial laboratories of sanitary-epidemiologic stations in 1995 // Med. Dosw. Mikrobiol.—1996.—48, N 3—4.—P. 131—140.
8. Luijendijk A., van Belkum A., Verbrugh H., Kluytmans J. Comparison of five tests for identification of *Staphylococcus aureus* from clinical samples // J. Clin. Microbiol.—1996.—34, N 9.—P. 2267—2269.
9. Cooke R. P., Jenkins C. T. Comparison of commercial slide agglutination kits with a tube coagulase test for the rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture // J. Clin. Pathol.—1997.—50, N 2.—P. 164—166.
10. Personne P., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Brun Y., Etienne J. Comparative performances of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of *Staphylococcus aureus* // J. Clin. Microbiol.—1997.—35, N 5.—P. 1138—1140.
11. Ros M. J., Ramirez A., Arteaga E., Alberto C., Gil J., Reina J. Infection by *Staphylococcus lugdunensis*: clinico-microbiologic characterization of 25 cases // Enferm. Infect. Microbiol. Clin.—1999.—17, N 5.—P. 223—226.
12. Nilsson M., Frykberg L., Flock J. I., Pei L., Lindberg M., Guss B. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* // Infect. Immunol.—1998.—66, N 6.—P. 2666—2673.
13. Kuusela P., Hilden P., Savolainen K., Vuento M., Lyytikäinen O., Vuopio-Varkila J. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains not identified by slide agglutination tests // J. Clin. Microbiol.—1994.—32, N 1.—P. 143—147.
14. Bruckler J., Berlich U., Schaeg W., Blobel H. Clumping-factor-reactions of *Staphylococcus aureus* of different origin in plasma- and fibrinogen-preparations // Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A].—1981.—251, N 1.—P. 27—32.
15. Usui Y. Biochemical properties of fibrinogen binding protein (clumping factor) of the staphylococcal cell surface // Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A].—1986.—262, N 3.—P. 287—297.
16. Rocha C. L., Fischetti V. A. Identification and characterization of a new protein from *Streptococcus pyogenes* having homology with fibronectin and fibrinogen binding proteins // Adv. Exp. Med. Biol.—1997.—418.—P. 737—739.
17. McDevitt D., Vaudaux P., Foster T. J. Genetic evidence that

- bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor // *Infect. Immunol.*—1992.—60, N 4.—P. 1514—1523.
18. Dickinson R. B., Nagel J. A., McDevitt D., Foster T. J., Proctor R. A., Cooper S. L. Quantitative comparison of clumping factor- and coagulase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to surface-bound fibrinogen under flow // *Infect. Immunol.*—1995.—63, N 8.—P. 3143—3150.
 19. Rupp M. E., Archer G. L. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress // *Clin. Infect. Dis.*—1994.—19.—P. 231.
 20. Vandenesch F., Lebeau C., Bes M., McDevitt D., Greenland T., Novick R. P., Etienne J. Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involves both transcriptional and post-transcriptional defects // *J. Med. Microbiol.*—1994.—40, N 5.—P. 344—349.
 21. Mlynarczyk G., Kochman M., Lawryniewicz M., Fordymacki P., Mlynarczyk A., Jeljaszewicz J. Selected properties of *Staphylococcus aureus* strains using phenotype to show a lack of coagulase synthesis // *Med. Dosw. Mikrobiol.*—1997.—49, N 1—2.—P. 5—12.
 22. Wolz C., McDevitt D., Foster T. J., Cheung A. L. Influence of *agr* on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman // *Infect. Immun.*—1996.—64, N 8.—P. 3142—3147.
 23. Espersen F., Clemmensen I., Barkholt V. Isolation of *Staphylococcus aureus* clumping factor // *Infect. Immunol.*—1985.—49, N 3.—P. 700—708.
 24. McDevitt D., Francois P., Vaudaux P., Foster T. J. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus* // *Mol. Microbiol.*—1994.—11, N 2.—P. 237—248.
 25. McDevitt D., Francois P., Vaudaux P., Foster T. J. Identification of the ligand-binding domain of the surface-located fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* // *Mol. Microbiol.*—1995.—16, N 5.—P. 895—907.
 26. Foster T. J., McDevitt D. Molecular basis of adherence of staphylococci to biomaterials // *Infections associated with indwelling medical devices* / Eds A. L. Bisno, F. A. Waldvogel.—Washington: Amer. Soc. Microbiol. publ., 1994.
 27. O'Connell D. P., Nanavaty T., McDevitt D., Gurusiddappa S., Hook M., Foster T. J. The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* has a Ca²⁺-dependent inhibitory site // *J. Biol. Chem.*—1998.—273, N 12.—P. 6821—6829.
 28. Hartford O., Francois P., Vaudaux P., Foster T. J. The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface // *Mol. Microbiol.*—1997.—25, N 6.—P. 1065—1076.
 29. McDevitt D., Foster T. J. Variation in the size of the repeat region of the fibrinogen receptor (clumping factor) of *Staphylococcus aureus* strains // *Microbiology.*—1995.—141, N 4.—P. 937—943.
 30. Ni Eidhin D., Perkins S., Francois P., Vaudaux P., Hook M., Foster T. J. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus* // *Mol. Microbiol.*—1998.—30, N 2.—P. 245—257.
 31. McDevitt D., Foster T. J. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen // *Eur. J. Biochem.*—1997.—247, N 1.—P. 416—424.
 32. Hawiger J., Kloczewiak M., Timmons S., Strong D., Doolittle R. F. Interaction of fibrinogen with staphylococcal clumping factor and with platelets // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1983.—408.—P. 521—535.
 33. Bayer A. S., Sullam P. M., Ramos M., Li C., Cheung A. L., Yeaman M. R. *Staphylococcus aureus* induces platelet aggregation via a fibrinogen-dependent mechanism which is independent of principal platelet glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen-binding domains // *Infect. Immunol.*—1995.—63, N 9.—P. 3634—3641.
 34. Vaudaux P. E., Monzillo V., Francois P., Lew D. P., Foster T. J., Berger-Bachi B. Introduction of the *mec* element (methicillin resistance) into *Staphylococcus aureus* alters *in vitro* functional activities of fibrinogen and fibronectin adhesins // *Antimicrob. Agents Chemother.*—1998.—42, N 3.—P. 564—570.
 35. Nicholas R. O., Li T., McDevitt D., Marra A., Socoloski S., Demarsh P. L., Gentry D. R. Isolation and characterization of a *sigB* deletion mutant of *Staphylococcus aureus* // *Infect. Immunol.*—1999.—67, N 7.—P. 3667—3669.
 36. Cheung A. L., Chien Y. T., Bayer A. S. Hyperproduction of alpha-hemolysin in a *sigB* mutant is associated with elevated *SarA* expression in *Staphylococcus aureus* // *Infect. Immun.*—1999.—67, N 3.—P. 1331—1337.
 37. Маянский А. Н., Присада Т. В., Невмятуллин А. Л., van Zwieten R., Roos D. Опсонинзависимый штамм *Staphylococcus epidermidis* // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.*—1997.—6.—С. 6—10.
 38. Dominiecki M. E., Weiss J. Antibacterial action of extracellular mammalian group IIA phospholipase A2 against grossly clumped *Staphylococcus aureus* // *Infect. Immunol.*—1999.—67, N 5.—P. 2299—2305.
 39. Sawai T., Tomono K., Yanagihara K., Yamamoto Y., Kaku M., Hirakata Y., Koga H., Tashiro T., Kohno S. Role of coagulase in a murine model of hematogenous pulmonary infection induced by intravenous injection of *Staphylococcus aureus* enmeshed in agar beads // *Infect. Immunol.*—1997.—65, N 2.—P. 466—471.
 40. Moreillon P., Entenza J. M., Francioli P., McDevitt D., Foster T. J., Francois P., Vaudaux P. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis // *Infect. Immunol.*—1995.—63, N 12.—P. 4738—4743.
 41. Espersen F. Interactions between human plasma proteins and cell wall components of *Staphylococcus aureus* // *Dan. Med. Bull.*—1987.—34, N 2.—P. 59—69.
 42. Mempel M., Schmidt T., Weidinger S., Schnopp C., Foster T., Ring J., Abeck D. Role of *Staphylococcus aureus* surface-associated proteins in the attachment to cultured HaCaT keratinocytes in a new adhesion assay // *J. Invest. Dermatol.*—1998.—111, N 3.—P. 452—456.
 43. Espersen F., Clemmensen I. Immunization of mice with the fibronectin-binding protein and clumping factor from *Staphylococcus aureus*: antibody response and resistance against intraperitoneal infection // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C].*—1985.—93, N 2.—P. 53—58.
 44. Espersen F. Complement activation by clumping factor and protein A from *Staphylococcus aureus* strain E 2371 // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C].*—1985.—93, N 2.—P. 59—64.

УДК 577.083.3; 612.017.1.68
Надійшла до редакції 15.11.99