

АДГЕЗИВНОСТЬ ПОРИНОВ OmpF И OmpC *Yersinia pseudotuberculosis* К МАКРОФАГАМ J774

© 2018 г. А.А. Бывалов* **, И.В. Коньшев* **, О.Д. Новикова***,
О.Ю. Поргнягина***, В.С. Белозеров* **, В.А. Хоменко***, В.Н. Давыдова***

*Вятский государственный университет, 610000, Киров, ул. Московская, 36

E-mail: byvalov@nextmail.ru

**Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, 167982, Сыктывкар, ул. Первомайская, 50

***Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

E-mail: novolga_05@mail.ru

Поступила в редакцию 03.07.18 г.

Методом оптической ловушки оценена значимость поринов OmpF и OmpC *Yersinia pseudotuberculosis* в адгезивности микроба к макрофагам J774. Верифицирован факт пассивной сенсбилизации полистироловых микросфер препаратами указанных поринов. С использованием набора разнокачественно функционализированных микросфер показано, что порин OmpF, продуцируемый при пониженной температуре культивирования, участвует в адгезивности бактерий *Y. pseudotuberculosis* к макрофагам; порин OmpC, синтезируемый при температуре 37°C, указанным свойством не обладает. Эти результаты могут объясняться термоиндуцибельными различиями в первичной структуре и конформационных особенностях наружных петель молекул пориновых белков. Высказано предположение о значимости названных различий для эффективной циркуляции в природе и проявления инвазивных свойств *Y. pseudotuberculosis* как возбудителя сапрозоонозной инфекции.

Ключевые слова: адгезивность, порины, *Y. pseudotuberculosis*, макрофаг, метод оптической ловушки.

DOI: 10.1134/S0006302918050101

Псевдотуберкулез – сапрозоонозное заболевание, распространенное во многих регионах России (Западная Сибирь, Европейская часть, Дальний Восток), странах Европы, Азии, Северной и Южной Америки. *Y. pseudotuberculosis* – один из трех представителей рода *Yersinia*, патогенных для человека. Являясь энтеропатогеном, он вызывает заболевание, характеризующееся разнообразной клинической картиной с вовлечением в инфекционный процесс различных органов и тканей, главным образом, тонкого кишечника.

Первая стадия взаимодействия энтеропатогенных бактерий с макроорганизмом – это адгезия микроба к клеткам слизистой кишечника и далее, в случае преодоления этого барьера, – к иммунокомпетентным клеткам и иным клеткам-мишеням хозяина. Адгезия бактерий к эукариотическим клеткам может осуществляться с

помощью специализированных рецепторов последних [1] либо неспецифически. Со стороны микроорганизма функцию адгезии выполняют специальные поверхностные структуры различной морфологии и химического состава [2].

Свойства белков наружной мембраны как факторов вирулентности грамотрицательных бактерий, в частности поринов, достаточно широко освещаются в литературе. Как многофункциональные белки порины могут выполнять, в том числе, функции поверхностных адгезинов. Исследованию роли поринов на начальных этапах развития инфекционного процесса, а именно адгезии и инвазии патогенных бактерий в клетки макроорганизма, уделяется особое внимание.

Показано, что основной белок наружной мембраны *Rahnella aquatilis* (OMP), который имеет кажущуюся молекулярную массу 38 кДа, участвует в адгезии этого организма к корням пшеницы [3]. N-концевая аминокислотная последовательность этого белка указывает на то, что его можно отнести к семейству энтеробактериальных поринов.

Сокращения: Ат – антитела, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, БСА – бычий сывороточный альбумин, ТИФА – твердофазный иммуноферментный анализ, FITC – изоцианат флуоресцеина.

Опосредованная роль поринов наружной мембраны в проявлении адгезивных свойств бактериальных клеток показана также для *Pseudomonas fluorescens* [4]. Как правило, адаптацию псевдомонад к различным экологическим нишам связывают с процессом образования биопленок, которому предшествует бактериальная адгезия. Авторы изучили влияние температуры на адгезивную способность *P. fluorescens* на инертных носителях. Не получив прямого доказательства существенной роли порина OmpF в процессе адгезии, авторы тем не менее сделали вывод об опосредованном участии этого белка в адаптации псевдомонад к температуре окружающей среды, поскольку адгезивные свойства этих микроорганизмов зависели от температуры.

Показано участие поринов в процессе адгезии энтеропатогенных *Escherichia coli* [5], *Salmonella enterica serovar typhimurium* к клеткам кишечного эпителия [6] и к макрофагам человека [7,8].

На примере патогенного для птиц штамма *E. coli* TW-ХМ был оценен потенциал поринов наружной мембраны на начальном этапе развития инфекции, адгезии и инвазии [9]. В экспериментах *in vitro* авторы показали, что мутантные штаммы *E. coli*, в которых отсутствовали белки OmpF или OmpC, обладали значительно более низкой адгезивной активностью по отношению к микроваскулярным эндотелиальным клеткам мозга мыши по сравнению с диким штаммом на 51,9 и 49,7% соответственно.

Для уропатогенной *E. coli* 536 (CDIEC536) было показано, что белок CdiA, который относится к системе белков, регулирующих контакт-зависимый рост бактериальных клеток, использует OmpC и OmpF в качестве рецепторов для распознавания целевых бактерий [10].

Роль белков наружной мембраны патогенных иерсиний как адгезинов достаточно хорошо описана в литературе. Так, клетки возбудителя псевдотуберкулеза экспрессируют несколько белков с выявленной адгезивной способностью. Это хорошо охарактеризованные белки Ail, YadA, Inv, рН 6 antigen [11,12], а также относительно недавно идентифицированные Yар E [13], Yар V, Yар K, Yар J [14]. Некоторые из упомянутых адгезинов (Ail, рН 6, Yар V, Yар K, Yар J, Yар E) могут продуцироваться бактериями близкородственного патогена *Yersinia pestis*, которые в то же время экспрессируют белковые адгезины Pla, Yар B, Yар C, не выявляемые в клетках энтеропатогенных иерсиний.

Показано, что клетки нескольких видов грамотрицательных бактерий, в том числе и *Y. pseudotuberculosis*, способны экспрессировать так

называемые multivalent adhesion molecule (МАМ) – белки наружной мембраны, обладающие адгезивной способностью в отношении эукариотических клеток. Один из таких белков, МАМ7, с высокой аффинностью связывается с фибронектином и с меньшей аффинностью – с фосфатидной кислотой в составе клеточной мембраны клеток хозяина, усиливая патогенетический потенциал возбудителя. Предполагается, что названное связывание предшествует адгезии бактерий, определяемой другими адгезинами, продукция которых усиливается в процессе развития инфекции [15,16].

В то же время мало известно относительно участия пориновых белков патогенных иерсиний в процессе адгезии к клеткам макроорганизма. Так, для порина Sfp установлена роль в колонизации пейеровых бляшек бактериями *Y. enterocolitica* [17]. Микробиологическими и молекулярно-генетическими методами показана значимость белка YompC – представителя семейства поринов OmpC – в адгезии бактерий *Y. enterocolitica* к клеткам карциномы гортани НЕР-2 [18]. Обнаружено, что предварительная обработка монослоя эпителиальных клеток Rh OmpF порином способствовала усилению адгезии и инвазии бактерий *Y. pseudotuberculosis*, а при сочетанном действии порина и указанных микробных клеток обнаружены дегенеративные изменения в эпителиальных клетках. [19]. Однако количественной оценки адгезивных свойств поринов наружной мембраны псевдотуберкулезного микроба не проводилось.

Ранее методом оптической ловушки было показано участие в адгезивности к макрофагам J774 основной структуры наружной мембраны псевдотуберкулезного микроба – липополисахарида, которое определяется в первую очередь его О-боковыми цепями [20].

Целью настоящей работы являлось изучение вклада поринов OmpF и OmpC в адгезивность *Y. pseudotuberculosis* к макрофагам J774 методом оптической ловушки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Для получения препаратов поринов использовали бактерии *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, Ib серовар). Культуры выращивали в жидкой питательной среде LB при температуре 4°C в течение 5 сут и при температуре 37°C в течение 30 ч для получения белков OmpF и OmpC соответственно.

Культура клеток макрофагов мыши линии J774 получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цито-

логии РАН, Санкт-Петербург). Культуру клеток поддерживали в питательной среде RPMI-1640, содержащей L-глутамин с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («Биолот», Россия) в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при температуре 37°C.

Выделение поринов OmpF и OmpC. Выделение и очистку белков из бактериальных культур проводили, как описано в работе [21]. В результате были получены электрофоретически чистые препараты белков в нативной тримерной форме. По данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия молекулярная масса мономеров поринов OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis*, полученных после термоденатурации тримеров белков, составляет 38 и 37 кДа соответственно. Содержание липополисахаридов в препаратах белков не превышало 3%. Полученные образцы тримеров белков использовали для функционализации микросфер и получения антисывороток.

Получение антисывороток к поринам OmpF и OmpC. Все эксперименты с животными были проведены в соответствии с положениями Директивы N 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, используемых для научных целей». Мышей линии BALB/c (самки в возрасте от 4 до 8 недель массой 20 ± 2 г) иммунизировали препаратами поринов в дозе 100 мкг/мышь в смеси с полным адьювантом Фрейнда (1 : 1, объем/объем) внутрибрюшинно трехкратно с интервалом в 7 сут. Забор крови у мышей осуществляли через один месяц после последней иммунизации путем декапитации. Титры антител (Ат) в полученных антипоринных сыворотках определяли с помощью метода непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА), используя микропланшеты Costar (США). В качестве сенситина в лунки планшета вносили препараты соответствующих поринов в объеме 0,1 мл на лунку при концентрации белка 5 мкг/мл. Титры иммунных сывороток для поринов OmpF и OmpC составляли 1 : 62400 и 1 : 124800 соответственно. В качестве контроля использовали сыворотку неиммунизированных мышей этой же линии (далее – «нормальную сыворотку»).

Функционализация микросфер. Препараты поринов OmpF и OmpC, хранившиеся в 0,01 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 (ФСБ) содержащем 0,25% додецилсульфата натрия, предварительно диализовали против 0,05 М карбонат-бикарбонатного буфера, рН 9,5. Далее растворы поринов (~0,35 мг/мл) в объеме 500 мкл смешивали с 60 мкл суспензии полистироловых

микросфер диаметром 1 мкм (Polysciences Inc., США) в концентрации 2,5% (вес/объем). После двухчасовой инкубации и последующего центрифугирования (13000 g, 15 мин) осадок отмывали в ФСБ и затем ресуспендировали в блокирующем буфере (ФСБ, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,05% Твин-20) и встряхивали при комнатной температуре в течение 1 ч.

Осадок после центрифугирования суспензии заблокированных микросфер (13000 g, 15 мин) отмывали в ФСБ и ресуспендировали в 1000 мкл ФСБ. Параллельно в идентичных условиях готовили препарат контрольных микросфер для цитофлуориметрии, которые обрабатывали только блокирующим буфером с БСА.

Далее из суспензии микросфер, сенсibilизированных поринами (OmpF или OmpC), отбирали две аликвоты по 250 мкл, к одной из которых добавляли 100 мкл антисыворотки к соответствующим поринам, к другой – 100 мкл нормальной сыворотки. После двухчасовой инкубации при комнатной температуре микросферы дважды отмывали ФСБ и ресуспендировали в 250 мкл ФСБ, содержащем 0,01% азид натрия. К оставшимся 500 мкл суспензии микросфер, нагруженных OmpF/OmpC, добавляли азид натрия (0,01%). Полученные партии микросфер далее обозначали соответствующими символами: «OmpF», «OmpF + анти-OmpF», «OmpF + норм. сыв.», «OmpC», «OmpC + анти-OmpC», «OmpC + норм. сыв.», «БСА».

Верификацию факта сенсibilизации микросфер препаратами поринов проводили методами ТИФА и проточной цитофлуориметрии, а также с помощью сканирующей электронной микроскопии, оценивая диаметр микросфер.

Твердофазный иммуноферментный анализ функционализированных микросфер. К 200 мкл антисыворотки к OmpF (1 : 4500) добавляли по 20 мкл суспензий микросфер «OmpF», «OmpF + анти-OmpF», «OmpF + норм. сыв.» и после часовой инкубации на шейкере (37°C, 290 об/мин) содержимое пробирок центрифугировали (13000 g, 15 мин). В трех полученных надосадочных жидкостях (в табл. 1 обозначены символом «НЖ») методом ТИФА определяли концентрацию соответствующих антител. Для этого лунки 96-луночного планшета (Greiner BioOne, Германия) сенсibilизировали 100 мкл препарата порина OmpF (5 мкг/мл) в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9,5 в течение 18 ч и трижды промывали. После инкубирования в блокирующем буфере и отмывки в ФСБ в соответствующие лунки вносили вышеуказанные надосадочные жидкости в объеме

Таблица 1. Оценка результатов функционализации микросфер, проведенная с помощью различных методов

Тип микросфер	ОП ₄₉₂ в ТИФА с НЖ*	Уровень флуоресценции, отн. ед.	Диаметр микросфер, нм	Толщина слоя сенситина микросфер, нм
«OmpF»	0,65 ± 0,01	н/о	1015 ± 11	13
«OmpF + анти-OmpF»	2,53 ± 0,04	2304,25	1037 ± 20	24
«OmpF + норм. сыв.»	0,68 ± 0,01	163,96	1011 ± 9	11
«OmpC»	0,33 ± 0,08	н/о	1008 ± 14	9
«OmpC + анти-OmpC»	0,85 ± 0,13	2155,43	1022 ± 13	17
«OmpC + норм. сыв.»	0,33 ± 0,02	138,29	1010 ± 13	10
«БСА»	н/о	307,69	994 ± 6	3
Несенсибилизированные	н/о	н/о	989 ± 9	н/о

Примечание. *НЖ – надосадочные жидкости, полученные после инкубации тех или иных микросфер с антисывороткой к OmpF (OmpC) в разведении 1 : 4500 (см. «Материалы и методы»); ОП₄₉₂ – оптическая плотность раствора при длине волны 492 нм; н/о – параметр не определяли.

100 мкл. После отмывки осуществляли дальнейшие стандартные процедуры ТИФА: последовательное внесение меченных пероксидазой иммуноглобулинов козы к IgG мыши (Sigma-Aldrich, США), субстрата на основе *o*-фенилендиамина (Alfa Aesar, Великобритания), стоп-реагента (50 мкл 1 н H₂SO₄) для остановки реакции. Идентичная схема постановки ТИФА была использована при анализе препаратов, приготовленных с использованием OmpC порина и антисыворотки к нему.

Цитофлуориметрия функционализированных микросфер. Подготовку образцов для проведения цитометрического анализа проводили, как описано в разделе «Функционализация микросфер». На последнем этапе функционализированные микросферы инкубировали 1 ч при 37°C с иммуноглобулинами козы к IgG мыши, меченными изотиоцианатом флуоресцеина (FITC, НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия) (далее Ат-FITC), в рабочем разведении 1 : 200. В качестве немеченого контроля использовали микросферы «БСА» без обработки конъюгатом Ат-FITC. Анализ проводили с помощью цитометра BD FACS Calibur (BD Biosciences, США).

Сканирующая электронная микроскопия. Для измерения диаметра микросфер использовали сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM-6510LV (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 10 кВ, вакуумный напыляющий аппарат JFC-1600 (JEOL, Япония). Размер микросфер определяли при увеличении 40000× в ручном режиме с применением встроенного инструмента анализа размеров частиц.

Определение силы взаимодействия микросферы и макрофага с помощью лазерного нанопинцета. Данная методика подробно изложе-

на нами ранее [20]. Кратко: за 18–20 ч до измерения силы связи между макрофагом и функционализированной микросферой с помощью нанопинцета культуру макрофагов пересеивали на чашку Fluorodish диаметром 35 мм (WPI, США) с вышеуказанной питательной средой, после трехкратной отмывки ФСБ в чашку вносили 2,3 мл ФСБ и приступали к измерениям. Чашку с распластанными на дне макрофагами закрепляли на термостатируемом (37°C) пьезостолике инвертированного микроскопа лазерного пинцета Nano-Tracker™ (JPK Instruments AG, Германия). После внесения в чашку взвеси функционализированных микросфер того или иного типа оптической ловушкой захватывали взвешенную в суспензии микросферу и проводили калибровку прибора. В соответствии с ранее отработанным алгоритмом к удерживаемой лазерным лучом (коэффициент жесткости 0,25–0,28 пН/нм) микросфере пьезостоликом подводили предварительно выбранную макрофагальную клетку до их касания и затем отводили. Процесс подведения–отведения контролировали по хронограмме сигнала квадратного фотодетектора. Силу разорвавшейся связи между двумя объектами оценивали по амплитуде резкого скачка сигнала при отведении макрофага и после пересчета выражали в пиконьютонах (пН).

Обработка результатов измерений. Массивы значений силы отрыва микросферы от клетки оценивали путем вычисления средних и построения гистограмм распределения этих значений по количеству наблюдений. Аппроксимацию гистограмм непрерывными функциями распределения выполняли методом ядерной

оценки функции плотности (kernel density estimation) [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Существенной частью данной работы являлось доказательство наличия на поверхности микросфер-зондов целевого антигена после их пассивной сенсibilизации поринами OmpF и OmpC. В табл. 1 представлены результаты таких исследований, полученные с помощью трех методических подходов.

На первом этапе исследований с помощью сканирующей электронной микроскопии было установлено, что диаметр микросфер «OmpF» и «OmpC» (равно как «OmpF + норм. сыв.» и «OmpC + норм. сыв.») были приблизительно одинаковы и существенно больше диаметра несенсibilизированных, интактных микросфер. Следует также отметить значительный прирост толщины слоя на поверхности микросфер, сенсibilизированных тем или иным порином, в результате инкубации с соответствующей антисывороткой: диаметр микросфер «OmpF + анти-OmpF» оказался существенно ($p < 0,01$) больше такового микросфер «OmpF». Аналогичное различие показано и для пары микросфер «OmpC + анти-OmpC» и «OmpC» (табл. 1).

На рис. 1 представлены микрофотографии контрольных и функционализированных с использованием порина OmpF микросфер. Несенсibilизированные, интактные микросферы (рис. 1а) представляли собой отдельно расположенные шарообразные объекты с резко очерченными границами. Микросферы, покрытые БСА, внешне отличались от первых лишь несколько большей склонностью к склеиванию (рис. 1б). В отличие от микросфер «БСА», сенсibilизация микросфер препаратом порина OmpF приводила к появлению прилегающего к их поверхности плохо оформленного электронно-плотного слоя, выраженность которого была выше у микросфер, обработанных комплементарной сывороткой, по сравнению с нормальной. Кроме того, микросферы «OmpF + анти-OmpF» (рис. 1г) отличались от микросфер «OmpF» (рис. 1в) и «OmpF + норм. сыв.» (рис. 1д) большей склонностью к агрегации, что регистрировалось не только методом сканирующей электронной, но и световой микроскопии, а также при оценке седиментационной устойчивости указанных суспензий.

Визуальные различия в электронно-микроскопических изображениях несенсibilизированных и функционализированных микросфер, косвенно свидетельствующие о прикреплении белков к поверхности микросфер, были под-

тверждены иммунохимическими исследованиями. С помощью ТИФА были проанализированы препараты «НЖ», полученные после взаимодействия функционализированных микросфер различных типов со специфическими сыворотками к исследуемым поринам *Y. pseudotuberculosis*. Обнаружено, что инкубирование микросфер «OmpF» и «OmpF + норм. сыв.» в антисыворотке к порину OmpF, а также микросфер «OmpC» и «OmpC + норм. сыв.» в антисыворотке к порину OmpC привело к существенному падению специфической активности указанных антисывороток в ТИФА по сравнению с микросферами «OmpF + анти-OmpF» и «OmpC + анти-OmpC», инкубированными с соответствующими антисыворотками (табл. 1).

По данным проточной цитофлуориметрии, уровень флуоресценции суспензий микросфер, сенсibilизированных препаратами поринов OmpF и OmpC и обработанных последовательно соответствующими комплементарными антисыворотками и флуоресцентно мечеными вторыми антителами (Ат-FITC), оказался равным 2304,25 и 2155,43 отн. ед. соответственно (табл. 1) при отсутствии значимой флуоресценции двух контрольных препаратов, в качестве которых были использованы микросферы «БСА» и «БСА + Ат-FITC» (рис. 2). Дополнительно в качестве контролей были использованы микросферы «OmpF + норм. сыв.» и «OmpC + норм. сыв.», взаимодействие которых с Ат-FITC давало низкий уровень флуоресценции, сравнимый с таковым у контролей 1 и 2 (на рис. 2 данные не приведены). Усиление сигнала флуоресценции для исследуемых образцов свидетельствует о связывании специфических антител с комплементарными антигенами на поверхности микросфер. Таким образом, с помощью двух независимых экспериментов показано, что при адсорбции на поверхности микросфер порины сохраняют свою антигенную активность

В целом данные, приведенные в табл. 1 и на рис. 1 и 2, свидетельствуют о том, что использованный метод сенсibilизации обеспечивает надежное прикрепление обоих поринов к полистироловой поверхности микросфер, а их обработка комплементарной антисывороткой вызывает специфическое блокирование соответствующих антигенных детерминант поринов, находящихся на поверхности микросфер. Результаты измерений адгезивности разнокачественно функционализированных микросфер к макрофагам J774 представлены в табл. 2 и на рис. 3. Среднее значение силы отрыва от макрофага для микросфер «OmpF» оказалось выше ($p < 0,01$) по сравнению с микросферами

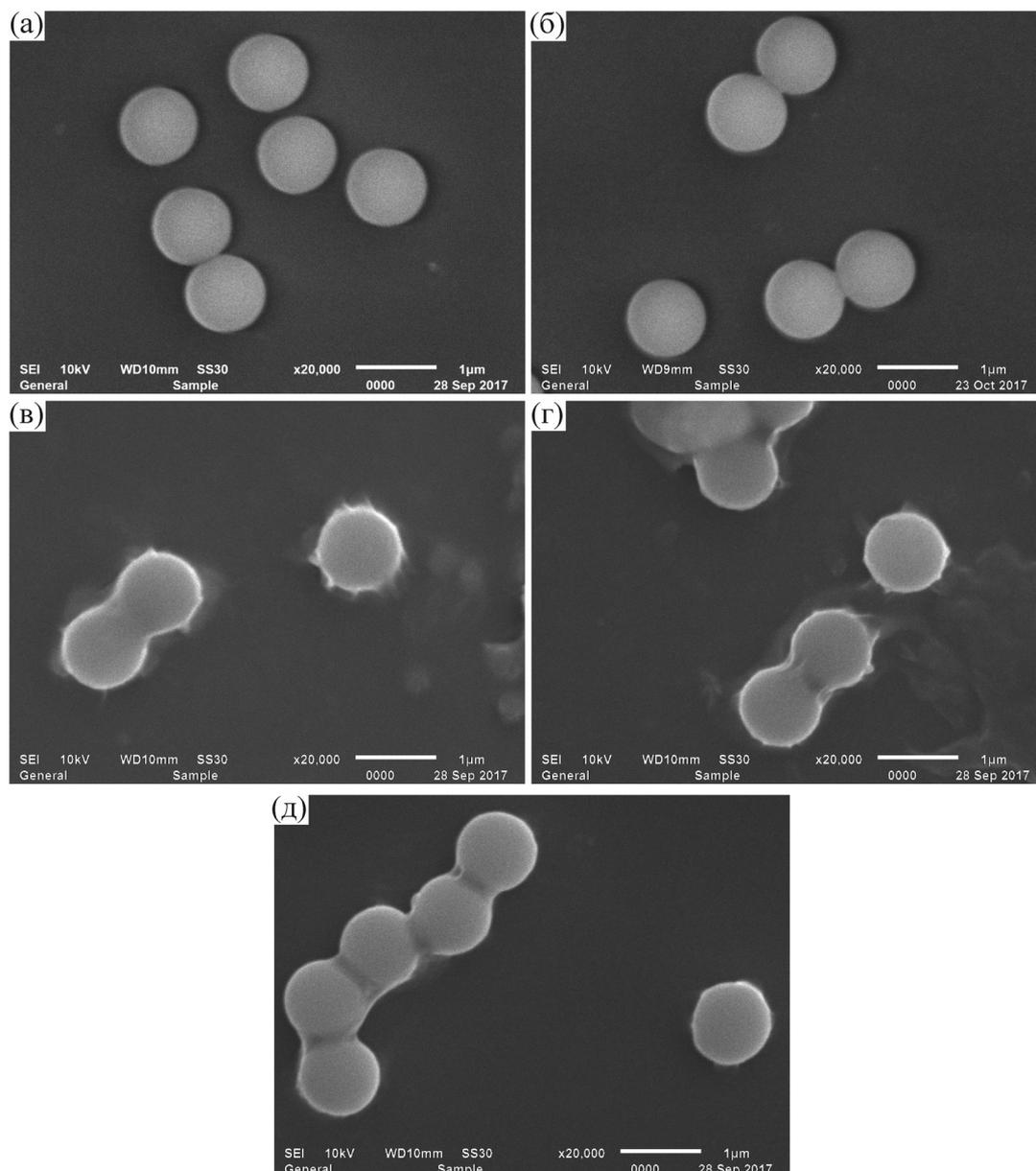


Рис. 1. Внешний вид микросфер в сканирующем электронном микроскопе: (а) – несенсибилизированные микросферы, (б) – «БСА», (в) – «OmpF», (г) – «OmpF + анти-OmpF», (д) – «OmpF + норм. сыв.».

«OmpF + анти-OmpF», равно как и в случае порина OmpC. Однако оцениваемые различия между микросферами «OmpC» и «OmpC + анти-OmpC» несущественны.

Аналогичные выводы можно сделать и при анализе гистограмм распределения силы отрыва. Как можно видеть на рис. 3а, обработка микросфер «OmpF» комплементарной антисывороткой приводит к существенному повышению доли низкоамплитудных отрывов за счет снижения количества отрывов с амплитудой в интервале 20–40 пН. По-видимому, указанное различие двух сравниваемых гистограмм в зна-

чительной мере объясняется экранированием антисывороткой сайтов связывания молекулы порина OmpF, участвующих в формировании высокоамплитудных отрывов. Отсутствие выраженного ингибирующего влияния антисыворотки к OmpC на адгезивность микросфер, сенсибилизированных этим порином, а также относительно низкое значение средней силы отрыва от макрофага микросфер «OmpC» (рис. 3б, табл. 2) указывают на то, что названный порин практически не участвует в адгезивности модельных микросфер и, вероятно, бактериальных

клеток, во всяком случае, к макрофагам J774, использованным в настоящей работе.

Такой результат, вероятно, обусловлен недостаточной доступностью сайтов взаимодействия OmpC порина с макрофагами по сравнению с белком OmpF, что может быть связано с различиями в первичной структуре и конформации участков этих поринов, локализованных на поверхности их молекул. Известно, что специфические эпитопы поринов, выходящие за пределы бактериальной клетки, могут выполнять роль рецепторов для взаимодействия с эукариотическими клетками и формировать антигенные детерминанты этих белков [23]. Анализ результатов исследований, выполненных с помощью моноклональных антител, свидетельствует о том, что именно петельные участки обладают наибольшей вариабельностью [24,25]. Для поринов разных видов иерсиний также показано, что первичная структура наружных петель значительно отличается между собой по аминокислотному составу [26] и характеризуется наибольшей дивергентностью, приобретенной в процессе эволюции [27]. В литературе имеются сообщения о том, что изменения в структуре высоковариабельной петли L7 поринов *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli* приводят к изменению функции рецепции компонентов системы комплемента и колицинов [28,29]. Для порина OmpC *E. coli* показано, что отсутствие или замена отдельных участков в аминокислотной последовательности некоторых наружных петель вызывает утрату способности бактерий взаимодействовать с фагами Gifsy [30]. В случае поринов OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis* наибольшие различия по длине и степени гомологии отмечены для наружных петель L4 и L6 (рис. 4).

В настоящее время считается, что взаимодействующие белки должны обладать высоким сродством к поверхностным эпитопам друг друга по типу «зеркального подобия», обусловленного наличием в их последовательности сходных по структуре аминокислотных фрагментов. При этом значительный вклад в стабилизацию комплекса «лиганд–рецептор» вносят электростатические взаимодействия, обеспеченные наличием в первичных структурах контактирующих белков аминокислотных остатков с заряженными боковыми цепями [31].

Как видно из рис. 4, в петле L4 OmpF порина по сравнению с OmpC белком присутствует большее количество заряженных аминокислотных остатков. Кроме того, петли L4 и L6 порина OmpC значительно длиннее соответствующих петель белка OmpF, что может

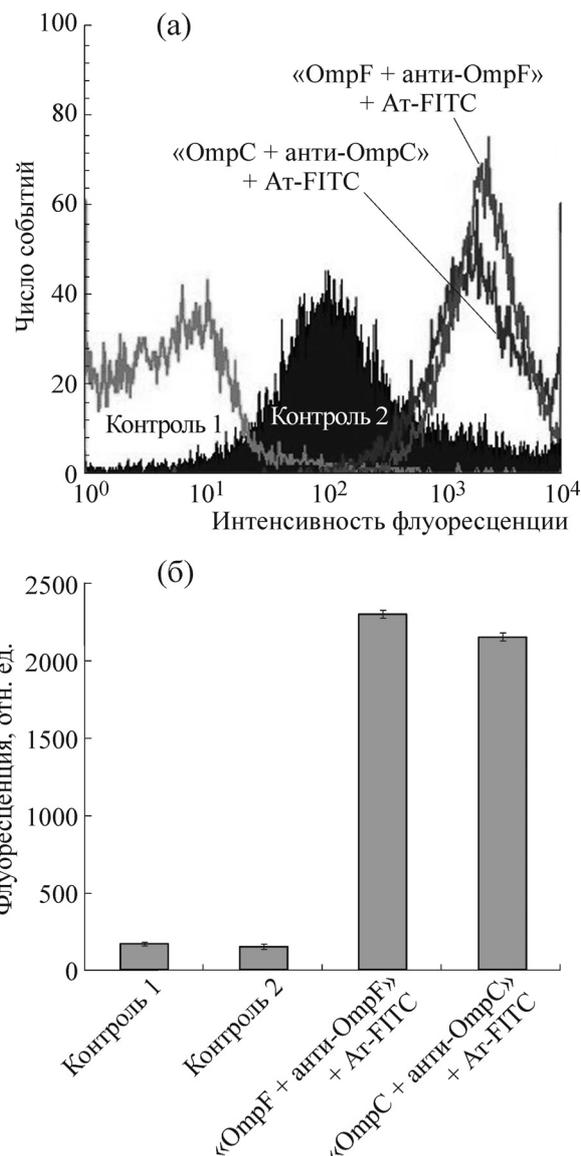


Рис. 2. Флуоресценция функционализированных микросфер. At-FITC – иммуноглобулины козы к IgG мыши, меченные изотиоцианатом флуоресцеина. Контроль 1 – микросферы «БСА + At-FITC», контроль 2 – микросферы «БСА + At-FITC».

вызывать некие стерические затруднения, препятствующие эффективной адгезии.

К сожалению, точно указать, какие аминокислотные остатки в составе петель порина OmpF участвуют в формировании сайтов их взаимодействия с поверхностью макрофагов, не представляется возможным на данном этапе исследования, поскольку не известны рецепторы, «предназначенные» именно для поринов. Тем не менее обнаруженные нами особенности структуры, различные физико-химические свойства и, как следствие, отличия в пространственной конформации указанных петель могут

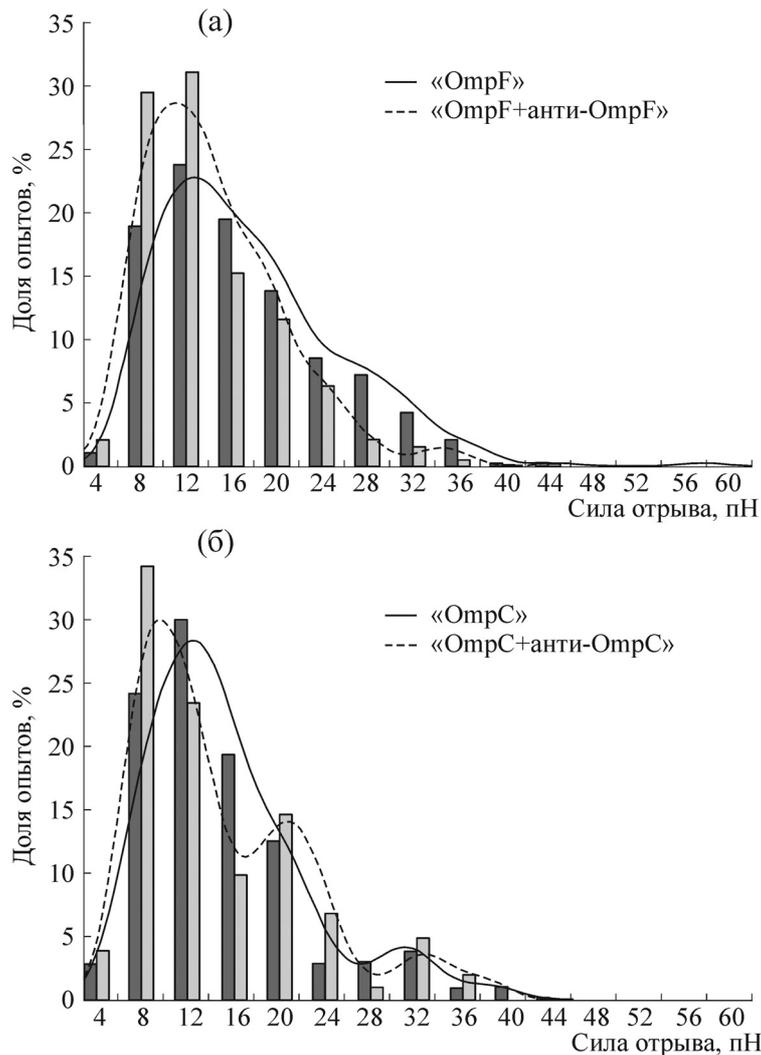


Рис. 3. Гистограммы и аппроксимирующие их непрерывные распределения сил отрыва от макрофагов микросфер: (а) – «OmpF» (темные столбики, сплошные линии) и «OmpF + анти-OmpF» (светлые столбики, пунктирные линии), (б) – «OmpC» (темные столбики, сплошные линии) и «OmpC + анти-OmpC» (светлые столбики, пунктирные линии).

быть причиной различных адгезивных свойств исследуемых поринов по отношению к макрофагам.

Известно, что химический состав поверхностных структур бактерий зависит от условий их обитания в окружающей среде, в том числе

температуры. Циркуляция в природе *Y. pseudotuberculosis*, равно как и других патогенных для человека иерсиний, происходит в экосистемах с различным температурным режимом, требующих от микроорганизма чрезвычайно высокой метаболической пластичности. Первый

Таблица 2. Адгезивность функционализированных микросфер к макрофагам J774

Тип микросфер	Число отрывов	F_{mean}	F_{med}	F_{max}
«OmpF»	457	$14,76 \pm 7,67$	13,32	54,73
«OmpF + анти-OmpF»	290	$11,40 \pm 6,35$	10,26	37,42
«OmpC»	104	$12,54 \pm 6,98$	10,84	36,51
«OmpC + анти-OmpC»	103	$12,19 \pm 7,60$	9,74	35,86

Примечание. F_{mean} – среднее значение, F_{max} – максимальное значение, F_{med} – медиана силы отрыва.

температурный режим (4–25°C) соответствует температуре многих природных сред, а также температуре тела холоднокровных животных, второй (33–37°C) – температуре тела теплокровных млекопитающих. Выше было упомянуто, что бактерии *Y. pseudotuberculosis* продуцируют OmpF при низкой, а OmpC – при повышенной температуре культивирования. Выявлены также существенные и во многом схожие для патогенных иерсиний термоиндуцибельные различия в химическом составе и размерах структурных компонентов липополисахарида (липида А, кора) [32,33]. Показано, что повышение температуры культивирования клеток *Y. pseudotuberculosis* до 37°C приводит к резкому снижению количества и длины О-боковых цепей липополисахарида [34] и, напротив, выраженной экспрессии ряда адгезинов белковой природы [35]. Учитывая ранее установленное участие О-антигена в адгезивности псевдотуберкулезного микроба [20], а также полученные нами данные об аналогичной активности порина OmpF (но не OmpC), можно сделать следующее предположение. Два названных адгезина – S-форма липополисахарида и OmpF-порин – присутствующие возбудителю псевдотуберкулеза, главным образом, при обитании в условиях внешней среды, необходимы ему также на первой стадии инфицирования теплокровного организма для обеспечения контакта со слизистой кишечника. На это может указывать, в частности, тот факт, что «холодовые» культуры бактерий являются более инвазивными, вирулентными для экспериментальных животных по сравнению с культурами того же штамма *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при температуре 37°C [36]. Для осуществления дальнейших стадий инвазии этих компонентов наружной мембраны психрофильного возбудителя, очевидно, не требуется – в результате фенотипизации и последующего размножения микроба в организме хозяина происходит переключение метаболизма на биосинтез порина OmpC и О-дефицитной формы липополисахарида, а также белковых адгезинов «второй очереди», эффективных для преодоления защитных механизмов макроорганизма, таких как Yad A, Inv, Ail и др. Такое предположение может косвенно подтверждаться тем, что в процессе видообразования от своего предшественника, *Y. pseudotuberculosis* [37], чумной микроб потерял способность к биосинтезу ряда метаболитов, в частности, полноценной S-формы липополисахарида [34]. Вместе с тем микроб сохранил большинство свойств энтеропатогенов и приобрел новые качества, совокупность которых позволила сформировать новый вид

L4 OmpC	L6 OmpC
GKNGSSSE T NNGRGVADQN	DFSNRSSDAAFGFAD
GKNDR- SE VKE----A--N	-FY----D--FTIAN
L4 OmpF	L6 OmpF

Рис. 4. Аминокислотная последовательность наружных петель L4 и L6 поринов OmpF и OmpC *Yersinia pseudotuberculosis* [21,26]. Идентичные аминокислоты выделены жирным шрифтом.

иерсиний, характеризующийся практически облигатным паразитизмом – *Yersinia pestis*.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют об участии порина OmpF в адгезивности *Y. pseudotuberculosis* к макрофагам J774 и отсутствию такового для OmpC.

Статья подготовлена в рамках научно-исследовательской работы по Государственному заданию №20.6834.2017/БЧ Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. Zav'yalov, A. Zavialov, G. Zav'yalova, et al., FEMS Microbiol. Rev. **34** (3), 317 (2010).
2. K. M. Mikula, R. Kolodziejczyk, and A. Goldman, Front. Cell. Infect. Microbiol. **2**, 1 (2012).
3. W. Achouak, R. De Mot, and T. Heulin, FEMS Microbiol. Ecol. **16** (1), 19 (1994).
4. G. Hemery, S. Chevalier, M. N. Bellon-Fontaine, et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **34** (1), 49 (2007).
5. N. Rolhion, F. A. Carvalho, and A. Darfeuille-Michaud, Mol. Microbiol. **63** (6), 1684 (2007).
6. B. B. Hara-Kaonga and T. G. Pistole, Can. J. Microbiol. **50** (9), 719 (2004).
7. R. S. Negm and T. G. Pistole, Can. J. Microbiol. **45** (8), 658 (1999).
8. R. S. Negm and T. G. Pistole, FEMS Immunol. Med. Microbiol. **20** (3), 191 (1998).
9. H. M. A. Hejair, Y. Zhu, J. Ma, et al., Microb. Pathog. **107**, 29 (2017).
10. C. M. Beck, J. L. Willett, D. A. Cunningham, et al., PLoS Pathog. **12** (10), e1005925 (2016).
11. J. C. Leo and M. Skurnik, Adv. Exp. Med. Biol. **715**, 1 (2011).
12. N. Chauhan, A. Wrobel, M. Skurnik, et al., Proteomics Clin. Appl. **10** (9–10), 949 (2016).
13. M. B. Lawrenz, J. D. Lenz, and V. L. Miller, Infect. Immun. **77** (1), 317 (2009).
14. M. K. Nair, L. De Masi, M. Yue, et al., Infect. Immun. **83** (5), 1809 (2015).
15. A.-M. Krachler, H. Ham, and K. Orth, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108** (28), 11614 (2011).
16. A.-M. Krachler and K. Orth, J. Biol. Chem. **286** (45), 38939 (2011).

17. S. Mildiner-Earley and V. L. Miller, *Infect. Immun.* **74** (7), 4361 (2006).
18. K. Brzostek and A. Raczkowska, *Folia Microbiol. (Praha)* **52**, 73 (2007).
19. Н. Ф. Тимченко, О. Д. Новикова, И. М. Ермак и др., *Журн. микробиол.* **6**, 38 (1986).
20. А. А. Бывалов, В. Л. Кононенко и И. В. Конышев, *Прикл. биохимия и микробиология* **53** (2), 234 (2017).
21. О. Д. Новикова, В. А. Хоменко, В. И. Емельяненко и др., *Биол. мембраны* **28** (1), 1 (2011).
22. B. W. Silverman, *Density estimation for statistics and data analysis* (Chapman and Hall, London, 1986).
23. W. Achouak, T. Heulin, and J. P. Pages, *FEMS Microbiol. Lett.* **199** (1), 1 (2001).
24. А. А. Дельвиг и Б. Ф. Семенов, *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии* **6**, 92 (1997).
25. S. P. Singh, S. R. Singh, Y. U. Williams, et al., *Infect. Immun.* **63** (12), 4600 (2005).
26. К. В. Гузев, М. П. Исаева, О. Д. Новикова и др., *Биохимия* **70** (10), 1338 (2005).
27. A. M. Stenkova, M. P. Isaeva, F. N. Shubin et al., *PLoS ONE* **6** (5), e20546 (2011).
28. S. Alberti, F. Rodríguez-Quiñones, T. Schirmer, et al., *Infect. Immun.* **63** (3), 903 (1995).
29. D. Fourel, A. Bernadac, and J. M. Pagès, *Eur. J. Biochem.* **222** (2), 625 (1994).
30. T. D. Ho and J. M. Slauch, *J. Bacteriol.* **183** (4), 1495 (2001).
31. А. М. Андрианов, *Конформационный анализ белков: теория и приложения* (Беларуская навука, Минск, 2013).
32. Y. A. Knirel, S. V. Dentovskaya, S. N. Senchenkova, et al., *J. Endotoxin Res.* **12** (6), 3 (2006).
33. O. Holst, *Adv. Exp. Med. Biol.* **529**, 219 (2003).
34. M. Skurnik, *Adv. Exp. Med. Biol.* **529**, 187 (2003).
35. H. Nummelin, M. C. Merckel, Y. E. L. Tahir, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **529**, 85 (2003).
36. Г. П. Сомов, В. И. Покровский, Н. Н. Беседнова и Ф. Ф. Антоненко, *Псевдотуберкулез* (Медицина, М., 2001).
37. M. Achtman, K. Zurth, C. Morelli, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14043 (1999).

Adhesiveness of OmpF and OmpC Porins from *Yersinia pseudotuberculosis* to Macrophages J774 Evaluated by Optical Tweezers

A.A. Byvalov* **, I.V. Konyshev* **, O.D. Novikova***, O.Yu. Portnyagina***,
V.S. Belozero* **, V.A. Khomenko***, and V.N. Davydova***

*Vyatka State University, ul. Moskovskaya 36, Kirov, 610000 Russia

**Institute of Physiology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Pervomayskaya 50, Syktyvkar, 167982 Russia

***Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
prosp. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

Optical trapping has been used to assess the importance of the *Y. pseudotuberculosis* porins OmpF and OmpC in the capacity for adhesion to macrophages J774. Passive sensitization of polystyrene microspheres by the porins mentioned has been verified. Using a set of differently functionalized microspheres, it has been shown that OmpF, expressed at a lower culture temperature, is involved in the adherence of *Y. pseudotuberculosis* bacteria to macrophages, while OmpC, synthesized at 37°C, does not participate. These findings can be explained by differences in the primary structure and conformational features of the outer loops of porin molecules which are caused by temperature change. These differences are suggested to be important for effective circulation in the natural environment and manifestation of invasive properties of *Y. pseudotuberculosis* as an agent of saprozoontic infection.

Keywords: adhesiveness, porins, *Y. pseudotuberculosis*, macrophage, optical trap