

УДК 577.353.2

Е.С.Божокина (6 курс, каф. БФ),
С.Ю. Хайтлина, д.б.н. (ИНЦ РАН), Т.Н.Ефремова, к.б.н. (ИНЦ РАН)

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ИНВАЗИВНОСТИ В ШТАММЕ *E.coli* A2, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ПРОТЕАЗУ ECP32, СПЕЦИФИЧЕСКИ РАСЩЕПЛЯЮЩУЮ АКТИН

Инвазия эукариотических клеток бактериями является уникальным процессом, включающим взаимодействие бактериальной и эукариотической клеток, активацию сигнальной системы клетки и специфический вид бактериальной подвижности, основанной на полимеризации актина. В частности, механизм взаимодействия патогенных бактерий с эукариотической клеткой включает перестройку актинового цитоскелета. Инвазивные микроорганизмы способны вызывать полимеризацию внутриклеточного актина и образовывать структуры на собственной поверхности, обеспечивающие их распространение [1]. При проникновении бактерии в клетку и после ее выхода из вакуоли в цитоплазму на их апикальном конце формируется кометоподобный “хвост” (из актина и актин связывающих белков), которые бактерии используют для продвижения внутри и между клетками. Скорость движение бактерий равна скорости полимеризации актина. Патогенные бактерии (*Shigella flexneri*) могут попадать в клетку хозяина путем прямой интернализации бактерии, индуцированной взаимодействием бактериальных белков с поверхностным рецептором клетки, который связан с распластыванием или с подвижностью. Другой путь, сходен с макропиноцитозом, при котором образование выростов клеточной поверхности, захватывающих бактерию, индуцируется секрецией комплексов белков, встраивающихся в клеточную мембрану и впрыскиваемых в цитоплазму. Оба эти пути связаны с реорганизацией цитоскелета и полимеризацией актина [2].

Ранее в отделе клеточных культур ИНЦ РАН было показано, что инвазивной активностью, сходной с активностью *Sh.flexneri*, обладает также непатогенный штамм *E.coli* A2, синтезирующий новую протеазу ECP 32, специфически расщепляющую актин [3]. Так как *Shigella* и *Escherichia* близко родственны, задача настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить, не содержит ли штамм *E.coli* A2 гены *Sh.flexneri*, ответственные за инвазию эукариотических клеток.

Для выявления активности протеазы ECP 32 в исследуемом штамме *E.coli* A2 был использован метод ограниченного протеолиза актина с последующем электрофорезом в полиакриламидном геле. Для исследования инвазии клеток бактериями был проведен анализ инвазированных клеток с помощью флуорисцентной микроскопии.

На основании анализа имеющихся в литературе нуклеотидных последовательностей генов *Shigella flexneri*, экспрессия которых обеспечивает инвазию этих бактерий, были сконструированы пары праймеров для выявления соответствующих генов в бактериях *E.coli* A2. Используя сконструированные праймеры к специфическому гену *Shigella* IpaH, с помощью PCR проверили наличие гена IpaH в геноме бактерии *E.coli* A2. В качестве контроля использовали ДНК клинического изолята *Sh. flexneri*, мутантных штаммов *Sh.flexneri* 5a2c и 4115, а также референтного штамма *E.coli* ССМ. Присутствие гена IpaH обнаружено во всех исследованных штаммах *Sh.flexneri*, как обладающих так и не обладающих инвазивной способностью. Исследуемый ген не был обнаружен в бактериях неинвазивного штамма *E.coli* ССМ и в штамме *E.coli* A2, синтезирующем протеазу ECP 32. Полученные результаты свидетельствуют о том, что инвазия *E.coli* A2 не связана с экспрессией гена инвазии *Sh.flexneri* IpaH, и подтверждает наше предположение о корреляции инвазивных свойств *E.coli* A2 с синтезом протеазы ECP 2.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Theriot J.A. The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995, 11: 213-239.
2. Sansonetti P.J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by Shigella, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol Rev.* 2001 Jan; 25(1): 3-14.
3. Efremova T., Ender N., Brudnaja M., Komissarchik Y., Khaitlina S. Specific invasion of transformed cells by Escherichia coli A2 strain. *Cell Biol Int.* 2001; 25(6): 557-561.