

УДК 577.29

УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ *Serratia proteamaculans* РЕГУЛИРУЮТ ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОЕЙ ИНВАЗИИ, УВЕЛИЧИВАЯ ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

© 2024 г. О. А. Цаплина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

E-mail: olga566@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2024

После доработки 30.07.2024

Принята к публикации 05.08.2024

Бактерии *Serratia proteamaculans* способны проникать в клетки эукариот. Одним из факторов вирулентности этих бактерий является поверхностный белок бактерий OmpX, увеличивающий адгезию бактерий к поверхности клеток. Кроме того, при заражении бактериями этот поверхностный белок увеличивает в клетках-хозяина экспрессию рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина, вовлеченных в инвазию *S. proteamaculans*. С другой стороны, *S. proteamaculans* увеличивают экспрессию и гена Е-кадгерина. Задача настоящей работы заключалась в том, чтобы определить, может ли OmpX регулировать экспрессию гена Е-кадгерина, и сравнить влияние бактерий на разных стадиях их роста на экспрессию рецепторов клеток карцином, содержащих разное количество рецепторов, участвующих в инвазии. На первом этапе работы мы показали, что OmpX увеличивает экспрессию генов не только рецептора ЭФР и интегрин $\beta 1$, но и Е-кадгерина, опосредующего инвазию *S. proteamaculans*. Поэтому в этой работе бактерии использовали после 24-часового роста, когда они еще не синтезируют расщепляющую OmpX протеазу протеализин, и через 48 ч роста, когда в экстрактах бактерий детектируется активный протеализин. Бактерии через 24 и 48 ч роста вызывают увеличение экспрессии рецептора ЭФР, Е-кадгерина, $\beta 1$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрин в клетках карцином М-HeLa, A549 и Сасо-2, а также в фибробластах кожи DF-2. Степень увеличения экспрессии рецепторов зависит от свойств клеточной линии и стадии роста бактерий, а динамика увеличения экспрессии схожа только для генов рецептора ЭФР и интегрин $\beta 1$. При этом чем больше экспрессия генов рецептора ЭФР и интегрин $\beta 1$ (в зависимости от стадии роста бактерий), тем сильнее инвазия. Анализ количества рецепторов привел к заключению, что увеличение экспрессии генов рецептора ЭФР и интегрин $\beta 1$ в клетках может быть необходимо для восполнения пула рецепторов, которые перемещаются от мембраны в цитоплазму клетки хозяина при заражении. Таким образом, в результате контакта белка OmpX с клеткой-хозяином происходит накопление рецепторов, вовлеченных в инвазию бактерий *S. proteamaculans*. При этом именно увеличение экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрин определяет чувствительность зараженных клеток к *S. proteamaculans*.

Ключевые слова: бактериальная инвазия, белок внешней мембраны OmpX, *Serratia proteamaculans*, рецептор ЭФР, $\alpha 5 \beta 1$ интегрин, Е-кадгерин

Принятые сокращения: КОЕ — колониеобразующая единица; ОТ — обратная транскрипция; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ЭФР — эпидермальный фактор роста; NEAA — заменимые аминокислоты.

DOI: 10.31857/S0041377124050088, **EDN:** DUJQAR

В случае резкой иммунодепрессии организма хозяина условно-патогенные бактерии при проникновении в организм в больших количествах могут вызывать заболевания. Выделяемые из дыхательных и мочевых путей грамотрицательные бактерии *Serratia* являются факультативными патогенами для хозяев с ослабленным иммунитетом (Mahlen, 2011).

Наиболее клинически значимым штаммом рода *Serratia* является *S. marcescens* (Hejazi, Falkiner, 1997; Mahlen, 2011). Однако в ряде сообщений описываются заболевания человека при инфекции другими видами *Serratia*, включая *S. rubidaea*, *S. liquefaciens* и *S. proteamaculans* (Bollet et al., 1993; Ursua et al., 1996; Hertle, 2005). Исследования, проведенные в нашей

лаборатории, впервые показали, что бактерии *S. proteamaculans*, синтезирующие актин-специфическую протеазу протеализин, способны к инвазии в клетки человека (Tsaplina et al., 2009). Трансформация плазмидой, несущей ген протеализина, придавала неинвазивным *Escherichia coli* способность проникать в клетки эукариот (Bozhokina et al., 2011). Однако инактивация гена протеализина привела не к уменьшению, как следовало ожидать, а к увеличению инвазивной активности бактерий *S. proteamaculans* (Tsaplina et al., 2020). Это указывает на наличие факторов вирулентности *Serratia* среди бактериальных субстратов протеализина.

Ранее мы показали, что бактериальным субстратом протеализина является поверхностный белок бактерий OmpX (Tsaplina et al., 2020). Трансформация бактерий *E. coli* плазмидой, несущей ген *ompX*, увеличивает интенсивность их адгезии на поверхности зараженных клеток, но не способствует проникновению в клетки эукариот (Цаплина, 2018). Для белков семейства OmpX показана способность связываться с рецептором эпидермального фактора роста (ЭФР) (Wiedemann et al., 2016) и белком внеклеточного матрикса фибронектином (Tsang et al., 2010). Фибронектин на поверхности клеток эукариот связывается с гетеродимером $\alpha 5$ и $\beta 1$ субъединиц интегринов. Ранее мы показали, что контакт с бактериями *S. proteamaculans* приводит к перераспределению рецептора ЭФР в клетке-хозяине, схожим с перераспределением в ответ на добавление ЭФР (Tsaplina, 2020) и, по-видимому, в ответ на контакт запускаются сигнальные механизмы в клетке-хозяине. Кроме того, в ответ на заражение клеток линии М-HeLa карциномы шейки матки человека бактериями *S. proteamaculans* происходит увеличение экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина в 2–2.5 раза. Такой же эффект вызывает связывание поверхностного белка бактерий OmpX с поверхностью клетки хозяина (Tsaplina, Bozhokina, 2021). С другой стороны, в инвазии *Serratia* может участвовать Е-кадгерин, и его экспрессия увеличивается в ответ на заражение клеток человека (Tsaplina et al., 2023). В этих экспериментах моделью для оценки чувствительности клеток эукариот к бактериальной инвазии служили культивируемые клетки М-HeLa. Однако для

клеток М-HeLa не характерна гиперэкспрессия генов рецептора ЭФР и Е-кадгерина.

Увеличение экспрессии гена рецептора при заражении бактериями зависит от уровня экспрессии гена рецептора в незараженных клетках (Цаплина, 2018). Поэтому задачей настоящей работы было оценить эффект заражения бактериями *S. proteamaculans* на экспрессию рецепторов в клетках различных карцином. Для работы были выбраны клеточные линии А549 (от карциномы легкого) и Сасо-2 (от аденокарциномы ободочной кишки), для которых показано участие ЭФР в канцерогенезе. Контрольной линией служили нормальные фибробласты кожи DF-2.

В ходе работы мы выяснили, может ли OmpX вызывать увеличение экспрессии гена Е-кадгерина. Было показано, что контакт с бактериями, синтезирующими OmpX, вызывает увеличение экспрессии не только рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина, но и Е-кадгерина. В ходе оценки экспрессии генов рецепторов ЭФР, Е-кадгерина, $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -субъединиц интегрина при заражении бактериями *S. proteamaculans* мы показали, что увеличение экспрессии генов этих рецепторов происходит во всех протестированных клеточных линиях в ответ на заражение бактериями, но интенсивность увеличения зависит от клеточной линии и стадии роста бактериальной культуры. При этом степень увеличения экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина определяет чувствительность клеток к бактериям.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки карциномы шейки матки человека М-HeLa, карциномы легкого человека А549, аденокарциномы ободочной кишки человека Сасо-2 и дермальные фибробласты человека DF-2 получены из «Коллекции культур клеток позвоночных» (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). М-HeLa выращивали на среде Игла MEM с 1% набором заменимых аминокислот, А549 и Сасо-2 – на среде DMEM, DF-2 на среде DMEM/F12 (“Биолот”, Россия). Все среды содержали 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma, США). Клетки культивировали на 12-луночной планшете при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ до образования 70–80% монослоя.

Бактерии *S. proteamaculans* 94 выращивали 24 или 48 ч в среде LB (Sigma, США) при

30 °C с аэрацией. Для оценки эффекта OmpX на экспрессию рецепторов зараженной клетки использовали бактерии *Escherichia coli* BL-21, трансформированные плазмидой pET-21a, несущей ген белка OmpX *S. proteamaculans* (Цаплина, 2018). Бактерии *E. coli* (OmpX) без индукции синтезируют белок OmpX, который детектируется как в экстрактах (Цаплина, 2018), так и в мембранной фракции бактерий (Tsaplina et al., 2020). Для контроля использовали *E. coli* BL-21, трансформированные плазмидой pET-21a без гена OmpX.

Оценка бактериальной инвазии. Бактерии *S. proteamaculans* 94 через 24 или 48 ч роста осаждали 10 мин при 12 100 g (Tsaplina et al., 2009). Чтобы избежать перехода на логарифмическую стадию роста, бактерии переводили в среду DMEM без сыворотки, по объему равному первоначальной бактериальной суспензии, и осаждали на поверхность клеток эукариот центрифугированием 5 мин при 560 g для последующего 2-часового выдерживания при 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Для количественной оценки инвазии неприкрепившиеся бактерии отмывали PBS, клетки снимали раствором трипсин–версен (“Биолот”, Россия). При определении интенсивности инвазии клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 40 мкг/мл гентамицина для инактивации внеклеточных бактерий. Инфицированные клетки разрушали дезоксихалатом натрия (1.5 %; Sigma, США). Суспензию разводили средой LB при 4 °C в необходимое число раз и производили высеив на 1.5%-ный агар (на

среде LB) (Sigma, США). Об эффективности инвазии судили по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ).

Оценка экспрессии рецепторов (Е-кадгерина, рецептора ЭФР, β1- и α5-субъединиц интегрина) клеток эукариот. Использовали метод количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ). Через 2 ч инкубации с бактериями клетки снимали смесью трипсин–версен, осаждали 8 мин центрифугированием при 12 100 g и экстрагировали тотальную РНК с помощью набора для экстракции РНК из культур клеток согласно инструкции производителя (“Диа-М”, Россия). Обратную транскрипцию и амплификацию проводили с помощью BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (“Биолабмикс”, Россия) с использованием аппарата для ПЦР в реальном времени CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

Этапы ПЦР включали первоначальный синтез кДНК при 45 °C в течение 30 мин, денатурацию при 95 °C 5 мин и 40 циклов амплификации (95 °C 30 с, отжиг при 60 и 72 °C по 30 с). Каждый образец анализировали трижды. Экспрессию целевого гена нормализовали по экспрессии генов домашнего хозяйства (β-актина и *GADPH*) и рассчитывали с использованием метода 2-ΔΔСТ. Пары генспецифических праймеров (“Евроген”, Москва, Россия), сконструированные с помощью программы BLAST-primer и используемые для ПЦР в реальном времени, приведены в табл. 1.

Оценка количества рецепторов (Е-кадгерина, рецептора ЭФР, β1- и α5-субъединиц интегрина)

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген мишень	Последовательность праймера
α5-Интегрин	Прямой: 5'-GGCTTCAACTTAGACGCGGA-3' Обратный: 5'-AAGCCTCCTTGGCAGTAACC-3'
β-Интегрин	Прямой: 5'-GACGCCGCGCGGAAAAAG-3' Обратный: 5'-ATCTGGAGGGCAACCCTTCT-3'
Рецептора ЭФР	Прямой: 5'-GTGCAGCTTCAGGACCACAA-3' Обратный: 5'-AAATGCATGTGTCTGAATATCTTGAG-3'
Е-кадгерин	Прямой: 5'-ATGCTGATGCCCCCAATACC-3' Обратный: 5'-GGGGGCTTCATTACATCCA-3'
α-Актин	Прямой: 5'-AATCTGGCACCACACCTTCTACA-3' Обратный: 5'-GACGTAGCACAGCTTCTCGTTA-3'
<i>GADPH</i>	Прямой: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' Обратный: 5'-TGCAACCAACTGCTTAGC-3'

и фибронектина в зараженных клетках. Клетки после инкубации с *S. proteamaculans* инкубировали в буфере для электрофореза (4% SDS, 24% глицерина, 200 мМ ДТТ, 0.01% бромфенолового синего, 125 мМ трис-HCl, pH 6.8) в течение 5 мин при 56 °С. Клетки соскабливали с планшета с последующим кипячением в течение 5 мин. Образцы фракционировали с помощью SDS–PAGE и переносили на мембрану Hybond ECL в соответствии с инструкциями производителя (GE Healthcare, Великобритания). Мембрану инкубировали с 5%-ным обезжиренным молоком в PBS в течение 40 мин для предотвращения неспецифического связывания антител, а затем инкубировали с антителами против Е-кадгерина (ab151484) в разведении 1:500; против рецептора ЭФР (E235), β 1-интегрина (EPR16895), α 5-интегрина (EPR7854), фибронектина (EP-5) и GADPH в разведении 1:1000 (все антитела от Abcam, Великобритания) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем мембрану трижды промывали промывочным буфером (5% обезжиренного молока и 0.1% Твина 20 в PBS) в течение 10 мин, инкубировали в течение 2 ч с вторичными антителами (ab205718; Abcam, Великобритания; разведение 1:20 000) против IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена. Блоты трижды промывали промывочным буфером и проявляли с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West FEMTO (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Заражение клеток М-HeLa условно-патогенными бактериями *S. proteamaculans* увеличивает экспрессию генов не только рецептора ЭФР и интегрин β 1, но и Е-кадгерина (Tsaplina et al., 2023). Ранее мы показали, что экспрессия генов рецептора ЭФР и β 1-интегрин увеличивается в результате взаимодействия поверхностного белка бактерий OmpX с поверхностью клетки-хозяина (Tsaplina, Bozhokina, 2021). Для того, чтобы определить увеличивает ли экспрессию Е-кадгерина синтез бактериями белка OmpX *S. proteamaculans*, мы использовали генно-инженерные бактерии *E. coli* (OmpX). Было показано, что инкубация клеток М-HeLa с бактериями *E. coli* (OmpX) так же, как и инку-

бация с *S. proteamaculans*, увеличивает экспрессию Е-кадгерина в 2.5 раза, в отличие от инкубации этих же клеток с контрольными *E. coli* (pET21) (рис. 1a). Таким образом, заражение клеток М-HeLa бактериями, синтезирующими OmpX, увеличивает экспрессию генов не только рецептора ЭФР и β 1-интегрин, но и Е-кадгерина, опосредующего инвазию *S. proteamaculans*.

На поздней стационарной стадии роста бактерии *S. proteamaculans* начинают синтезировать активную протеазу протеализин, субстратом которой является OmpX (Tsaplina et al., 2009; Tsaplina et al., 2020). С другой стороны, согласно анализу последовательности OmpX, сайт расщепления протеализином не доступен для протеолиза после встраивания поверхностного белка в бактериальную мембрану (Tsaplina et al., 2020). Поэтому мы сравнили влияние заражения бактериями на ранней стационарной стадии роста (24 ч), когда протеализин еще неактивен, и на поздней (48 ч роста). Анализ проводили на клеточных линиях карцином — М-HeLa, Сасо-2 и А549. В качестве контроля использовали клеточную линию нормальных дермальных фибробластов DF-2. С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени было показано, что заражение бактериями увеличивает экспрессию Е-кадгерина во всех тестируемых клеточных линиях. В фибробластах, которые в норме практически не синтезируют Е-кадгерин, заражение бактериями *S. proteamaculans* тоже вызывало усиление экспрессии Е-кадгерина. При этом экспрессия Е-кадгерина в Сасо-2 увеличивается значительно больше бактериями через 24 ч роста, а в клетках М-HeLa и А549 — бактериями через 48 ч роста. По-видимому, это объясняется тем, что бактерии на разных стадиях роста обладают различным набором поверхностных белков, а клетки-хозяина — различным набором поверхностных рецепторов. И именно соотношение поверхностных белков бактерий и клеточных рецепторов определяет ответ клетки на заражение бактериями.

Мы проанализировали эффект заражения бактериями *S. proteamaculans* (после 24- и 48-часового роста) на экспрессию генов рецептора ЭФР и β 1-интегрин клеток тех же линий. Оказалось, что заражение бактериями вызывает увеличение экспрессии β 1-интегрин во всех использованных клеточных линиях. При этом его экспрессия в клетках Сасо-2 и DF-2

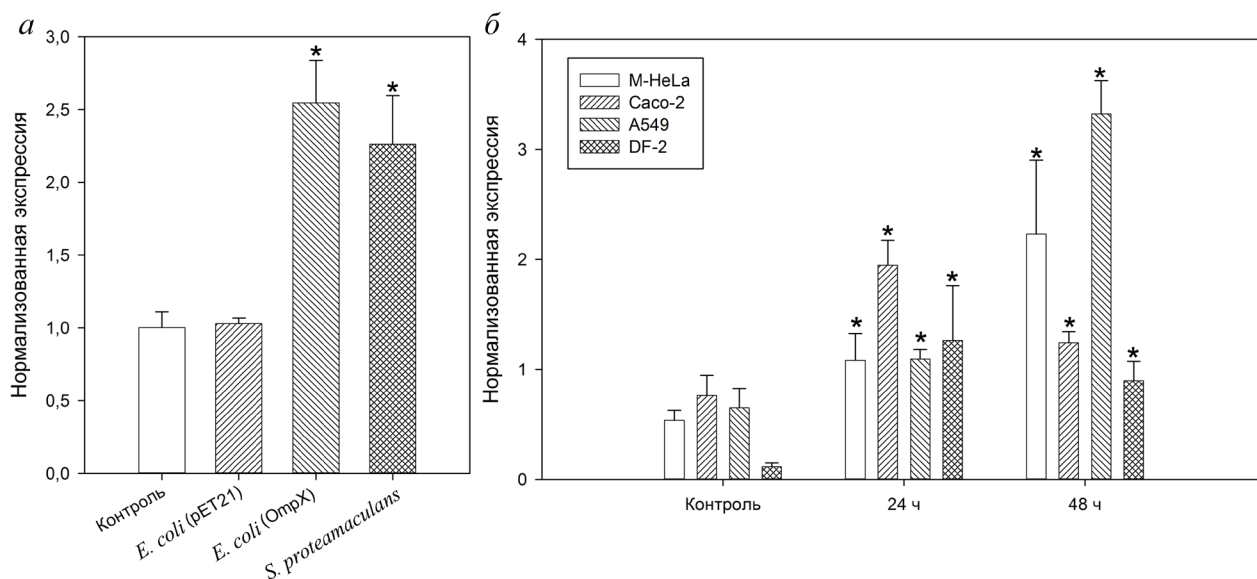


Рис. 1. Влияние контакта с бактериями, синтезирующими OmpX, на экспрессию гена E-кадгерина клеткой-хозяином.

а — в клетках М-HeLa после 2-часовой инкубации с бактериями *S. proteamaculans* и *Escherichia coli* (OmpX) на стадии роста 48 ч. *E. coli* (pET21) использовали в качестве контроля бактерий, не синтезирующих OmpX. **б** — то же, но бактерии *S. proteamaculans* на стадии роста 24 и 48 ч. Контроль — незараженные клетки. *GAPDH* и β -актин использовали в качестве внутреннего контроля. Различие с экспрессией E-кадгерина в незараженных клетках считали достоверным при $*P < 0.05$.

сильнее увеличивается в ответ на заражение бактериями на ранней стационарной стадии роста, а в клетках A549 — в ответ на заражение бактериями на поздней стадии роста; клетки М-HeLa одинаково отвечают на заражение бактериями этих двух стадий роста (рис. 2а). Экспрессия гена рецептора ЭФР имеет схожую тенденцию к увеличению (рис. 2б). Кроме того, мы обнаружили, что в клетках линии Сасо-2 экспрессия гена рецептора ЭФР в ответ на заражение бактериями на поздней стационарной стадии роста практически не увеличивается.

Для связывания с субстратом $\beta 1$ -субъединица интегрина на поверхности клетки хозяина образует гетеродимеры с α -интегрином. С фибронектином и поверхностными белками бактерий связывается $\alpha 5 \beta 1$ интегрин (Joh et al., 1999). Поэтому мы проанализировали эффект заражения бактериями *S. proteamaculans* после 24- и 48-часового роста на экспрессию гена $\alpha 5$ -интегрина в тех же клетках карцином (рис. 2в). Было показано, что в этом случае заражение бактериями *S. proteamaculans* увеличивает экспрессию $\alpha 5$ -интегрина во всех клеточных линиях, но характер увеличения экспрессии этой субъединицы интегрина отличается от характера увеличения

экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина. Экспрессия $\alpha 5$ -интегрина в клетках Сасо-2 после заражения бактериями обеих стадий роста не различается. В клетках М-HeLa более сильное увеличение экспрессии $\alpha 5$ -интегрина вызывают 24-часовые бактерии, а в клетках A549 и DF-2 — 48-часовые. Таким образом, бактерии ранней (24 ч) и поздней (48 ч) стадий роста увеличивают интенсивность экспрессии E-кадгерина, $\beta 1$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрина, а также рецептора ЭФР в клетках всех тестируемых клеточных линий. При этом заражение бактериями разных стадий роста (24 и 48 ч) вызывает схожий эффект только в случае экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина.

Ранее мы показали, что увеличение экспрессии рецептора ЭФР определяет интенсивность инвазии бактерий *S. proteamaculans* (Berson et al., 2023). Поэтому динамику увеличения экспрессии гена рецепторов клеток при заражении бактериями этих же стадий роста мы сопоставили с динамикой интенсивности инвазии бактерий в клетки М-HeLa, A549, Сасо-2 и DF-2 с помощью количественного микробиологического метода (рис. 3). Интенсивность инвазии 48-часовых *S. proteamaculans* в клетки A549 в 3.5

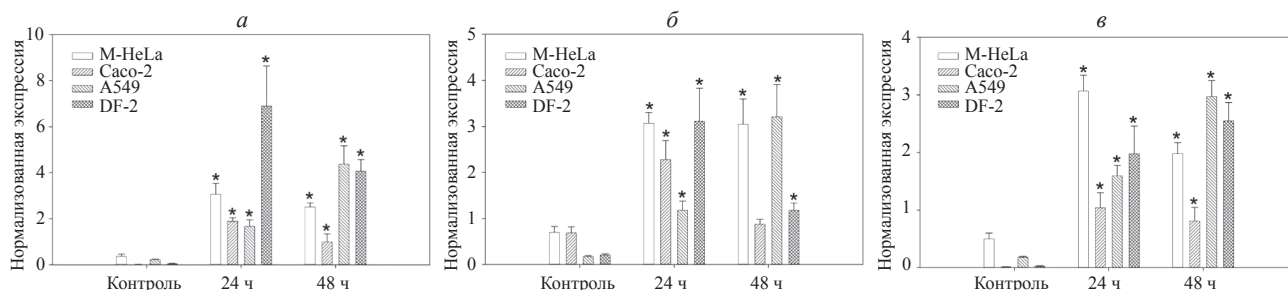


Рис. 2. Экспрессия $\beta 1$ -интегрина (a), рецептора ЭФР (б) и $\alpha 5$ -интегрина (в) в клетках эукариот при контакте с бактериями *S. proteamaculans*. Бактерии через 24 и 48 ч роста добавляли к клеткам на 2 ч. Контроль — незагрязненные клетки. GAPDH и β -актин использовали в качестве внутреннего контроля. Различия с экспрессией рецепторов в незагрязненных клетках считали достоверным при $*P < 0.05$.

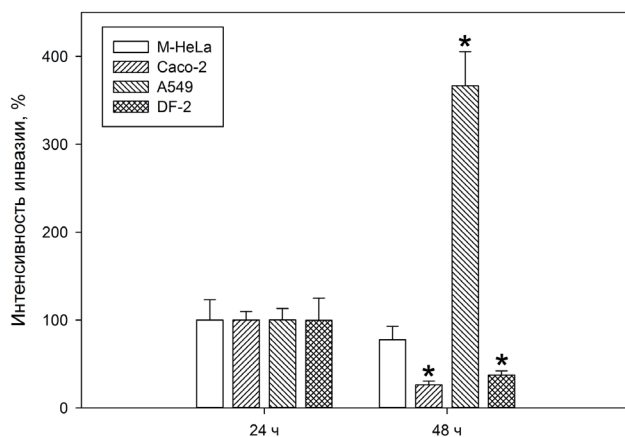


Рис. 3. Интенсивность инвазии бактерий *S. proteamaculans* в клетки эукариот. Бактерии на стадии роста 24 и 48 ч добавляли к клеткам эукариот на 2 ч. Интенсивность инвазии 24-часовых бактерий принимали за 100%. Различия интенсивности инвазии бактерий разных стадий роста считали достоверным при $*P < 0.05$.

раза выше, чем 24-часовых бактерий, в клетки Caco-2 и DF-2 — ниже в 4 и 3 раза соответственно, а в клетки M-HeLa бактерии разных стадий роста проникают одинаково. Таким образом, интенсивность инвазии бактерий на разных стадиях их роста определяется увеличением экспрессии рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина.

Бактерии *S. proteamaculans* на стадии 48 ч роста вызывают более интенсивное увеличение экспрессии белков интереса клеток A549 по сравнению с 24-часовой культурой бактерий. Мы сравнили между собой уровни генов экспрессии рецепторов (Е-кадгерина, рецептора ЭФР, $\beta 1$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрина), нормированные на актин в клетках A549 до и после заражения 48-часовыми *S. proteamaculans*. Дополнительно мы оценили влияние заражения бактериями на экспрессию

фибронектина, с которым связывается $\alpha 5 \beta 1$ -интегрин. Мы показали, что независимо от уровня экспрессии генов Е-кадгерина, рецептора ЭФР, $\beta 1$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегрина и фибронектина в неинфицированных клетках, при заражении бактериями *S. proteamaculans* экспрессия тестируемых белков клетки-хозяина возрастает до одного и того же уровня, который в 3–4 раза выше экспрессии актина (рис. 4a). При этом, согласно данным Вестерн-блот-анализа, заражение бактериями приводит к накоплению только фибронектина и появлению фрагментов Е-кадгерина, а количество рецептора ЭФР и интегрина остается неизменным (рис. 4б). По-видимому, увеличение экспрессии рецепторов необходимо для восполнения пула рецепторов, попавших в цитоплазму клетки-хозяина в результате запуска сигнальных механизмов при контакте с *S. proteamaculans* (Tsaplina, 2020).

ОБСУЖДЕНИЕ

$\beta 1$ -интегрин и рецептор ЭФР вовлечены в миграцию и метастазирование раковых клеток и считаются перспективными мишенями для таргетной терапии распространения опухолевых клеток (Morello et al., 2011). Оверэкспрессия или постоянная активация рецептора ЭФР при раке легкого коррелирует с негативным прогнозом для пациента. Нарушение нормальной активности рецептора ЭФР способствует злокачественному развитию клеток, обеспечивая их пролиферативное преимущество и способствуя миграции и инвазивности клеток (Morello et al., 2011), что делает рецептор ЭФР мишенью для таргетной терапии. Использование ингибиторов киназы рецептора ЭФР имеет ограничения, потому что почти все пациенты

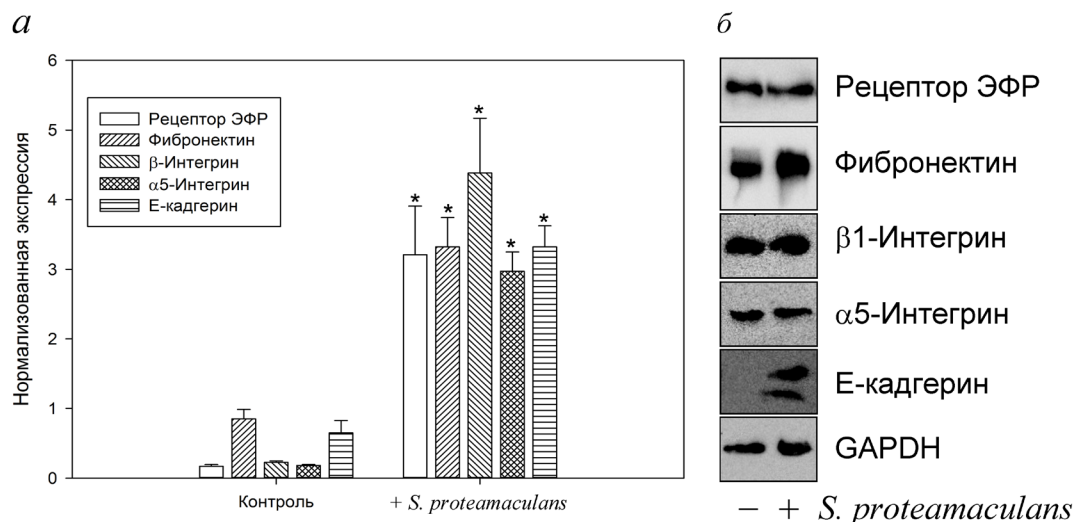


Рис. 4. Экспрессия (а, ОТ-ПЦР) и содержание (б, Вестерн-блоттинг) ряда белков (рецептора ЭФР, фибронектина, β1- и α5-субъединиц интегрина, Е-кадгерина) в клетках А549 при их контакте с бактериями *S. proteamaculans*. Бактерии на стадии роста 48 ч добавляли к клеткам эукариот на 2 ч. Контроль — незараженные клетки. β-Актин (ОТ-ПЦР) и GAPDH (Вестерн-блоттинг) использовали в качестве внутреннего контроля. Разницу экспрессии относительно незараженных клеток считали достоверной при $*P < 0.05$.

быстро привыкают к препарату и становятся устойчивыми к дальнейшему лечению (Nguyen et al., 2009; Yoshida et al., 2010).

Все больше данных указывает на то, что и интегрины играют важную роль в развитии опухоли. Повышенная экспрессия α5β1 интегрин также является плохим прогностическим фактором для выживаемости пациентов (Dingemans et al., 2010). Показано, что в клетках карциномы легкого А549 β1-интегрин контролирует передачу сигналов от рецептора ЭФР и рециклирование рецептора ЭФР на клеточной мембране (Morello et al., 2011). Мы показали, что заражение бактериями *S. proteamaculans* всех тестируемых клеток карцином увеличивает экспрессию рецептора ЭФР, а также экспрессию α5- и β1-субъединиц интегрин.

Е-кадгерин играет важную роль в качестве белка-супрессора миграции при раке, поскольку потеря его экспрессии и (или) нарушение функции приводит к повышенной способности клеток вторгаться в соседние ткани (Paredes et al., 2012). Е-кадгерин представляет собой молекулы на поверхности эпителиальных клеток, которые участвуют в межклеточной адгезии за счет установления кальций-зависимых взаимодействий в местах межклеточных контактов, и нарушение межклеточных контактов напрямую приводит к миграции раковых клеток по организму.

Кроме того, Е-кадгерин может образовывать комплексы с рецептором ЭФР (Qian et al., 2004). Множественные межклеточные адгезионные контакты при избытке Е-кадгерина препятствует активации рецептора ЭФР при связывании лиганда (Takahashi, Suzuki, 1996), но, как было обнаружено, Е-кадгерин может временно и активировать рецептор ЭФР при образовании межклеточных контактов (Ресе, Gutkind, 2000). Кроме того, при отщеплении бактериальными протеазами или мембраносвязанными ферментами клетки-хозяина (шеддазами) внеклеточный фрагмент Е-кадгерина может связываться с рецептором ЭФР и активировать фосфорилирование, способствуя метастазированию раковых клеток (Hu et al., 2016). Ранее мы показали, что при заражении бактериями *Serratia* в клетках карцином М-Не-Ла и А549 также появляются фрагменты Е-кадгерина, образованные в результате протеолиза (Tsaplina et al., 2023). В настоящей работе мы показали, что к увеличению экспрессии Е-кадгерина приводит контакт клетки-хозяина с поверхностным белком бактерий OmpX. Таким образом, заражение клеток эукариот бактериями *S. proteamaculans* увеличивает экспрессию и Е-кадгерина, фрагмент которого, образованный в результате протеолиза, может активировать рецептор ЭФР. С другой стороны, мы показали, что увеличение экспрессии про-

исходит не только в клетках карцином, но и в дермальных фибробластах кожи. Однако экспрессия этих рецепторов именно в клетках карцином может играть ключевую роль в их распространении по организму.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате контакта внешнего мембранного белка бактерий OmpX с поверхностью клеток человека происходит увеличение экспрессии рецептора ЭФР, Е-кадгерина, субъединиц $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегринов, которые вовлечены в инвазию бактерий *S. proteamaculans*. Степень увеличения экспрессии рецепторов зависит от свойств клеточной линии и стадии роста бактерий. Динамика увеличения интенсивности экспрессии протестированных рецепторов в зависимости от стадии роста бактериальной культуры сходна только для генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина. И именно она определяет интенсивность инвазии бактерий в клетки. Кроме того, в клетках A549 увеличение экспрессии генов рецептора ЭФР и $\beta 1$ -интегрина может быть необходимо для восполнения пула рецепторов, которые перемещаются от мембраны в цитоплазму клетки хозяина при заражении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-25-20045) и Санкт-Петербургского научного фонда (проект № 24-25-20045).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Цаплина О. 2018. Участие поверхностного белка *Serratia proteamaculans* OmpX в адгезии бактерий к клеткам эукариот. Цитология. Т. 60. № 10. С. 817. (Tsaplina O. 2018. Participation of *Serratia proteamaculans* ompX in bacterial adhesion on eukaryotic cells. Tsitologiya. V. 60. No. 10. P. 817.)
- Berson Y., Khaitlina S., Tsaplina O. 2023. Involvement of lipid rafts in the invasion of opportunistic bacteria *Serratia* into Eukaryotic Cells. Int J. Mol. Sci. V. 24. P. 9029.
- Bollet C., Grimont P., Gainnier M., Geissler A., Sainty J. M., De Micco P. 1993. Fatal pneumonia due to *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora*. J. Clin. Microbiol. V. 31. P. 444.
- Bozhokina E. S., Tsaplina O. A., Efremova T. N., Kever L. V., Demidyuk I. V., Kostrov S. V., Adam T., Komissarchik Y. Y., Khaitlina S. Y. 2011. Bacterial invasion of eukaryotic cells can be mediated by actin-hydrolysing metalloproteases grimeysin and protealysin. Cell Biology International. V. 35. P. 111–118.
- Dingemans A. M., van den Boogaart V., Vosse B.A., van Suylen R. J., Griffioen A. W., Thijssen V. L. 2010. Integrin expression profiling identifies integrin $\alpha 5$ and $\beta 1$ as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. Mol. Cancer. V. 9. P. 152.
- Hejazi A., Falkner F. R. 1997. *Serratia marcescens*. J Med Microbiol. V. 46. P. 903–912.
- Hertle R. 2005. The family of *Serratia* type pore forming toxins. Curr Protein Pept Sci. V. 6. P. 313–325.
- Hu Q. P., Kuang J. Y., Yang Q. K., Bian X. W., Yu S. C. 2016. Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. Int. J. Cancer. V. 138. P. 2804–2812.
- Joh D., Wann E. R., Kreikemeyer B., Speziale P., Hook M. 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. Matrix Biol. V. 18. P. 211.
- Mahlen S. D. 2011. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clin. Microbiol. Rev. V. 24. P. 755.
- Morello V., Cabodi S., Sigismund S., Camacho-Leal M. P., Repetto D., Volante M., Papotti M., Turco E., Defilippi P. 2011. Beta 1 integrin controls EGFR signaling and tumorigenic properties of lung cancer cells. Oncogene. V. 30. P. 4087.
- Nguyen K. S., Kobayashi S., Costa D. B. 2009. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. Clin. Lung Cancer. V. 10. P. 281.
- Paredes J., Figueiredo J., Albergaria A., Oliveira P., Carvalho J., Ribeiro A. S., Caldeira J., Costa A. M., Simoes-Correia J., Oliveira M. J., Pinheiro H., Pinho S. S., Mateus R., Reis C. A., Leite M., Fernandes M. S., Schmitt F., Carneiro F., Figueiredo C., Oliveira C., Seruca R. 2012. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. Biochim. Biophys. Acta. V. 1826. P. 297.
- Pece S., Gutkind J. S. 2000. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. J. Biol. Chem. V. 275. P. 41227.
- Qian X., Karpova T., Sheppard A. M., McNally J., Lowy D. R. 2004. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. EMBO J. V. 23. P. 1739.
- Takahashi K., Suzuki K. 1996. Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadher-

- in-mediated cell-cell adhesion. Exp. Cell. Res. V. 226. P. 214.
- 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. V. 78. P. 3358.
- Tsaplina O., Bozhokina E. 2021. Bacterial outer membrane protein OmpX regulates beta1 integrin and epidermal growth factor receptor (EGFR) involved in invasion of M-HeLa cells by *Serratia proteamaculans*. Int. J. Mol. Sci. V. 22. P. 13246.
- Tsaplina O., Demidyuk I., Artamonova T., Khodorkovsky M., Khaitlina S. 2020. Cleavage of the outer membrane protein OmpX by protealysin regulates *Serratia proteamaculans* invasion. FEBS Lett. V. 594. P. 3095.
- Tsaplina O., Lomert E., Berson Y. 2023. Host-cell-dependent roles of e-cadherin in *Serratia* Invasion. Int. J. Mol. Sci. V. 24. P. 17075.
- Tsaplina O. A. 2020. Redistribution of EGF receptor and $\alpha 5$, $\beta 1$ integrins in response to infection of epithelial cells by *Serratia proteamaculans*. Cell and Tissue Biology. V. 14. P. 440.
- Tsaplina O. A., Efremova T. N., Kever L. V., Komissarchik Y. Y., Demidyuk I. V., Kostrov S. V., Khaitlina S. Y. 2009. Probing for actinase activity of protealysin. Biochemistry (Moscow). V. 74. P. 648.
- Ursua P. R., Unzaga M. J., Melero P., Iturburu I., Ezpeleta C., Cisterna R. 1996. *Serratia rubidaea* as an invasive pathogen. J. Clin. Microbiol. V. 34. P. 216.
- 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. V. 30. P. 4180.
- Yoshida T., Zhang G., Haura E. B. 2010. Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer. Biochem. Pharmacol. V. 80. P. 613.

OPPORTUNISTIC BACTERIA SERRATIA PROTEAMACULANS REGULATE THE INTENSITY OF THEIR INVASION BY INCREASING THE EXPRESSION OF HOST CELL SURFACE RECEPTORS

O. A. Tsaplina

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Russia

E-mail: olga566@mail.ru

The *Serratia proteamaculans* are able to penetrate eukaryotic cells. One of the virulence factors of these bacteria is the bacterial surface protein OmpX. The OmpX protein increases the adhesion of bacteria to the surface of eukaryotic cells. In addition, this protein increases the gene expression of the EGF receptor and $\beta 1$ integrin, which determine the intensity of *S. proteamaculans* invasion. We show that OmpX also increases the expression of E-cadherin, which is involved in *S. proteamaculans* invasion. The objective of this work was to compare the effect of bacteria at different growth stages on the gene expression of receptors in carcinoma cells, which normally synthesize different numbers of receptors involved in invasion. Bacteria were used after 24 hours of growth, when they had not yet synthesized the OmpX-cleaving protease protealysin, and after 48 hours of growth, when active protealysin was detected in bacterial extracts. After 24 and 48 hours of growth, the bacteria induce an increase in the gene expression of EGF receptor, E-cadherin, $\beta 1$ and $\alpha 5$ integrins in M-HeLa cervical carcinoma cells, A549 lung carcinoma cells, Caco-2 colon adenocarcinoma cells, and DF-2 skin fibroblasts. The intensity of the increase in receptor expression depends on the properties of the cell line and the growth stage of the bacteria. Moreover, infection with *S. proteamaculans* causes a similar increase in the expression of only the EGF receptor and $\beta 1$ integrin. Using quantitative invasion, it was shown that the intensity of bacterial invasion, depending on the growth stage of the bacterial culture, correlates with the dynamics of increased gene expression of the EGF receptor and $\beta 1$ integrin. When analyzing the number of receptors, it was shown that an increase in the gene expression of the EGF receptor and $\beta 1$ integrin in cells may be necessary to replenish the pool of receptors that move from the membrane into the cytoplasm of the host cell during infection. Thus, as a result of contact of the bacterial surface protein OmpX with the surface of a human cell, receptors involved in *S. proteamaculans* invasion accumulate. Moreover, it is the increase in the gene expression of the EGF receptor and $\beta 1$ -integrin that determines the sensitivity of infected cells to *S. proteamaculans*.

Keywords: bacterial invasion, protealysin, outer membrane protein OmpX, *Serratia proteamaculans*, EGFR, $\alpha 5\beta 1$ integrin, E-cadherin