

DOI: 10.7868/S0041377118100119

УЧАСТИЕ ПОВЕРХНОСТНОГО БЕЛКА *SERRATIA PROTEAMACULANS* OmpX В АДГЕЗИИ БАКТЕРИЙ К КЛЕТКАМ ЭУКАРИОТ

© О. А. Цаплина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;
электронный адрес: olga566@mail.ru

Первым этапом взаимодействия бактерий с клетками эукариот является адгезия, которая происходит в результате сложного взаимодействия бактериальных и клеточных факторов. Синтезируемый бактериями поверхностный белок способен связываться с поверхностными рецепторами клеток эукариот, участвующими в межклеточных контактах или во взаимодействии клетки с внеклеточным матриксом. Белки внешней мембраны бактерий регулируют инвазию условно-патогенных бактерий напрямую или через регуляцию адгезии. Условно-патогенные бактерии *Serratia proteamaculans*, способные проникать в клетки эукариот (Цаплина и др., 2009), содержат поверхностный белок OmpX. В настоящей работе мы показали, что трансформация бактерий *Escherichia coli* плазмидой, несущей ген *OmpX S. proteamaculans*, вызывает увеличение адгезии бактерий на поверхность клеток эукариот в 3 раза независимо от происхождения клеточной линии. Вероятно, белок OmpX *S. proteamaculans* взаимодействует с синтезируемым клеткой-хозяином белком внеклеточного матрикса фибронектином. Несмотря на увеличение адгезии, трансформация плазмидой, несущей ген *OmpX*, не придает бактериям *E. coli* способность проникать в клетки эукариот. Таким образом, мы предполагаем, что в бактериях *S. proteamaculans* OmpX может быть регулятором интенсивности адгезии, но не определять способность бактерий к инвазии.

Ключевые слова: бактериальная инвазия, адгезия бактерий, поверхностный белок бактерий, OmpX

Принятые сокращения: КОЕ — колониеобразующие единицы, ЭФР — эпидермальный фактор роста.

Первым этапом взаимодействия бактерий с клетками эукариот является адгезия, которая происходит в результате сложного взаимодействия бактериальных и клеточных факторов. Синтезируемый бактериями поверхностный белок способен связываться с поверхностными рецепторами клеток эукариот, участвующими в межклеточных контактах или во взаимодействии клетки с внеклеточным матриксом. Связывание бактериальных белков с поверхностными рецепторами клеток эукариот может запускать сигнальные каскады через конформационные изменения рецепторов и (или) их кластеризацию. У грамотрицательных бактерий белки, взаимодействующие с клетками эукариот, зажорены во внешней мембране. Многие из них являются не только посредниками адгезии, но и вызывают интернализацию бактерий (инвазию).

Белки внешней мембранны OMPs (outer membrane proteins) состоят из антипараллельных β -слоев, соединенных короткими периплазмическими витками и длинными подвижными петлями на поверхности бактерии. Поверхностные белки семейства OmpX, отличающиеся небольшими размерами (от 15 до 18 кДа), могут образовывать каналы, отвечать за устойчивость к антибиотикам и передачу сигнала, а также вирулентность, устойчивость к

киллерам, адгезию и инвазию (Meng et al., 2016). Инактивация белков семейства OmpX может приводить к уменьшению инвазии условно-патогенных бактерий, например в результате уменьшения адгезии патогенных *Escherichia coli* (ExPEC) (Meng et al., 2016) и *Yersinia pestis* (Kolodziejek et al., 2007; Tsang et al., 2010), или напрямую, без влияния на адгезию, как это показано для *Salmonella enterica* (Rosselin et al., 2010) и *Cronobacter sakazakii* (Kim et al., 2010).

Ген поверхностного белка OmpX обнаружен у условно-патогенных бактерий *Serratia proteamaculans*, способных проникать в клетки эукариот (Цаплина и др., 2009). Мы предполагаем, что OmpX может способствовать адгезии и в дальнейшем — инвазии бактерий-продуцентов. В настоящей работе для оценки участия OmpX в адгезии и инвазии *E. coli* использовали трансформацию плазмидой, несущей ген *OmpX S. proteamaculans*.

Материал и методика

Бактерии *S. proteamaculans* культивировали в среде LB (Sigma, США) при 30 °C с аэрацией. Ген *OmpX S. proteamaculans* 94 с 6-His на C-конце был вставлен в

вектор pET-21a по сайтам рестрикции NdeI/XbaI (OmpX-His₆), и полученной плазмидой трансформировали штамм *E. coli* BL-21 (DE3) (Novagen, США). После трансформации бактерии росли с аэрацией в LB при 30 °C, но не росли при 37 °C, что характерно для *S. proteamaculans*. Для получения экстрактов бактерии осаждали 10 мин при 12 000 об/мин, растворяли в буфере экстракции (0.2 мМ АТФ, 0.1 мМ CaCl₂, 5 мМ Tris/HCl, pH 7.5, 0.02 % NaN₃, (Sigma, США)), разрушали 7 циклами замораживания—оттаивания и осветляли. Для выделения из осадка белков, заложенных в мемbrane, мембранные фракции обрабатывали 2%-ным лаурилсаркозинатом натрия в течение 20 мин для удаления липидов и дважды отмывали 1%-ным лаурилсаркозинатом натрия. Для определения чувствительности OmpX к протеализину клеточный экстракт инкубировали с очищенной протеазой 24 ч при 4 °C. Белковые фракции анализировали с помощью электрофореза в 12.5%-ном ПААГ.

Клеточные линии карциномы печени человека Нер G2 и дермальные фибробласты человека DF-2 (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали на средах DMEM и DMEM/F12 (Биолот, Россия) соответственно, содержавшей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки (Sigma, США), при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ на 6-лучочном планшете до образования 70—80%-ного монослоя. Бактерии *E. coli* (OmpX-His₆) выращивали 3 сут до накопления в экстрактах электрофоретически детектируемого количества OmpX, осаждали 10 мин при 12 000 об/мин, переводили в бессывороточную среду DMEM и осаждали на поверхность клеточных линий при 2500 об/мин в течение 5 мин или добавляли к клеткам без осаждения при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ на 50 мин для определения эффективности адгезии или на 2 ч для определения эффективности инвазии. Неприкрепившиеся бактерии отмывали ФСБ, клетки снимали раствором трипсина/версена (Биолот, Россия).

Для определения интенсивности инвазии клетки инкубировали в среде DMEM с 40 мкг/мл гентамицина для инактивации внеклеточных бактерий. Инфицированные клетки разрушали 1.5%-ным дезоксицюватом Na (Sigma, США). Суспензию разводили LB при 4 °C в необходимое число раз и высевали на 1.5%-ный LB-агар (Sigma, США). Об эффективности адгезии и инвазии судили по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ).

Анализ экспрессии рецепторов клеток эукариот проводили методом полуколичественной ОТ-ПЦР. Для увеличения клеточного ответа увеличивали количество бактерий на поверхности клеток эукариот путем осаждения центрифугированием. После 50 мин инкубации клетки снимали раствором трипсина/версена, осаждали и выделяли тотальную РНК с использованием TRIzol Reagent (Invitrogen, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Для синтеза кДНК проводили обратную транскрипцию с помощью RevertAid Standart cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Последовательности ген-специфических праймеров получали с использованием программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Использовали следующие праймеры: для β-актина прямой 5'-AATCTGGCACACACCTCTACAA-3' и обратный 5'-GACGTAGCACAGCTCTCCTTA-3'; для рецептора эпидермального фактора роста фибробластов (ЭФР) прямой 5'-GTGCAGCTTCAGGACCACAA-3' и обратный

5'-AAATGCATGTGTCGAATATCTTGAG-3'; для фибронектина прямой 5'-CCCATCACAGGGTACAGAAATAG-3' и обратный 5'-CGGTGTTGTAAGGTGGAATAGA-3'.

К реакционной смеси (Синтол, Россия) добавляли 1/50 объема кДНК, 2.5 мМ MgCl₂ и 20 пМ обоих праймеров. Условия ОТ-ПЦР: первичная денатурация при 95 °C 3 мин, 40 циклов амплификации (95 °C 30 с, отжиг при 61 °C для β-актина или 58 °C для фибронектина и рецептора ЭФР в течение 30 с, 72 °C 1 мин) и финальная элонгация 15 мин при 72 °C. Количество кДНК в образцах выравнивали по количеству ПЦР-продукта с праймерами к гену β-актина.

Результаты и обсуждение

Трансформация бактерий *E. coli* BL-21 (DE3) плазмидой OmpX-His₆ приводит к тому, что *E. coli* перестают расти при 37 °C и температура их роста снижается до 30 °C, что характерно для *S. proteamaculans*. Кроме того, бактерии приобрели способность к самоагрегации, за которую белок OmpX отвечает у *Yersinia pestis* (Kolodziejek et al., 2007).

Для определения интенсивности накопления белка OmpX на разных сроках роста культуры получали экстракты бактерий и белки из мембранных фракций, которые анализировали с помощью электрофореза. Зона около 18 кДа, соответствующая молекулярной массе OmpX, в экстракте бактерий *E. coli* (OmpX-His₆) становится заметной на поздней стационарной стадии после 67 ч роста и отсутствует в экстракте контрольных *E. coli* BL-21 (рис. 1, a). При этом значительного накопления OmpX во фракции белков, выделенных из мембраны, не происходит (не показано). Генно-инженерный белок OmpX из бактериального экстракта полностью расщеплялся протеазином (рис. 1, a).

Для белков семейства OmpX показана способность связываться с рецептором ЭФР и фибронектином (Tsang et al., 2010; Wiedemann et al., 2016), тем самым вызывая прикрепление бактерий к клеточной поверхности и захват клеткой-хозяином. Интенсивность адгезии на поверхности клеток эукариот может зависеть от набора поверхностных рецепторов и белков внеклеточного матрикса, синтезируемых клеткой-хозяином. Фибронектин синтезируют фибробlastы, основная функция которых заключается в поддержании структурной целостности соединительных тканей путем непрерывной секреции предшественников всех компонентов внеклеточного матрикса. Поэтому для работы были выбраны две клеточные линии различного происхождения — дермальные фибробласты человека DF-2, синтезирующие фибронектин, и эпителио-подобные клетки карциномы печени человека Нер G2, синтезирующие рецептор ЭФР.

На первом этапе мы оценили возможность применения методики, включающей в себя осаждение бактерий на поверхности клеток с помощью центрифугирования, которая широко используется для увеличения инвазивной активности. Однако методика может нивелировать влияние на адгезию/инвазию первой стадии белок-белкового взаимодействия бактерии с поверхностью клетки-хозяина. Трансформация бактерий *E. coli* плазмидой OmpX-His₆ увеличивает адгезию на поверхности клеток DF-2 в 2 раза, если использовать осаждение бактерий центрифугированием, и в 3 раза, если осаждение не использовать. При этом абсолютное значение интенсивности ад-

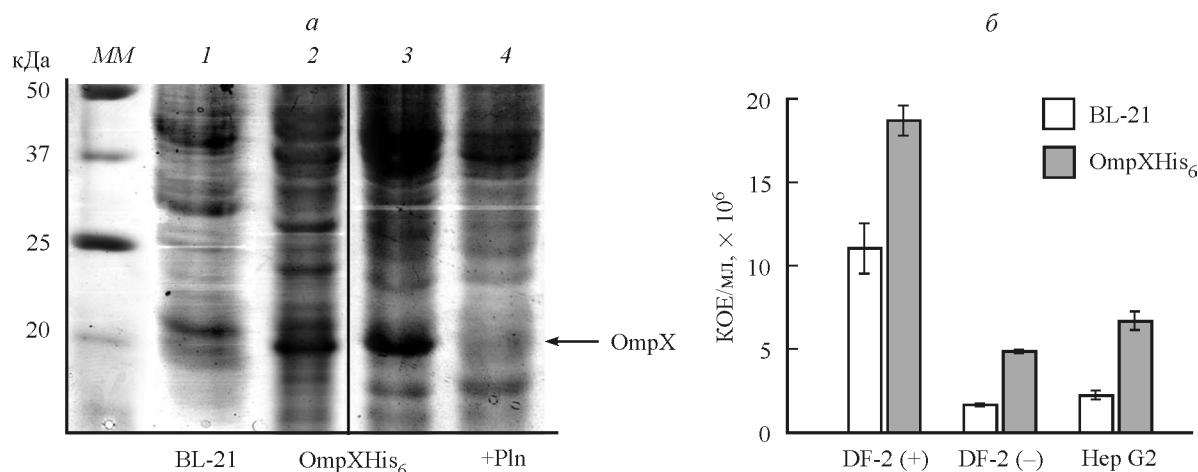


Рис. 1. Влияние генно-инженерного белка OmpX в *Escherichia coli* на адгезию штамма к клеточным линиям дермальных фибробластов человека DF-2 и карциномы печени человека Hep G2.

a — электрофореграммы экстрактов контрольного штамма *E. coli* BL-21 (дорожка 1) и *E. coli* OmpXHis₆, синтезирующего OmpX (дорожки 2, 3), до (дорожка 3) и после (дорожка 4) инкубации с очищенным протеализином (Pln). MM — маркеры молекулярной массы. *б* — интенсивность адгезии, оцененная по числу колоннеобразующих единиц (KOE), контрольного штамма *E. coli* BL-21 и *E. coli* (OmpXHis₆), синтезирующего OmpX. Бактерии после осаждения на поверхность клеточных линий (DF-2(+)) или без осаждения (DF-2(−) и Hep G2) инкубировали с культурами клеток 50 мин. Представлены средние трех независимых экспериментов, $P < 0.05$.

адгезии *E. coli* в опытах с осаждением в 5 раз выше, чем в опытах без осаждения (рис. 1, *б*). Поэтому для дальнейших экспериментов по оценке интенсивности адгезии не использовали осаждение бактерий на поверхность клеток эукариот.

Кроме оценки интенсивности адгезии к поверхности дермальных фибробластов мы проверили, прикрепляются ли *E. coli* к поверхности эпителиоидобных Hep G2. Трансформация плазмидой, несущей ген OmpX, также приводит к 3-кратному увеличению адгезии, если клетка-хозяин эпителиоидобная. Таким образом, интенсивность адгезии на поверхности клетки-хозяина не зависит от ее происхождения и от набора синтезируемых в норме поверхностных белков. При этом, несмотря на увеличение адгезии, бактерии *E. coli* не приобрели в результате трансформации плазмидой OmpXHis₆ способность проникать ни в клетки DF-2, ни в клетки Hep G2.

Чтобы выявить клеточные рецепторы, отвечающие за прикрепление бактерий-продуцентов OmpX, бактерии осаждали на поверхности клеточных линий, инкубировали 50 мин и оценивали экспрессию вероятных клеточных участников бактериальной адгезии. Для контроля использовали бактерии дикого штамма *S. proteamaculans* и штамм *E. coli* BL-21.

Рецептор ЭФР представляет собой тирозинкиназу, которая регулирует ряд ключевых процессов, а увеличение его экспрессии часто обнаруживают в различных опухолях (Zhao et al., 2013). Однако в клетках Hep G2 receptor ЭФР не экспрессируется ни в норме, ни при взаимодействии с бактериями (не показано).

Фибронектин интенсивно синтезируется клетками DF-2, и осаждение на поверхности клетки-хозяина бактерий даже дикого штамма *S. proteamaculans* не влияет на экспрессию его гена. В клетках Hep G2 в норме ген фибронектина экспрессируется слабо. Прикрепление бактерий *S. proteamaculans* и *E. coli* (OmpXHis₆) к поверхности клетки-хозяина вызывает увеличение экспрессии фибронектина в 2 раза, при этом схожий результат вызывает прикрепление контрольных *E. coli* BL-21 (рис. 2). Таким

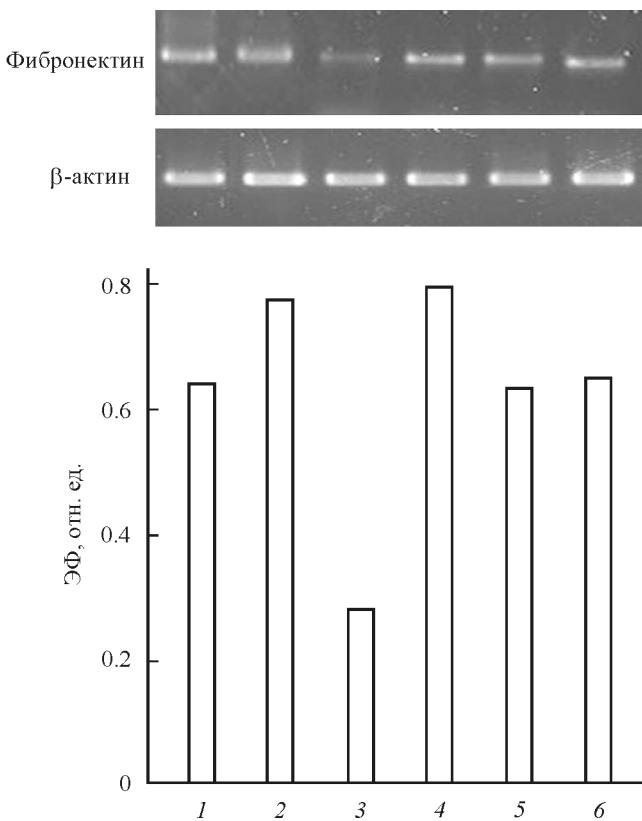


Рис. 2. Экспрессия гена фибронектина (ЭФ) в дермальных фибробластах человека DF-2 (1 и 2) и клетках карциномы печени человека Hep G2 (3—6) до (1 и 3) и после (2 и 4) осаждения на их поверхность бактерий *Serratia proteamaculans*, а также *Escherichia coli* BL-21 (5) и OmpXHis₆, синтезирующего генно-инженерный OmpX (6).

образом, даже если клетки в норме слабо экспрессируют ген фибронектина, осаждение бактерий на поверхность клетки-хозяина вызывает накопление фибронектина, с которым может связываться поверхностный белок OmpX, если бактерии его синтезируют. В результате связывания фибронектин осаждается на поверхности бактерий и, взаимодействуя со своим природным лигандом интегрином, приводит к адгезии бактерий.

Таким образом, результаты нашей работы показывают, что синтез поверхностного белка бактерий *S. proteamaculans* OmpX вызывает увеличение адгезии бактерий на поверхность клеток эукариот в 3 раза независимо от происхождения клеточной линии. Вероятно, белок OmpX *S. proteamaculans* взаимодействует с синтезируемым клеткой-хозяином белком внеклеточного матрикса фибронектином. При этом в клетках с высоким синтезом фибронектина осаждение бактерий не влияет на экспрессию его гена, а в клетках, которые в норме слабо синтезируют фибронектин, экспрессия его гена увеличивается в ответ на контакт с бактериями, что приводит к накоплению фибронектина. Несмотря на увеличение адгезии, трансформация плазмидой, несущей ген *OmpX*, не придает бактериям *E. coli* способность проникать в клетки эукариот. Таким образом, мы предполагаем, что в бактериях *S. proteamaculans* OmpX может быть регулятором интенсивности адгезии, но не определять способность бактерий к инвазии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-74-10045).

Список литературы

- Цаплина О. А., Ефремова Т. Н., Кевер Л. В., Комиссарчик Я. Ю., Демидюк И. В., Костров С. В., Хайтлина С. Ю. 2009. Выявление актиназной активности протеализина. Биохимия. 74 (6) : 797—804. (Tsaplina O. A., Efremova T. N., Kever L. V., Komissarchik Ya. Yu., Demiduk I. V., Kostrov S. V., Khaitlina S. Yu. 2009. Probing for actinase activity of protealysin. Biochemistry. 74 (6) : 648—654.)
- Kim K., Kim K. P., Choi J., Lim J. A., Lee J., Hwang S., Ryu S. 2010. Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. Appl. Environ. Microbiol. 76 : 5188—5198.
- Kolodziejek A. M., Sinclair D. J., Seo K. S., Schnider D. R., Deobald C. F., Rohde H. N., Viall A. K., Minnich S. S., Hovde C. J., Minnich S. A., Bohach G. A. 2007. Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM. Microbiology. 153 : 2941—2951.
- Meng X., Liu X., Zhang L., Hou B., Li B., Tan C., Li Z., Zhou R., Li S. 2016. Virulence characteristics of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* deletion of gene encoding the outer membrane protein X. J. Vet. Med. Sci. 78 : 1261—1267. Doi: 10.1292/jvms.16-0071.
- Rosselin M., Virlogeux-Payant I., Roy C., Bottreau E., Sizaret P. Y., Mijouin L., Germon P., Caron E., Velge P., Wiedemann A. 2010. Rck of *Salmonella enterica*, subspecies enterica serovar enteritidis, mediates zipper-like internalization. Cell Res. 20 (6) : 647—664. Doi: 10.1038/cr.2010.45.
- Tsang T. M., Felek S., Krukonis E. S. 2010. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery. Infect. Immun. 78 : 3358—3368. Doi: 10.1128/IAI.00238-10.
- Wiedemann A., Mijouin L., Ayoub M. A., Barilleau E., Canepa S., Teixeira-Gomes A.P., Le Vern Y., Rosselin M., Reiter E., Velge P. 2016. Identification of the epidermal growth factor receptor as the receptor for *Salmonella* Rck-dependent invasion. FASEB J. 30 : 4180—4191.
- Zhao P., Yang X., Qi S., Liu H., Jiang H., Hoppmann S., Cao Q., Chua M. S., So S. K., Cheng Z. 2013. Molecular imaging of hepatocellular carcinoma xenografts with epidermal growth factor receptor targeted affibody probes. Biomed Res. Int. 2013 : 759057.

Поступила 31 V 2018

PARTICIPATION OF *SERRATIA PROTEAMACULANS* OUTER MEMBRANE PROTEIN X (OmpX) IN BACTERIAL ADHESION ON EUKARYOTIC CELLS

О. А. Цаплина

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;
e-mail: olga566@mail.ru

The first stage of the interaction of bacteria with eukaryotic cells is adhesion, which occurs as a result of the complex interaction of bacterial and cellular factors. Bacterial surface proteins are capable of binding to the surface receptors of eukaryotic cells involved in intercellular contacts or in cell interactions with the extracellular matrix. Bacterial outer membrane proteins (OMPs) can regulate invasion of opportunistic bacteria directly or by regulating the adhesion. Opportunistic pathogen *Serratia proteamaculans* capable of penetration into eukaryotic cells (Tsaplina et al., 2009) contain the surface protein OmpX. In this paper we have shown that the transformation of *Escherichia coli* by a plasmid carrying the *OmpX* gene causes a 3-fold increase in the adhesion of bacteria to the surface of eukaryotic cells, which does not depend on the origin of the cell line. Probably, the *S. proteamaculans* OmpX interacts with the extracellular matrix protein fibronectin synthesized by the host cell. Despite the increase in the adhesion, the transformation by the plasmid carrying the *OmpX* gene does not confer to *E. coli* the ability to penetrate into eukaryotic cells. Thus, we assume that OmpX may regulate the efficiency *S. proteamaculans* adhesion but does not affect the invasion ability.

Ключевые слова: бактериальная инвазия, бактериальная адгезия, белок внешней мембраны, OmpX