



单核细胞增生李斯特菌二硫键形成蛋白 DsbA 调控胞间迁移的机制

王喆^{1#}, 蒋国^{1#}, 李静静¹, 王建峰², 许礼冬¹, 徐加利¹, 付展鸿¹, 秦潜¹, 宋厚辉¹, 程昌勇^{1*}, 夏菁^{1*}

- 1 浙江农林大学 动物科技学院·动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心, 浙江省动物医学与健康国际科技合作基地, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州 311300
- 2 宁波检验检疫科学技术研究院, 宁波海关技术中心, 浙江 宁波 315100

王喆, 蒋国, 李静静, 王建峰, 许礼冬, 徐加利, 付展鸿, 秦潜, 宋厚辉, 程昌勇, 夏菁. 单核细胞增生李斯特菌二硫键形成蛋白 DsbA 调控胞间迁移的机制[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4308-4318.

WANG Zhe, JIANG Guo, LI Jingjing, WANG Jianfeng, XU Lidong, XU Jiali, FU Zhanhong, QIN Qian, SONG Houhui, CHENG Changyong, XIA Jing. The disulfide bond formation protein DsbA in *Listeria monocytogenes* regulates cell-to-cell spread[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4308-4318.

摘要:【目的】实验室前期研究发现单核细胞增生李斯特菌(单增李斯特菌, *Listeria monocytogenes*)二硫键形成蛋白 DsbA 缺失后, 细菌胞间迁移能力增强, 本研究旨在深入解析 DsbA 介导该生物学过程的具体机制。【方法】通过荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹(Western blotting)方法比较单增李斯特菌野生株和 *dsbA* 缺失株毒力基因的转录和表达水平差异; 利用免疫荧光共定位方法观察 DsbA 缺失后对单增李斯特菌胞间迁移相关毒力因子 ActA 招募宿主肌动蛋白能力的影响(分析 ActA 与肌动蛋白共定位在细菌一侧形成“彗星”状尾巴的长短和数量); 通过等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)研究 DsbA 与 ActA 互作情况。【结果】*dsbA* 缺失后, 毒力基因转录水平无显著差异, 但毒力因子 InlA、InlB、PlcA 和 PlcB 的分泌均显著降低, 而 ActA、溶血素 O (listeriolysin O, LLO)分泌量显著升高。缺失株形成的彗星尾巴数量显著高于野生株且平均长度也较野生株增加, 说明 *dsbA* 缺失导致细菌招募肌动蛋白能力明显增强。ITC 试验发现 DsbA 与 ActA 结合存在吸热反

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801800); 浙江省自然科学基金(LQ22C180001); 国家级大学生创新创业训练计划(202310341018); 宁波市自然科学基金(2022J200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801800), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ22C180001), the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202310341018), and the Ningbo Natural Science Foundation (2022J200).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: XIA Jing, xiajing125@zafu.edu.cn; CHENG Changyong, lamge@zafu.edu.cn

Received: 2024-05-16; Accepted: 2024-09-03; Published online: 2024-09-04

应, 说明二者互作。【结论】本研究证实单增李斯特菌 DsbA 通过调控毒力蛋白减弱了对肌动蛋白募集, 进而影响细菌胞间迁移。研究结果有助于系统理解单增李斯特菌在宿主感染过程中的毒力调控机制, 对人兽共患胞内病原菌的污染控制具有重要公共卫生学意义。

关键词: 单增李斯特菌; 二硫键形成蛋白 DsbA; 胞间迁移; 肌动蛋白募集

The disulfide bond formation protein DsbA in *Listeria monocytogenes* regulates cell-to-cell spread

WANG Zhe^{1#}, JIANG Guo^{1#}, LI Jingjing¹, WANG Jianfeng², XU Lidong¹, XU Jiali¹, FU Zhanhong¹, QIN Qian¹, SONG Houhui¹, CHENG Changyong^{1*}, XIA Jing^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China
² Technical Center of Ningbo Customs, Ningbo Academy of Quarantine & Inspection Science and Technology, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] In view of the enhanced cell-to-cell spread ability of the *dsbA*-deleted strain ($\Delta dsbA$) of *Listeria monocytogenes*, this study aims to elucidate the mechanism that how the disulfide bond formation protein DsbA mediates this biological process. **[Methods]** The mRNA and protein levels of virulence factors in the wild type and $\Delta dsbA$ were compared by RT-qPCR and Western blotting, respectively. The immunofluorescence co-localization analysis method was employed to observe the impact of DsbA deficiency on the actin recruitment by the virulence factor ActA in the cell-to-cell spread of *L. monocytogenes* (analyzing the length and quantity of the comet tails formed on one side of the bacteria by co-localization of ActA and actin). The presence or absence of interaction between DsbA and ActA was determined by isothermal titration calorimetry (ITC). **[Results]** Compared with the wild type, $\Delta dsbA$ showed no significant changes in the mRNA levels of virulence factors, downregulated protein levels of InlA, InlB, PlcA, and PlcB, and upregulated protein levels of ActA and LLO. In addition, $\Delta dsbA$ showed increased number and average length of comet tails, which indicated that the actin recruitment of $\Delta dsbA$ was enhanced. The ITC results revealed that DsbA bound to ActA, which gradually showed endothermic reactions, suggesting the presence of interaction between DsbA and ActA. **[Conclusion]** This study proved for that DsbA attenuated the recruitment ability of actin by regulating virulence proteins, thus affecting the cell-to-cell spread of *L. monocytogenes*. The findings help to further dissect the virulence regulatory mechanisms of *L. monocytogenes* during host infection, which is of great importance for controlling the contamination of zoonotic intracellular pathogens threatening public health.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; disulfide bond formation protein DsbA; cell-to-cell spread; actin recruitment

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)，简称单增李斯特菌 (*L. monocytogenes*)，是一种重要的人兽共患食源性病原菌^[1]。人或动物食用被单增李斯特菌污染的食物后，细菌可穿过机体的肠道屏障、血脑屏障及胎盘屏障，在临床上表现为发热型肠炎、菌血症、脑膜炎以及孕妇的胎儿-胎盘感染等症状，致死率可达 20%–30%^[2-4]。因此，对该病原体的防控研究具有重要的公共卫生学意义。

作为胞内寄生菌，单增李斯特菌拥有一套完整的毒力因子参与胞内感染和胞间迁移。在感染过程中，单增李斯特菌首先利用表面蛋白内化素 A (internalin A, InlA) 和内化素 B (internalin B, InlB) 分别与细胞表面受体 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和肝细胞生长因子 (cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-MET) 进行结合，并侵入宿主细胞^[5]，然后在溶血素 O [listeriolysin O (LLO)，由 *hly* 编码]、磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PlcA) 和金属蛋白酶 Mpl 的参与下裂解吞噬体膜^[6]，在进入宿主胞浆后利用胞内营养物质进行增殖，最后通过肌动蛋白聚集因子 (actin assembly-inducing protein, ActA) 募集宿主肌动蛋白 (actin) 形成肌动蛋白尾巴 (形似“彗星状”)，推动细菌向邻近细胞迁移，进入次级感染的细胞再次通过 LLO、非特异性磷脂酰胆碱磷脂酶 C (non-specific phosphatidylcholine phospholipase C, PlcB) 裂解双层膜结构的次级吞噬体，从而开始新一轮的细胞感染周期^[7-8]。

单增李斯特菌毒力蛋白的合成分泌需要多种蛋白和系统的调控，例如肽基-脯氨酰顺反异构酶 PrsA2 能促进毒力蛋白的折叠，保证其活性^[9]；硫氧化蛋白 TrxA 的缺失能够通过降低毒力基因的转录水平，从而影响毒力蛋白的表达，

降低细菌的毒力^[10]。然而二硫键形成蛋白 (disulfide bond formation protein, Dsb) 的缺失也会影响单增李斯特菌的毒力，说明其可能参与单增李斯特菌毒力蛋白的表达过程^[11]。二硫键形成蛋白是一类能够催化新生肽链形成二硫键的蛋白^[12]。含有半胱氨酸 (cysteine, Cys) 的新生肽链通过形成二硫键进行折叠，形成具有成熟构象的功能蛋白在生命活动中发挥作用。对于许多细菌来说，Dsb 蛋白与细菌毒力功能的表达息息相关。多数细菌表达广泛的二硫化物结合的毒力因子，如黏附素、菌毛、分泌毒素等，参与了细菌黏附、对宿主细胞调控、胞间迁移和存活等多方面^[13-16]。

本实验室前期通过对单增李斯特菌基因组分析并进行功能验证，发现单增李斯特菌 *lmo1059* 编码 DsbA 蛋白 (该蛋白原本命名为 DsbG^[17])，后通过结构和功能试验结果的分析，与 DsbA 更相似，因此更名为 DsbA^[11])。同时，本实验室的前期研究发现，缺失蛋白 DsbA 后，单增李斯特菌的胞间迁移能力显著增强^[11]，但具体机制未知。因此，本研究通过对毒力蛋白的转录水平、表达水平、免疫荧光试验以及等温滴定量热法，研究二硫键形成蛋白 DsbA 影响单增李斯特菌胞间迁移的机制，这为后续深入研究单增李斯特菌感染机制提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所涉单增李斯特菌野生株 EGD-e、缺失株 $\Delta dsbA$ (缺失 DsbA 蛋白) 和带有 GFP 荧光标签蛋白的野生株和缺失株，人宫颈癌上皮细胞 (HeLa)，毒力蛋白相关抗体均由本实验室保存。

BHI (brain and heart infusion broth)，Oxoid 公司；DMEM 细胞培养基、血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.25% Trypsin-EDTA、鬼笔环肽

和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染料, 赛默飞世尔科技公司; 氯霉素, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; BCA 蛋白浓度试剂盒, 上海碧云天生物科技股份有限公司; 柱式细菌总 RNA 抽提纯化试剂盒、Kisser's 封片剂、Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)HRP-tag、Goat Anti-Mouse IgG(H+L)HRP-tag, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix, TaKaRa 公司。

李斯特菌裂解液: 称量 SDS 10 g、NaCl 5.84 g、EDTA 0.292 g, 用 800 mL ddH₂O 溶解后, 再加入 20 mL Triton X-100 和终浓度为 10 mmol/L 的 Tris-HCl, 将 pH 调至 8.0 后, 用 ddH₂O 补足至 1 L。分泌蛋白溶解液: 称量 EDTA 2.92 g、尿素 360 g 和 SDS 5 g, 用 800 mL ddH₂O 溶解后, 再加入终浓度为 200 mmol/L 的 Tris-HCl, 调 pH 至 8.0 后, 用 ddH₂O 补足 1 L^[18]。

1.2 引物合成

本研究所用引物均由杭州有康生物科技有限公司合成, 序列详见表 1。

1.3 荧光定量分析毒力基因的转录水平

1.3.1 野生株 EGD-e 和缺失株 $\Delta dsbA$ 的总 RNA 提取

将野生株 EGD-e 及缺失株 $\Delta dsbA$ 单克隆接种至含有 BHI 液体培养基的细菌瓶中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 次日, 按 1:100 转接至 10 mL BHI 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 扩大培养 4–5 h, 使 OD_{600} 达到 0.5, 收集菌体, 10 mmol/L PBS 洗涤后, 用 20 mg/mL 溶菌酶重悬, 室温反应 10 min, 采用柱式细菌总 RNA 抽提纯化试剂盒提取 RNA, 之后利用多功能酶标仪检测 RNA 含量和纯度, 所得 RNA 放至 -80 °C 保存。

1.3.2 RT-qPCR

以所提的 RNA 为模板, 通过反转录试剂盒进行逆转录, 获得的产物 cDNA 即为 RT-qPCR

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Oligonucleotide sequences (5'→3')
<i>actA</i> -RT-fwd	CAGCAGATGAGTCTTCACCACA
<i>actA</i> -RT-rev	CAGCAGATGAGTCTTCACCACA
<i>hly</i> -RT-fwd	ATTACCGTTCTCCACCATTCC
<i>hly</i> -RT-rev	TCACATCGTCCATCTATTTGCC
<i>plcB</i> -RT-fwd	CGCCCTTTTCGCATTTTC
<i>plcB</i> -RT-rev	ATCATACCCTCCAGGCTACCA
<i>plcA</i> -RT-fwd	CGTGTCAGTTCTGGGAGTAGTGTA
<i>plcA</i> -RT-rev	CGAGCAAAACAGCAACGATAG
<i>inlA</i> -RT-fwd	TAGCGATGGCGGTAGTTACACAGA
<i>inlA</i> -RT-rev	TTAAGTGGCTGCGTCACGGTTC
<i>inlB</i> -RT-fwd	GTGCGAGGCTAGAGTTCCTTGTT
<i>inlB</i> -RT-rev	GCAGTCAACTTAACCCGCTATGTCA
<i>mpl</i> -RT-fwd	CTTTCAGTGGGTTTCCGACATA
<i>mpl</i> -RT-rev	CAGCAAGGACAGCTTAGGATTAC
<i>prfA</i> -RT-fwd	CGATGCCACTTGAATATCCTAACT
<i>prfA</i> -RT-rev	CGATGCCACTTGAATATCCTAACT
<i>rpoB</i> -RT-fwd	CTACACTTAGGTATGGCTGCTCG
<i>rpoB</i> -RT-rev	GGCTTCTTCCACTGTGCTCC

的模板。按照 SYBR qPCR Master Mix 试剂说明书对与细菌感染相关的毒力因子 *actA*、*hly*、*plcA*、*plcB*、*inlA*、*inlB*、*mpl*、*prfA* 及 *rpoB* rRNA 基因(作为内参基因)进行 RT-qPCR。转录水平变化使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析, 利用 GraphPad Prism 8 软件对所得数据进行处理分析, 相对差异倍数用 log₂ fold change 表示。

1.4 野生株 EGD-e 和缺失株 $\Delta dsbA$ 的全菌蛋白和分泌蛋白的提取

将野生株 EGD-e 及缺失株 $\Delta dsbA$ 单克隆接种至含有 BHI 液体培养基的细菌瓶中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜, 12 000 r/min 离心 2 min 分离得到上清液和菌体。用 10 mmol/L PBS 洗涤菌体后重新收集菌体, 加入配制好的 500 μ L 李斯特菌裂解液重悬菌体, 静置 5 min, 加入研磨珠进行充分研磨, 4 °C、10 000 r/min 离心 2 min, 离心所得上清即为全菌蛋白。另将过夜培养细菌离心分离得到的上清液用 0.22 μ m 过

滤器进行过滤,向滤液中加入终体积 10%的三氯乙酸,冰上静置过夜,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,弃上清后,向沉淀中加入 1 mL 配制好的分泌蛋白溶解液,溶解沉淀得到分泌蛋白^[18]。

1.5 Western blotting 分析毒力蛋白的表达水平

提取野生株 EGD-e 和缺失株 $\Delta dsbA$ 的全菌蛋白和分泌蛋白,利用 10 mmol/L PBS 对蛋白进行定量,取等量蛋白进行 SDS-PAGE。将蛋白转印至 PVDF 膜上,用 5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,分别加入 ActA、LLO、PlcA、PlcB、InlA、InlB、Mpl 和内参 GAPDH、P60 抗体(杭州华安生物技术有限公司),4 °C 孵育过夜;分别加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (对应蛋白 PlcA、PlcB、InlA、InlB、Mpl、GAPDH 和 P60)和羊抗鼠 IgG (对应蛋白 ActA 和 LLO),室温孵育 1 h;避光滴加显影液,化学发光成像仪曝光并保存结果,利用 ImageJ 对整个条带面积进行灰度分析,并利用 GraphPad Prism 8 软件对所得数据进行处理分析并绘图。

1.6 免疫荧光共定位观察彗星尾巴

将经消毒后的细胞爬片添加到 24 孔的细胞培养板中,对 HeLa 细胞进行细胞计数,将细胞以每孔 1.5×10^5 个的密度平均分散地铺在放置了细胞爬片的 24 孔细胞培养板;培养基为 10% FBS 的 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 12 h。将过夜培养的野生株 EGD-e 和缺失株 $\Delta dsbA$ 按照 MOI=1 000:1 感染 HeLa 细胞,将细胞放于不含血清的 DMEM 培养基中,置于含有 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 1 h;结束后每孔加入 500 μ L 终浓度为 50 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 细胞培养基,用以杀灭胞外菌;杀灭胞外菌 1 h 后,加入 500 μ L 终浓度为 5 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 细胞培养基继续培养 3 h。然后用多聚甲醛固定 30 min、

Triton X-100 透化 10 min;接着用鬼笔环肽对肌动蛋白染色 1 h,再用 DAPI 染色液对细胞核染色 10 min。染色完成后,制片并利用共聚焦显微镜观察拍摄,统计分析彗星尾巴的长短、数量,并利用 GraphPad Prism 8 软件对所得数据进行处理分析制图。

1.7 等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)判断 DsbA 和 ActA 是否互作

利用实验室构建好的 DsbA 和 ActA 蛋白原核表达菌株^[11,19]进行蛋白诱导表达与纯化,得到高纯度、高浓度的 DsbA 和 ActA 蛋白。利用等温滴定量热仪进行滴定,注射器内加入蛋白的量为 0.5 mL,样品池为 1.4 mL,将高浓度(140 μ mol/L)的 DsbA 蛋白按照每次 15 μ L、间隔 180 s 滴定至低浓度(10 μ mol/L)的 ActA 蛋白中,反应在 25 °C、25 mmol/L Tris-HCl 和 100 mmol/L NaCl 缓冲液(pH 为 7.5)中进行。试验结束后,对所得到的数据进行拟合分析,通过对 ΔH 和 ΔS 的分析^[20-21],判断 DsbA 是否与 ActA 相互作用。

1.8 数据处理

数据使用 GraphPad Prism 8 软件进行 *t* test 统计学分析,数据用 mean \pm SD 表示。其中 ns 表示 $P>0.05$, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 *dsbA* 缺失对细菌感染相关毒力因子转录水平的影响

提取 37 °C 中无应激条件下野生株 EGD-e 和缺失株 $\Delta dsbA$ 的 RNA 并定量进行反转录,以得到的 cDNA 为模板,用 RT-qPCR 对相关毒力基因的转录水平进行测定、分析,结果如图 1 所示。RT-qPCR 结果表明,缺失 *dsbA* 后, *actA*、*hly* 等

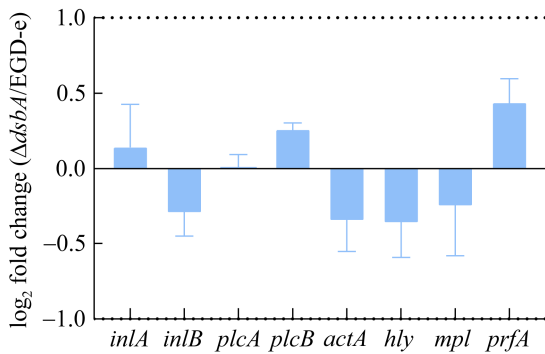


图 1 *dsbA* 缺失后毒力因子转录水平

Figure 1 Transcription levels of virulence genes after *dsbA* deletion in *Listeria monocytogenes*. Data are expressed as mean±SD of three independent experiments.

毒力基因转录水平均无显著性差异($P>0.05$), 说明 *dsbA* 缺失对胞间迁移相关的毒力基因在转录水平上均无显著影响。

2.2 *dsbA* 缺失对细菌感染相关毒力蛋白表达量的影响

为进一步验证 DsbA 蛋白缺失后毒力蛋白表达水平, 提取 37 °C 中无应激条件下野生株 EGD-e 和缺失株 Δ*dsbA* 的全菌蛋白和分泌蛋白, 取等量蛋白进行 Western blotting 检验, 并用 ImageJ 软件进行灰度分析, 结果分别如图 2 和图 3 所示。与野生株相比, 缺失株 Δ*dsbA* 的全菌蛋白中 InlA、InlB 和 LLO 表达显著降低

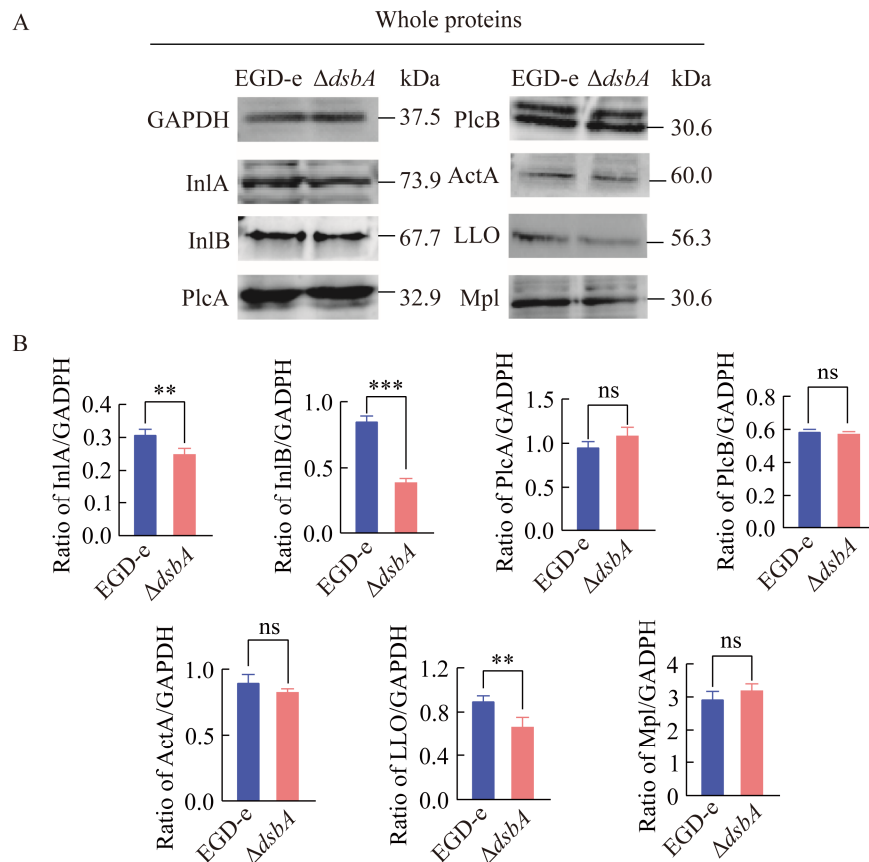


图 2 *DsbA* 缺失后对全菌蛋白中毒力蛋白表达量的影响以及灰度分析

Figure 2 Effect of DsbA deletion on the expression of bacterial whole cell lysis proteins and corresponding grayscale analysis. A: Representative Western blotting images of whole proteins. B: The relative protein level of tested virulence proteins. Data are expressed as mean±SD of three independent experiments. ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

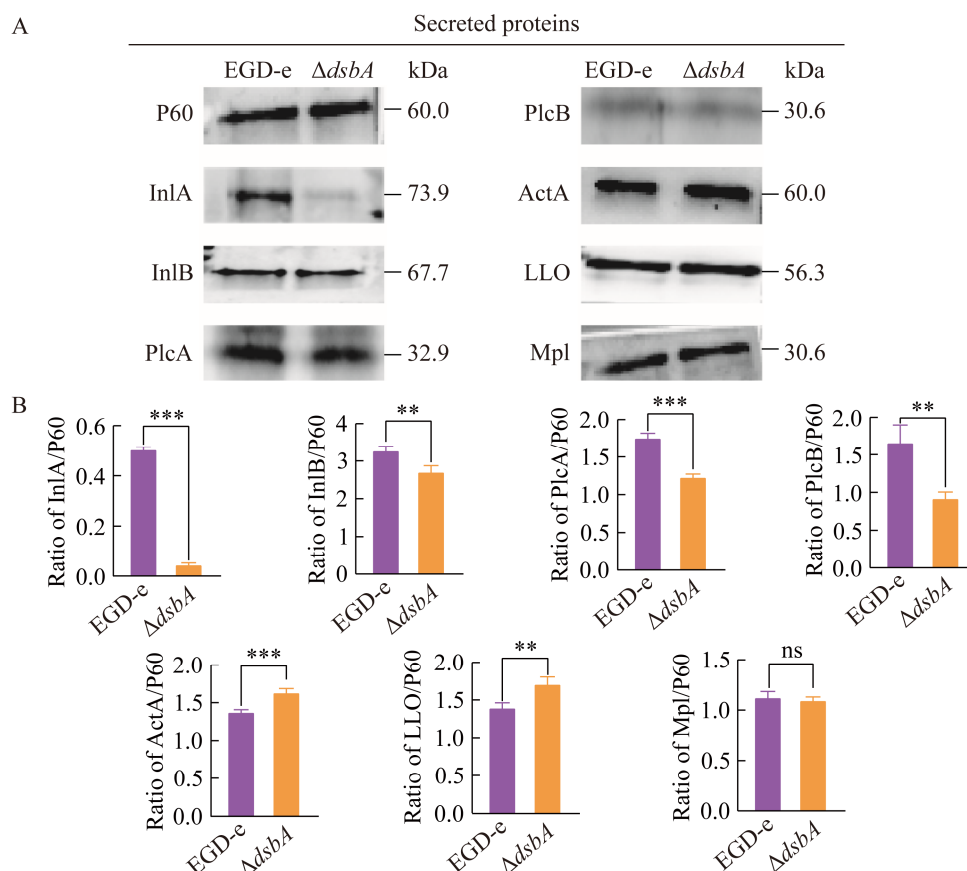


图 3 DsbA 缺失后对分泌蛋白中毒力蛋白表达量的影响以及灰度分析

Figure 3 Effect of DsbA deletion on the expression of bacterial secreted virulence proteins and corresponding grayscale analysis. A: Representative Western blotting images of secreted virulence proteins. B: The relative protein level of secreted virulence proteins. Data are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

($P < 0.01$), ActA 表达量无显著差异($P > 0.05$)。然而在分泌蛋白中, PlcA、PlcB、InlA 和 InlB 表达显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), LLO、ActA 表达却显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。因为 LLO 和 ActA 主要通过分泌到细菌体外发挥作用, 所以分泌蛋白的结果表明 DsbA 缺失后, 可能通过介导与胞间迁移功能密切相关的蛋白(LLO、ActA)合成分泌, 从而影响细菌的胞间迁移能力。

2.3 *dsbA* 缺失对细菌肌动蛋白募集能力影响

鉴于 ActA 是肌动蛋白募集因子, 能够在细菌细胞间迁移过程中募集肌动蛋白, 从而形成“彗星状尾巴”。为进一步验证 DsbA 对 ActA 表

达量的调控是否会影响细菌的胞间迁移, 使用带有 GFP 荧光标签的野生株 EGD-e 和缺失株 $\Delta dsbA$ 感染 HeLa 细胞, 之后再对细胞进行 F-actin 染色, 通过共聚焦显微镜进行观察拍摄, 统计“彗星状尾巴”的大小和数量, 选取了 20 个视野对“彗星状尾巴”的形态、数量进行统计分析, 每个视野细胞数量在 8–12 个, 结果如图 4 所示。分析结果表明, 缺失了 DsbA 后, 各形态下的“彗星状尾巴”的数量都显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 说明细菌募集肌动蛋白的能力显著增强, 即缺失 DsbA 后, 细菌因肌动蛋白募集能力提高而增强胞间迁移能力。

2.4 DsbA 与 ActA 蛋白相互作用关系探究

通过 Western blotting 试验和共聚焦显微镜观察可以发现, 在 DsbA 缺失后 ActA 蛋白的表达量显著升高, 并且细菌肌动蛋白募集能力显

著上升, 为了明确 DsbA 是否与 ActA 存在相互作用, 本研究进一步利用 ITC 对蛋白之间的关系进行了探究。如图 5 所示, 随着 ITC 试验的进行, DsbA 和 ActA 反应逐步呈现吸热反应, 表明在这

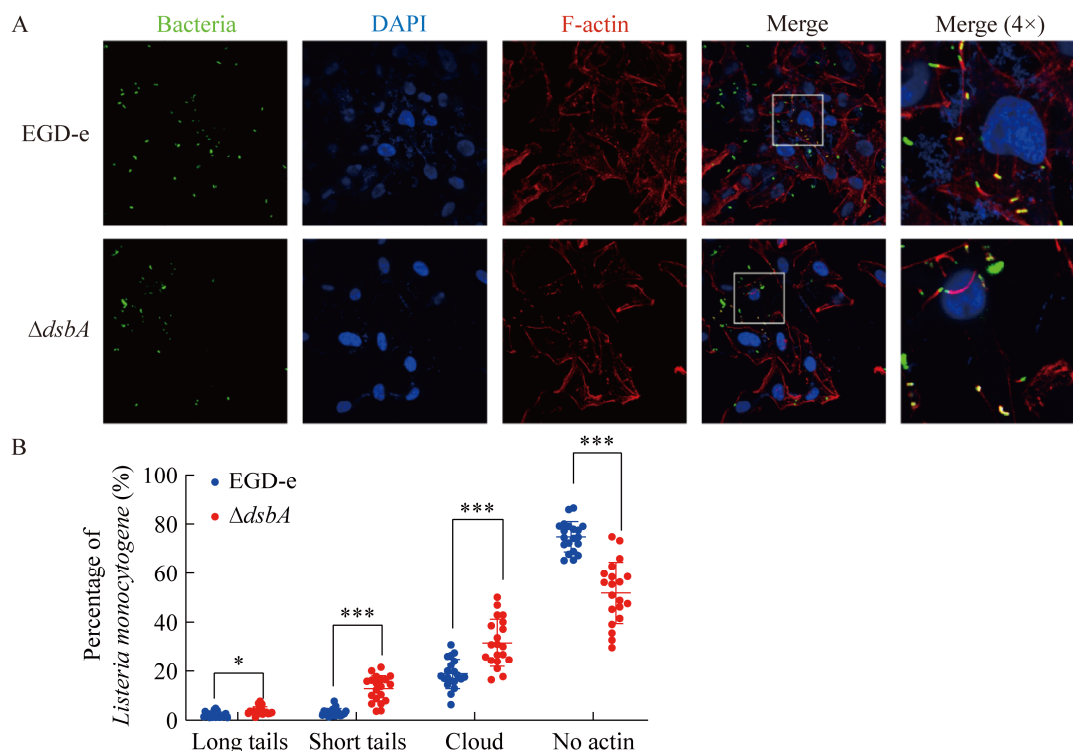


图 4 单增李斯特菌感染 HeLa 细胞“彗星状尾巴”形成情况分析

Figure 4 Analysis of comet tail formation in HeLa cells infected with *Listeria monocytogenes*. A: HeLa cells were infected with the wild type strain (EGD-e) and the *dsbA*-deleted strain ($\Delta dsbA$) with fluorescent markers. Confocal microscopy was used to observe the infection process. B: Quantitative analysis of comet tail morphology and number. Data are expressed as mean \pm SD of twenty views. *: $P<0.05$; ***, $P<0.001$.

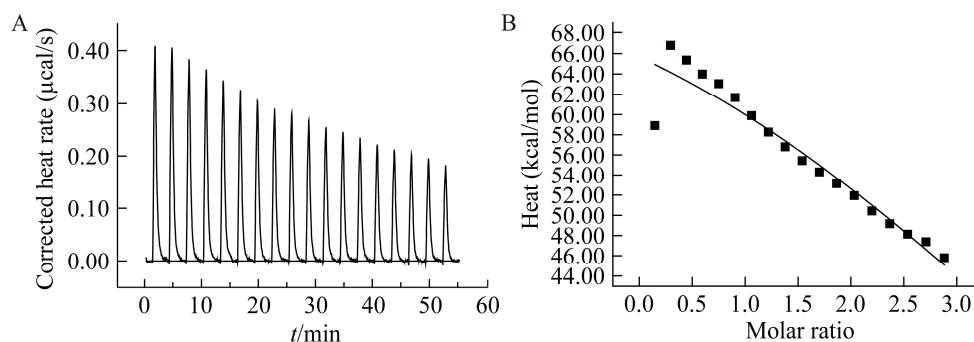


图 5 ITC 试验分析 DsbA 与 ActA 互作关系

Figure 5 The interaction analysis between DsbA and ActA by ITC test. A: Calorimetric peak profiles of the reaction of DsbA and ActA in buffer. B: ITC fitting data for the reaction of DsbA and ActA in buffer.

一过程中,这 2 个蛋白通过互作时化学键的断裂和形成,吸收大量的化学能量,呈现吸热反应,说明 DsbA 和 ActA 存在互作。

3 讨论与结论

目前关于 Dsb 蛋白与细菌毒力相关的研究在革兰阴性菌中报道较多。例如,在铜绿假单胞菌中,DsbA 对于毒力因子的表达和细菌正常感染能力的维持起重要作用^[22]。当副溶血弧菌的 2 个 *dsbA* 基因缺失后,对 Caco-2 细胞的黏附及 HeLa 细胞的毒性都降低了^[23]。幽门螺杆菌的 HP0231 具有 DsbA 活性,它对于 HcpE 的折叠、溶解、生成和分泌非常重要,而这种蛋白被认为有助于提高细菌的毒力^[24]。Dsb 或类 Dsb 蛋白参与革兰阳性菌感染过程也有少量报道。例如,硫醇-二硫键氧化还原酶 MdbA 对于白喉棒状杆菌菌毛蛋白和毒力蛋白的折叠起到至关重要的作用^[25];在炭疽芽胞杆菌中,硫醇-二硫键氧化还原酶蛋白 CcdA 可以通过影响主要毒力调节因子 AtxA 的转录水平,从而影响细菌毒力^[26]。这些研究都说明 Dsb 蛋白可以通过影响细菌毒力因子的转录或表达来影响细菌的致病性,并且 Dsb 蛋白对毒力因子的影响通常都是正向的。

单增李斯特菌的主要毒力岛 (*Listeria* pathogenicity island 1, LIPI-I)是由毒力基因 (*prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*)组成^[27]。这些毒力因子和 InlA、InlB 等在单增李斯特菌感染非吞噬细胞时发挥主要作用^[28]。在细胞感染过程中,ActA 能够募集肌动蛋白形成“彗星状尾巴”,推动细菌在胞质和细胞间运动,从而使细菌逃脱先天免疫,并引起邻近细胞的持续性感染^[29]。在实验室的前期研究中发现,缺失二硫键形成蛋白 DsbA 后,单增李斯特菌的细胞间迁移能力显著增强^[11],而细胞间迁移能力与毒力蛋白

的表达量有关。二硫键形成蛋白 DsbA 对单增李斯特菌胞间迁移的“负向”影响与之前其他菌株中的报道存在差异,因此,本研究针对 DsbA 影响细菌胞间迁移的机制展开研究。

本研究首先发现缺失株 $\Delta dsbA$ 中毒力基因的转录水平未发生显著变化(图 1),但是毒力蛋白表达量特别是 LLO、ActA 蛋白分泌量较野生株有显著升高(图 3),说明 DsbA 的缺失会影响毒力蛋白的分泌,并且 DsbA 对 LLO、ActA 的分泌呈负调控作用。由于这些毒力蛋白的转录水平并未发生显著变化,所以毒力蛋白表达量的变化证明 DsbA 可能参与毒力蛋白如 ActA 的转录后或翻译后修饰^[24,27]。我们还通过共聚焦显微镜观察发现,在缺失了 DsbA 后,彗星尾巴数量显著增多,表明细菌肌动蛋白的募集能力显著增强(图 4),单增李斯特菌胞间迁移能力与细菌募集肌动蛋白能力直接相关^[29]。因此这可能是 DsbA 缺失后,细菌胞间迁移能力增强的原因。同时,这一结果与前面蛋白表达量验证的结果一致,证明 DsbA 确实参与 ActA 的分泌或修饰过程。因为 ActA 是影响细菌募集肌动蛋白的主要毒力因子,因此为进一步探究 DsbA 与 ActA 之间是否存在相互作用,本研究进行了 ITC 试验,结果发现 DsbA 与 ActA 呈吸热反应 ($\Delta H > 0$),且 $\Delta S > 0$,表明 DsbA 与 ActA 存在互作反应^[20-21]。

Footer 等研究证明 ActA 是一个未折叠的单体蛋白^[30],而且 ActA 可以与自身相互作用在细菌表面交联形成同源二聚体^[31]。当二聚体是平行二聚体时,并不会影响其结构功能,但当 ActA 在 N 端形成反平行二聚体时,ActA 会在细菌表面形成环状,影响肌动蛋白尾部的形成以及体内细菌表面 ARP2/3 复合物的募集^[32],从而影响本身的结构与功能^[30]。在 2 个 ActA 中的半胱氨酸互相交联形成二聚体的这一过程

中, DsbA 作为二硫键形成蛋白, 可能会促进半胱氨酸之间形成二硫键, 促进 ActA 之间形成二硫键, 进而影响 ActA 的功能^[30]。即单增李斯特菌二硫键形成蛋白 DsbA 对 ActA 功能的负向作用与之前报道的其他细菌中 Dsb 蛋白对毒力因子的正向影响完全不同。然而, 具体 DsbA 如何影响 ActA 蛋白结构和功能还无法明确, 需要进一步研究。

本研究证明了在单增李斯特菌中, 二硫键形成蛋白 DsbA 可以通过调控毒力蛋白的表达量及细菌募集肌动蛋白的能力来影响细菌的胞间迁移能力, 并且 DsbA 与 ActA 存在互作。本研究有助于进一步解析单增李斯特菌在宿主感染过程中的调控机制, 为后续深入研究单增李斯特菌感染机制提供更多理论依据。

参考文献

- [1] RADOSHEVICH L, COSSART P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 32-46.
- [2] OEVERMANN A, ZURBRIGGEN A, VANDEVELDE M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise?[J]. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010, 2010: 632513.
- [3] DESAI AN, ANYOHA A, MADOFF LC, LASSMANN B. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: a review of ProMED reports from 1996 to 2018[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2019, 84: 48-53.
- [4] 李文艳, 陈滢滢, 刘纯甫, 李晓宁, 李雪晨, 张伟伟, 管越强. 单增李斯特菌感染致妊娠失败的研究进展[J]. *生命科学*, 2020, 32(6): 614-620.
LI WY, CHEN YY, LIU CF, LI XN, LI XC, ZHANG WW, GUAN YQ. Research progress on pregnancy failure induced by *Listeria monocytogenes* infection[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2020, 32(6): 614-620 (in Chinese).
- [5] PIZARRO-CERDÁ J, COSSART P. Microbe Profile: *Listeria monocytogenes*: a paradigm among intracellular bacterial pathogens[J]. *Microbiology*, 2019, 165(7): 719-721.
- [6] PHELPS CC, VADIA S, ARNETT E, TAN YB, ZHANG XL, PATHAK-SHARMA S, GAVRILIN MA, SEVEAU S. Relative roles of listeriolysin O, InlA, and InlB in *Listeria monocytogenes* uptake by host cells[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(10): e00555-18.
- [7] QUEREDA JJ, MORÓN-GARCÍA A, PALACIOS-GORBA C, DESSAUX C, GARCÍA-DEL PORTILLO F, PUCCIARELLI MG, ORTEGA AD. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: a trip from environmental to medical microbiology[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 2509-2545.
- [8] McDOUGAL CE, SAUER JD. *Listeria monocytogenes*: the impact of cell death on infection and immunity[J]. *Pathogens*, 2018, 7(1): 8.
- [9] CAHOON LA, FREITAG NE. *Listeria monocytogenes* virulence factor secretion: don't leave the cell without a chaperone[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 13.
- [10] CHENG CY, DONG ZM, HAN X, WANG H, JIANG L, SUN J, YANG YC, MA TT, SHAO CY, WANG XD, CHEN ZW, FANG WH, FREITAG NE, HUANG HR, SONG HH. Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [11] XIA J, LUO YR, CHEN MM, LIU YQ, WANG Z, DENG SM, XU JL, HAN Y, SUN J, JIANG LL, SONG HH, CHENG CY. Characterization of a DsbA family protein reveals its crucial role in oxidative stress tolerance of *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(6): e0306023.
- [12] ROBINSON PJ, BULLEID NJ. Mechanisms of disulfide bond formation in nascent polypeptides entering the secretory pathway[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 1994.
- [13] HERAS B, SHOULDICE SR, TOTSIKA M, SCANLON MJ, SCHEMBRI MA, MARTIN JL. DSB proteins and bacterial pathogenicity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(3): 215-225.
- [14] DAVEY L, HALPERIN SA, LEE SF. Thiol-disulfide exchange in Gram-positive firmicutes[J]. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(11): 902-915.
- [15] BUSHWELLER JH. Protein disulfide exchange by the intramembrane enzymes DsbB, DsbD, and CcdA[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(18): 5091-5103.

- [16] AHMAD S, KHAN H, SHAHAB U, REHMAN S, RAFI Z, KHAN MY, ANSARI A, SIDDIQUI Z, ASHRAF JM, ABDULLAH SMS, HABIB S, UDDIN M. Protein oxidation: an overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine[J]. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 2017, 9(1): 71-87.
- [17] 刘雨晴, 夏菁, 王喆, 费定润, 罗亚如, 陈绵绵, 江玲丽, 宋厚辉, 程昌勇. 单增李斯特菌二硫键形成蛋白 DsbG 介导酸耐受及鞭毛运动性调控[J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 700-716.
- LIU YQ, XIA J, WANG Z, FEI DR, LUO YR, CHEN MM, JIANG LL, SONG HH, CHENG CY. Role of DsbG in acid tolerance and flagella-mediated motility of *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 700-716 (in Chinese).
- [18] CHENG CY, WANG XW, DONG ZM, SHAO CY, YANG YC, FANG WH, FANG C, WANG H, YANG MH, JIANG LL, ZHOU XY, SONG HH. Aminopeptidase T of M29 family acts as A novel intracellular virulence factor for *Listeria monocytogenes* infection[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17370.
- [19] FANG C, CAO T, CHENG CY, XIA Y, SHAN Y, XIN YP, GUO NN, LI XL, SONG HH, FANG WH. Activation of PrfA results in overexpression of virulence factors but does not rescue the pathogenicity of *Listeria monocytogenes* M7[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2015, 64(8): 818-827.
- [20] TSVETKOV PO, BARBIER P, BREUZARD G, PEYROT V, DEVRED F. Microtubule-associated proteins and tubulin interaction by isothermal titration calorimetry[J]. *Methods in Cell Biology*, 2013, 115: 283-302.
- [21] VELAZQUEZ-CAMPOY A, LEAVITT SA, FREIRE E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2015, 1278: 183-204.
- [22] ARTS IS, BALL G, LEVERRIER P, GARVIS S, NICOLAES V, VERTOMMEN D, IZE B, TAMU DUFE V, MESSENS J, VOULHOUX R, COLLET JF. Dissecting the machinery that introduces disulfide bonds in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *mBio*, 2013, 4(6): e00912-13.
- [23] WU CQ, ZHANG T, ZHANG WW, SHI MT, TU F, YU A, LI MM, YANG MH. Two DsbA proteins are important for *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1103.
- [24] ZHONG Y, ANDERL F, KRUSE T, SCHINDELE F, JAGUSZTYN-KRYNICKA EK, FISCHER W, GERHARD M, MEJÍAS-LUQUE R. *Helicobacter pylori* HP0231 influences bacterial virulence and is essential for gastric colonization[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154643.
- [25] REARDON-ROBINSON ME, OSIPIUK J, JOOYA N, CHANG C, JOACHIMIAK A, DAS A, TON-THAT H. A thiol-disulfide oxidoreductase of the Gram-positive pathogen *Corynebacterium diphtheriae* is essential for viability, pilus assembly, toxin production and virulence[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(6): 1037-1050.
- [26] HAN HS, WILSON AC. The two CcdA proteins of *Bacillus anthracis* differentially affect virulence gene expression and sporulation[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(23): 5242-5249.
- [27] VILCHIS-RANGEL RE, ESPINOZA-MELLADO MDR, SALINAS-JARAMILLO IJ, MARTINEZ-PEÑA MD, RODAS-SUÁREZ OR. Association of *Listeria monocytogenes* LIPI-1 and LIPI-3 marker llsX with invasiveness[J]. *Current Microbiology*, 2019, 76(5): 637-643.
- [28] 蓝莹, 陈绵绵, 程昌勇, 宋厚辉. 单增李斯特菌内化素家族蛋白的研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(6): 1219-1228.
- LAN Y, CHEN MM, CHENG CY, SONG HH. Research progress on internalins of *Listeria monocytogenes*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(6): 1219-1228 (in Chinese).
- [29] TRAVIER L, LECUIT M. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a 'classic' virulence factor[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 17: 53-60.
- [30] FOOTER MJ, LYO JK, THERIOT JA. Close packing of *Listeria monocytogenes* ActA, a natively unfolded protein, enhances F-actin assembly without dimerization[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(35): 23852-23862.
- [31] MOURRAIN P, LASA I, GAUTREAU, GOUIN E, PUGSLEY A, COSSART P. ActA is a dimer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(19): 10034-10039.
- [32] CHONG R, SWISS R, BRIONES G, STONE KL, GULCICEK EE, AGAISSE H. Regulatory mimicry in *Listeria monocytogenes* actin-based motility[J]. *Cell Host & Microbe*, 2009, 6(3): 268-278.