

УДК 579.222+576.524

СВЯЗЬ МЕТАБОЛИЗМА ГЕКСУРОНАТОВ СО СПОСОБНОСТЬЮ *ESCHERICHIA COLI* К АДГЕЗИИ И ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК

© 2024 г. Т. А. Бессонова^{a,*}, У. Д. Кузнецова^b, А. Т. Магкаев^c, М. С. Гельфанд^{d, e},
О. Н. Озолинь^a, М. Н. Тутукина^{a, d, e}

^aИнститут биофизики клетки РАН (ФИЦ ПНЦБИ РАН), Пущино, 142290, Россия

^bРНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997, Россия

^cНИУ “Высшая школа экономики”, Москва, 117418, Россия

^dСколковский институт науки и технологий, Москва, 121205, Россия

^eИнститут проблем передачи информации РАН, Москва, 127051, Россия

*e-mail: tatianabessonova66@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 08.12.2023 г.

Формирование бактериальных биопленок является важным фактором развития хронических инфекционных заболеваний, требующим поиска эффективных путей сдерживания этого процесса. Установлено, что гексуронаты, являющиеся компонентами пектинов, не влияют на формирование биопленок пробиотическим штаммом *Escherichia coli* Nissle 1917 и его адгезивные свойства, но снижают эффективность формирования биопленок штаммом *E. coli* K-12 MG1655, усиливая его адгезию к клеткам кишечной карциномы человека. Показано, что регуляторы метаболизма гексуронатов UxuR и YjjM вовлечены, наряду с cAMP-CRP, в контроль подвижности, адгезии и формирования биопленок *E. coli* K-12 MG1655. Важную роль также играют закодированные в гене *uxiR* нетранслируемые РНК, которые ингибируют транскрипцию с гена основного σ -фактора подвижности.

Ключевые слова: биопленки, адгезия, *Escherichia coli* K-12 MG1655, Nissle 1917, метаболизм гексуронатов, UxuR, YjjM (LgoR)

DOI: 10.31857/S0026365624040107

Формирование биопленок делает бактериальные клетки более защищенными от внешних факторов, что в случае патогенных бактерий приводит к развитию хронических заболеваний, трудно поддающихся антибиотикотерапии. Так, например, активно образующие биопленки уропатогенные штаммы *Escherichia coli* являются причиной развития 80% инфекций мочеполового тракта (Kaper et al., 2004). При этом, хотя *E. coli* является самой изученной бактерией, мы все еще не понимаем, что запускает процесс формирования биопленок. Для их развития *E. coli* должна обладать способностью не только к адгезии, но и к подвижности, обеспечивающей доступ к поверхностям (Wood et al., 2006). Транскрипция всех генов, кодирующих белки, вовлеченные в процессы подвижности, находится под контролем сигма-фактора подвижности FliA (RpoF, σ^{28}) (Bertin et al., 1994). В регуляции образования биопленок часто задействован сигма-фактор стационарной фазы

(RpoS, σ^{38}), а также белок CsgD, контролирующий экспрессию генов белков, участвующих в сборке завитков (curli-пили), транспорте и синтезе структурных компонентов биопленки (Hammar et al., 1996). Усиленная подвижность, напротив, мешает колонизации, а адгезия бактерий к поверхности является важным начальным этапом образования биопленки, дальнейшее развитие которой зависит совсем от других факторов. За синтез фимбрий отвечают белки FliC и FliD, и при удалении их генов, как и генов белков-адгезинов (*fimA*, *fimI*, *csgBA*), происходит сильное угнетение роста биопленок *E. coli* (Pratt, Kolter, 1998). В переключении образа жизни бактерий от планктонного к биопленке могут быть задействованы метаболические регуляторы, например, CsrA (Jackson et al., 2002), CRP (Jackson et al., 2002b), BssS (YceP) и BssR (YliH) (Domka et al., 2006), и нетранслируемые РНК CsrB и CsrC, модулирующие функционирование CsrA (Gudapaty et al., 2001).

Важным фактором адгезии бактериальных клеток к различным поверхностям является присутствие тех или иных метаболитов. Например, D-манноза снижает образование биопленок *E. coli* K-12 MG1655, вероятно, за счет ее связывания с пилиями первого типа и блокировки адгезии к эпителиальным клеткам (Rodrigues et al., 2009). Клинические исследования показали, что прием D-маннозы и повышение ее уровня в моче снижают частоту инфекций мочевыводящих путей (Mehta et al., 2018). На исход заболеваний, вызываемых *E. coli* и *Citrobacter rodentium*, влияет доступность сахаров пектина – гексуронатов – в рационе (Jimenez et al., 2019).

У *E. coli* гексуронаты, D-галактуронат и его оптический изомер D-глюкуронат, метаболизируются до 2-кето-3-деоксиглюконата через шунт Эшвелла, а затем до пирувата по пути Энтнера–Дудорова (Peekhaus, Conway 1998). Способность к их утилизации играет важную роль в колонизации *E. coli* организмов млекопитающих (Peekhaus, Conway 1998; Fabich et al., 2008). Мутации в генах, кодирующих ключевые ферменты превращения галактуроната, приводят к снижению эффективности колонизации кишечника мыши (Fabich et al., 2008), что было подтверждено в более позднем исследовании (Jimenez et al., 2019).

Транскрипция генов всех ферментов и транспортеров пути Эшвелла контролируется белком UxuR, который может образовывать гетеродимеры с EhuR; в регуляцию также вовлечены YjjM и cAMP-CRP (Suvorova et al., 2011; Tutukina et al., 2016). Интересно, что с гена *uxuR*, помимо основного белкового продукта, синтезируются РНК, способные ингибировать *fliA* (Tutukina et al., 2023).

Целью исследования была оценка степени участия регуляторов пути Эшвелла в адгезии и формировании биопленок бактериями штамма *E. coli* K-12 MG1655 и влияния гексуронатов на эффективность этих процессов. Кроме того, мы исследовали роль *LeuO*, который является регулятором подвижности и способности к колонизации бактерий рода *Salmonella* (Guadarrama et al., 2014).

Штаммы и условия культивирования. В работе был использован стандартный лабораторный штамм *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 (U00096.3), его производные с удаленными генами *yjjM*, *crp*, *uxuR*, *ehuR*, *leuO*, штамм с выключенной трансляцией белка UxuR (K-12 *ΔuxuR-tr*) и пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917, чистая культура которого была выделена из препарата “Мутафлор”. Эффективность формирования биопленок оценивали как описано в (Fuentes et al., 2015). Посевным материалом служила 18-часовая культура, выращенная при 37°C и перемешивании 121 об./мин на среде LB (1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт “Oxoid”, Великобритания; 1% NaCl “Хеликон”, Россия). Поскольку одной из целей исследования была

оценка влияния источников углерода на формирование биопленок, культуры растили на минимальной среде M9 (48 мМ Na₂HPO₄, 22 мМ KH₂PO₄, 8.5 мМ NaCl, 18.7 мМ NH₄Cl, 2 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂ (все “Amresco”, “Хеликон”, Россия) с добавлением 5% LB и 0.2% источника углерода (D-глюкозы, D-маннозы (“NeoFroxx”, Германия), D-глюкуроната или D-галактуроната (“Sigma”, США). Среда стерилизовали в течение 20 мин при 121°C с помощью автоклава Tuttnauer MK2450 (Израиль). Источники углерода фильтровали через 0.22 мкм PES фильтры (“Millipore”, США). Формирование биопленок оценивали после роста культуры в 96-луночных планшетах (“Sarstedt”, Германия) в течение 48 ч в микроаэробных условиях, для создания которых были использованы пакеты АнаероGen™ (1 пакет на контейнер объемом 4.8 л; “Oxoid”, Великобритания). Оптическую плотность измеряли при λ = 600 нм на Synergy H1 (“BioTek”, США).

Оценка подвижности, эффективности адгезии и образования биопленок. Подвижность оценивали на чашках Петри с 0.3% LB-агаром, как описано ранее (Fuentes et al., 2015). Адгезию к клеткам линии карциномы кишечника человека CaCo-2 оценивали по протоколу, описанному в работе (Verma et al., 2016). Интенсивность формирования биопленок оценивали после окрашивания кристаллическим фиолетовым (Fuentes et al., 2015) при λ = 570 нм на Synergy H1 (“BioTek”, США).

Анализ экспрессии генов. РНК выделяли с помощью TriZol (“Invitrogen”, США) из всего содержимого лунки (планктонная культура вместе с биопленкой). Для обратной транскрипции было взято 50 нг РНК (с учетом выделения из одной лунки планшета, это максимально возможное количество). Реакцию проводили с геноспецифическими праймерами (табл. 1) в соответствии с протоколом производителя.

Реакцию количественной ПЦР проводили на амплификаторе DT-lite (“ДНК-Технология”,

Таблица 1. Праймеры для ОТ-ПЦР в реальном времени

Название праймера	Последовательность нуклеотидов
hns_PCR	5'-CGCAGGCAAGAGAATGTAC-3'
hns_RT	5'-GCAGTTCGTTCTGGGTCAATA-3'
fliA_PCR	5'-CTATGCTGGATGAAGTCTGCA-3'
fliA_RT	5'-GCGTTGCGGCCAAGTTCCTG-3'
csgD_F	5'-CTTTGCAGGCGACAGCTCTC-3'
csgD_R	5'-TCCTGCTCAAAGTATCCTGC-3'
csrC_F	5'-CCATAGAGCGAGGACGCT-3'
csrC_R	5'-ACGGGTCTTACAATCCTTG-3'

о способности гексуронатов усиливать адгезивные свойства клеток дикого типа, но особенно интересно было оценить их влияние на способность к прикреплению мутантных штаммов. Как видно из рис. 1в, добавление гексуронатов, действительно, на несколько порядков повышало количество клеток штамма K-12 MG1655, прикрепленных к эпителию кишечника человека, а манноза, как и предполагалось, на адгезию практически не влияла. В отсутствие *uxuR* и *yjiM* активаторного эффекта гексуронатов на адгезию *E. coli* K-12 MG1655 либо не наблюдалось, либо он был существенно ниже (рис. 1в).

Таким образом, *YjiM* ингибирует подвижность и активирует способность клеток *E. coli* K-12 MG1655 к адгезии, а также, наряду с *UxuR*, необходим для активации адгезии в присутствии гексуронатов. При этом прикрепление к клеткам эпителия кишечника пробиотического штамма Nissle 1917 не зависело от присутствия в среде гексуронатов (рис. 1в).

Влияние источников углерода и исследуемых факторов транскрипции на способность *E. coli* к образованию биопленок. Как и в случае с адгезией, удаление *leuO* и *exuR* не приводило к существенным

изменениям эффективности формирования биопленок бактериями *E. coli* K-12 MG1655, а при удалении *uxuR* наблюдался сильный разброс полученных значений (рис. 2а). Удаление *crp* и *yjiM* существенно снижало образование биопленок, что подтверждает их способность активировать данный процесс. При добавлении к среде субстрата гликолиза, D-глюкозы, рост биопленок также значительно снижался (рис. 2б), что было ожидаемо вследствие снижения потребности в источнике питания (Jackson et al., 2002b).

Несмотря на то что гексуронаты являются менее энергодающими субстратами, эффект D-галактуроната оказался сравнимым с D-глюкозой. При добавлении D-глюкуроната образование биопленок уменьшалось до уровня, сопоставимого с их ростом в присутствии D-маннозы (рис. 2б), которая уже используется в качестве добавки при лечении хронических бактериальных заболеваний. На штамм *E. coli* Nissle 1917 гексуронаты не влияли.

Влияние CRP, *YjiM*, *UxuR* и малых РНК на экспрессию генов ключевых регуляторов подвижности и образования биопленок. На рис. 2г

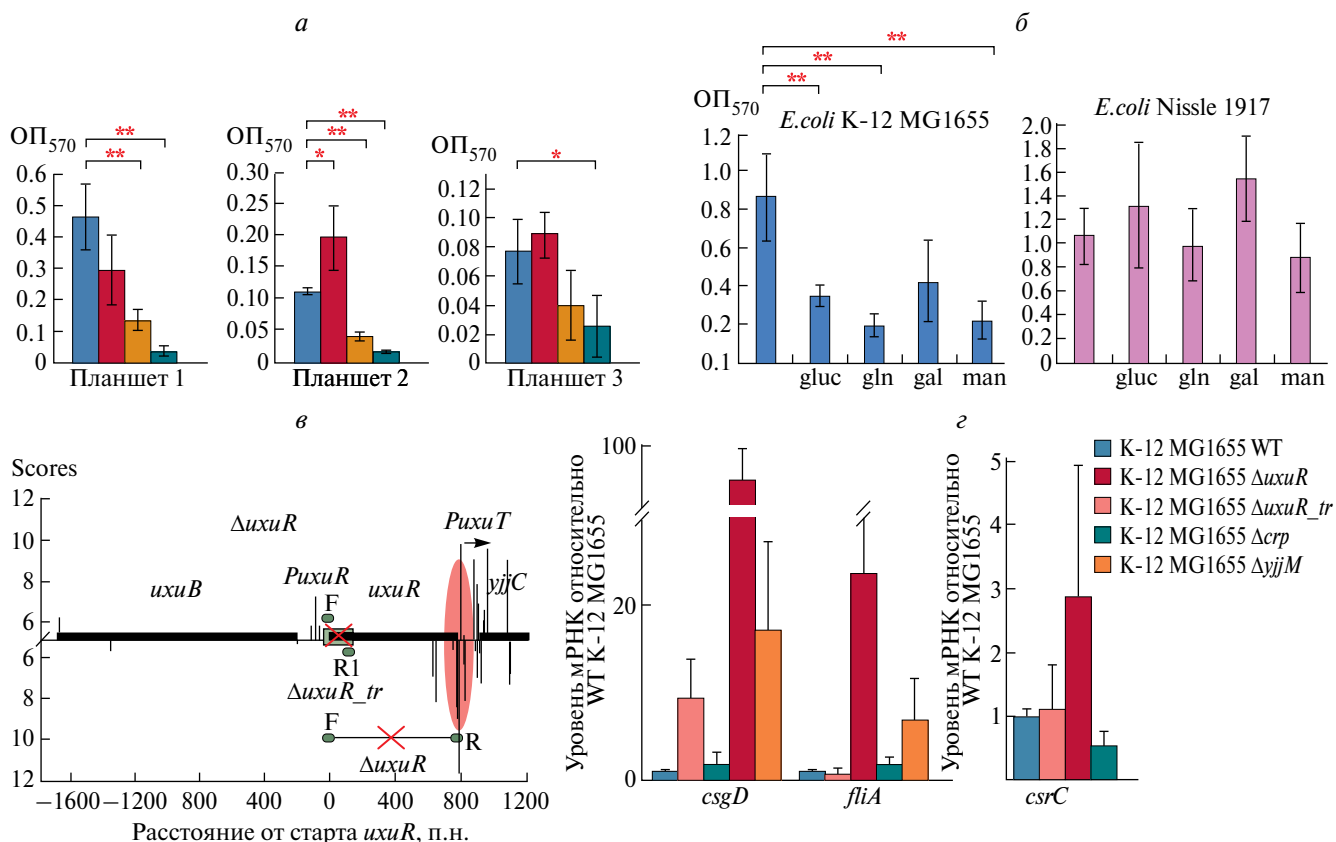


Рис. 2. а — Формирование биопленок (данные по трем планшетам в одном эксперименте). Штаммы описаны в легенде; б — влияние источника углерода на эффективность образования биопленок *E. coli* K-12 MG1655 и *E. coli* Nissle 1917; в — схема участков гена *uxuR*, удаленных в штаммах *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta uxuR$ и $\Delta uxuR_{tr}$. По оси ординат отложены скоры PlatProm, отражающие вероятность инициации транскрипции в конкретной точке. Место синтеза регуляторных РНК выделено розовым; г — динамика экспрессии генов *csgD*, *fliA* и *csrC* в *E. coli* K-12 MG1655 при удалении *uxuR*, *crp* и *yjiM*.

приведена динамика изменения экспрессии генов, кодирующих основные регуляторы процессов биопленкообразования (CsgD) и подвижности (FliA), а также малую РНК CsrC, в делеционных мутантах по генам *uxuR*, *yjjM* и *crp*. Эффекты от удаления *leuO* и *exuR* незначительны (данные не приведены), что согласуется с результатами экспериментов по адгезии и формированию биопленок. Поскольку ген *uxuR* кодирует не только фактор транскрипции, но и регуляторные РНК, ингибирующие подвижность бактерий за счет связывания с промоторной областью *fliA* (Tutukina et al., 2023), мы использовали два варианта мутантов — с полностью удаленным геном (*ΔuxuR*) и с выключенной трансляцией белка (*ΔuxuR-tr*) (схема приведена на рис. 2в). При удалении *uxuR* наблюдалась сильная активация *fliA*, сопровождавшаяся сильной дисперсией, что согласуется с данными экспериментов по образованию биопленок. В трансляционном же мутанте эта активация пропадает и повышается уровень *csgD*-мРНК, что подтверждает ингибиторную роль закодированных в *uxuR* малых РНК в отношении подвижности кишечной палочки дикого типа. В мутанте по *yjjM* такой сильной дисперсии уже не наблюдается: почти во всех случаях происходит активация *fliA*, как и ожидалось по результатам других экспериментов. Кроме того, YjjM, по-видимому, напрямую активирует малую РНК CsrC: при удалении *yjjM* экспрессия ее гена ингибирована более, чем в 50 раз (рис. 2г). При удалении *crp* активируется *csgD*, но ингибируется *csrC*, что согласуется с показанным ранее опосредованным влиянием CRP на образование биопленок.

Таким образом, гексуронаты влияют на процессы адгезии дикого типа *E. coli* K-12 MG1655 и ее способность к формированию биопленок. Поскольку D-глюкуронат, усиливая адгезию дикого типа *E. coli*, одновременно снижал формирование им биопленок (рис. 1) и не влиял на пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917 (рис. 1в и 2б), его можно рассматривать в качестве потенциальной пребиотической добавки. YjjM и глобальный регулятор сАМР-СРР являются активаторами процессов формирования биопленок и адгезии, а ключевой регулятор пути Эшвелла UxuR и закодированные в гене *uxuR* нетранслируемые РНК необходимы для нормального функционирования этих процессов. Полученные нами данные полностью подтверждают то, что метаболизм гексуронатов по пути Эшвелла и Энтнера–Дудорова играет важную роль в успешной колонизации *E. coli* кишечника хозяев.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны А. Шатровой и И. Ларичевой за помощь в проведении экспериментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке РФФИ АНФ-а 20-54-14005 и Госзадания № 075-00957-23-01.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bertin P., Terao E., Lee E.H., Lejeune P., Colson C., Danchin A., Collatz E. The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 5537–5540.
- Bessonova T.A., Rybina A.A., Marakulina D.A., Kaznadzey A.D., Gelfand M.S., Ozoline O.N., Tutukina M.N. Phylogeny and cross-regulation of the YjjM and LeuO transcription factors translated as multiple protein forms from one gene in *Escherichia coli* // Math. Biol. Bioinforma. 2023. V. 18. P. 1–14.
- Domka J., Lee J., Wood T.K. YliH (BssR) and YceP (BssS) Regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 2449–2459.
- Fabich A.J., Jones S.A., Chowdhury F.Z., Cernosek A., Anderson A., Smalley D., McHargue J.W., Hightower G.A., Smith J.T., Autieri S.M., Leatham M.P., Lins J.J., Allen R.L., Laux D.C., Cohen P.S., Conway T. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine // Infect. Immun. 2008. V. 76. P. 1143–1152.
- Fuentes D.N., Calderón P.F., Acuña L.G., Rodas P.I., Paredes-Sabja D., Fuentes J.A., Gil F., Calderón I.L. Motility modulation by the small non-coding RNA SroC in *Salmonella typhimurium* // FEMS Microbiol. Lett. 2015. V. 362. Art. fmv135.
- Guadarrama C., Villasenor T., Calva E. The subtleties and contrasts of the LeuO regulator in *Salmonella typhi*: implications in the immune response // Front. Immunol. 2014. V. 5. Art. 581.
- Gudapaty S., Suzuk, K., Wang X., Babitzke P., Romeo T. Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 6017–6027.
- Hammar M., Bian Z., Normark S. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles

- in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 6562–6566.
- Jackson D.W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J.W., Hart M.E., Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 290–301.
- Jackson D.W., Simecka J.W., Romeo T. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 3406–3410.
- Jimenez A.G., Ellermann M., Abbott W., Sperandio V. Diet-derived galacturonic acid regulates virulence and intestinal colonization in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* // Nat. Microbiol. 2019. V. 5. P. 368–378.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli* // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 123–140.
- Mehta I., Zimmern P., Reitzer L. Enzymatic assay of D-mannose from urine // Bioanalysis. 2018. V. 10. P. 1947–1954.
- Peekhaus N., Conway T. What's for dinner?: Entner–Doudoroff metabolism in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 3495–502.
- Pratt L.A., Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili // Mol. Microbiol. 1998. V. 30. P. 285–293.
- Rodrigues D.F., Elimelech M. Role of type 1 fimbriae and mannose in the development of *Escherichia coli* K12 biofilm: from initial cell adhesion to biofilm formation // Biofouling. 2009. V. 25. P. 401–411.
- Suvorova I.A., Tutukina M.N., Ravcheev D.A., Rodionov D.A., Ozoline O.N., Gelfand M.S. Comparative genomic analysis of the hexuronate metabolism genes and their regulation in gammaproteobacteria // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 3956–3963.
- Shimada T., Bridier A., Briandet R., Ishihama A. Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS // Mol. Microbiol. 2011. V. 82. P. 378–397.
- Tutukina M.N., Potapova A.V., Cole J.A., Ozoline O.N. Control of hexuronate metabolism in *Escherichia coli* by the two interdependent regulators, ExuR and UxuR: derepression by heterodimer formation // Microbiology (Reading). 2016. V. 162. P. 1220–1231.
- Tutukina M.N., Dakhnovets A.I., Kaznadzey A.D., Gelfand M.S., Ozoline O.N. Sense and antisense RNA products of the *uxuR* gene can affect motility and chemotaxis acting independent of the UxuR protein // Front. Mol. Biosci. 2023. V. 10. Art. 1121376.
- Verma R., Rojas T.C.G., Maluta R.P., Leite J.L., Da Silva L.P.M., Nakazato G., Dias Da Silveira W. Fimbria-encoding gene *yadC* has a pleiotropic effect on several biological characteristics and plays a role in avian pathogenic *Escherichia coli* pathogenicity // Infect. Immun. 2016. V. 84. P. 187–193.
- Wood T.K., González Barrios A.F., Herzberg M., Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 361–367.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Connection between Hexuronate Metabolism and the Ability of *Escherichia coli* to Adhesion and Biofilm Formation

T. A. Bessonova^{1, *}, U. D. Kuznetsova², A. T. Magkaev³, M. S. Gelfand^{4, 5},
O. N. Ozoline¹, and M. N. Tutukina^{1, 4, 5}

¹Institute of Cell Biophysics RAS (FSC PSCBS RAS), Pushchino, 142290, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russia

³HSE University, Moscow, 117418, Russia

⁴Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205, Russia

⁵Institute for Information Transmission Problems RAS, Moscow, 127051, Russia

*e-mail: tatianabessonova66@gmail.com

Received October 15, 2023; revised December 7, 2023; accepted December 8, 2023

Abstract. The formation of bacterial biofilms is an important factor of the chronic infection development, which requires the search for effective ways to prevent it. Here, it was found that hexuronates did not affect the biofilm formation by the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917 and its adhesive properties but reduced the efficiency of biofilm formation by the *E. coli* K-12 MG1655 strain, enhancing its adhesion to human intestinal carcinoma cells. It was shown that the regulators of hexuronate metabolism, UxuR and YjjM, are involved, along with cAMP-CRP, in the control of motility, adhesion and biofilm formation of *E. coli* K-12 MG1655. In addition, untranslated RNAs encoded in the *uxuR* gene play an important role inhibiting the main sigma factor of motility.

Keywords: biofilms, adhesion, *Escherichia coli* K-12 MG1655, Nissle 1917, hexuronate metabolism, UxuR, YjjM (LgoR)