



单增李斯特菌溶血素 O 的 PEST 序列激活 ERK1/2 磷酸化的作用

马天天[#], 杭奕[#], 陶旗, 俞晓蓉, 祝艺然, 宋厚辉, 程昌勇^{*}

浙江农林大学动物科技学院, 动物医学院, 浙江 杭州 311300

摘要:【目的】本研究旨在构建单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌)溶血素 O (Listeriolysin O, LLO)的关键结构域 PEST 序列(包含 S44、S48 和 T51 关键磷酸化位点)突变体, 并针对其生物学功能展开研究。【方法】以李斯特菌参考菌株 EGD-e 为模板扩增编码 LLO 的 *hly* 基因, 克隆至 pET30a(+)原核表达载体, 在此基础上利用氨基酸突变技术获得表达 PEST 突变体(LLO_{ΔPEST}、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A})的重组质粒, 转入 *E. coli* Rosetta 感受态细胞中, 诱导表达重组蛋白经镍离子亲和层析纯化后进行 SDS-PAGE 分析。利用红细胞裂解试验检测重组蛋白的溶血活性, 并通过 Western blotting 检测重组突变蛋白刺激 Caco-2 细胞后对 MAPK 关键信号分子 ERK1/2 磷酸化水平变化的影响。【结果】结果显示, 本研究成功获得重组 LLO 及其突变体蛋白 LLO_{ΔPEST}、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A}。在 pH 5.5 和 7.4 条件下, LLO_{ΔPEST}、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A} 均具有和 LLO 相当的溶血活性, 说明 PEST 序列缺失或突变并不影响 LLO 的膜裂解活性。研究进一步发现, 重组 LLO 及其突变蛋白刺激 Caco-2 细胞后均能激活 ERK1/2 的磷酸化。【结论】研究表明 LLO 的关键结构域 PEST 序列对于维持该蛋白的膜裂解能力及穿孔活性并非必需, 且该结构域的缺失不影响李斯特菌在感染宿主时依赖 LLO 介导 ERK1/2 磷酸化的生物学过程。本研究将为进一步探索细菌感染过程中 PEST 序列对于 LLO 发挥生物学功能的潜在作用及分子机制奠定基础。

关键词: 单核细胞增多性李斯特菌, 溶血素 O, PEST 序列, 膜裂解活性, ERK1/2 磷酸化

病原体能够在受感染的宿主细胞内建立并维持生态壁龛以隐藏自己免受宿主免疫系统的攻击^[1-2]。细胞内的生态壁龛能够为病原体提供营养和增殖环境^[3-4]。革兰氏阳性病原菌单核细胞增

生性李斯特菌(简称单增李斯特菌)利用宿主细胞质构建生态壁龛^[5-7]。单增李斯特菌内化进入哺乳动物细胞后从吞噬体逃逸, 进入宿主细胞质并开始复制增殖。在胞内, 其利用表面蛋白 ActA 招募

基金项目: 国家自然科学基金(31872620, 31770040); 浙江省自然科学基金(LY17C180001, LZ19C180001, LQ19C180002); 国家级大学生创新创业训练计划(201810341024); 浙江省大学生科技创新活动计划基金(2018R412037)

[#]并列第一作者。

^{*}通信作者。E-mail: lamge@zafu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-11; 修回日期: 2018-07-07; 网络出版日期: 2019-11-12

宿主肌动蛋白以提供自身动力,后扩散到邻近的新细胞继续新一轮增殖感染^[2,4-8]。细菌裂解吞噬泡并逃逸到宿主胞质的过程对于持续感染至关重要,而这一过程在很大程度上依赖于李斯特菌溶血素 O (LLO)^[4,9-11]。

LLO 作为成孔毒素,属于胆固醇依赖性胞质溶素(CDCs)家族,能够与宿主细胞含胆固醇的膜结合,形成直径达 30 nm 的孔,以协助李斯特菌进行逃逸^[3,12-15]。另外,LLO 蛋白的 3 个酸性氨基酸残基 E247、D208 和 D320 构成的 pH 传感器使得其对于环境 pH 值变化相当敏感,LLO 在 pH 值小于 7 时具备溶血活性,在 pH 为 5.5 时该活性最强^[16-17]。LLO 作为一种多功能毒力因子,能够激活宿主细胞内多种信号通路反应^[18],其中包括细胞胞质蛋白 ERK1/2 的磷酸化^[19-20],以及介导宿主细胞核内组氨酸的修饰^[21]。但 LLO 对细胞也具有潜在的毒性,为了维持胞内生长环境,李斯特菌 LLO 的强大成孔活性需要受到一定限制以防止细胞质膜受损而影响细菌生存。Decatur 等通过比对 LLO 与 PFO (Perfringolysin O)氨基酸序列^[22],发现 LLO 蛋白氨基末端特异性存在 26 个氨基酸,这 26 个氨基酸序列富含氨基酸脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T),并因此命名为 PEST 序列。在真核细胞中 PEST 序列主要与蛋白酶体介导的蛋白降解有关^[23],且已有研究表明该段序列调节 LLO 蛋白活性^[24]。此外,LLO 的 PEST 序列区域还存在多个潜在的磷酸化位点,包括 S44、S48 和 T51。然而 LLO 是否通过 PEST 序列尤其是上述磷酸化位点直接或间接介导宿主细胞反应及其潜在的分子机制尚不得知。因此本研究将 LLO 蛋白 PEST 序列上 3 个潜在磷酸化位点定点突变为丙氨酸或对 PEST 序列进行缺失,分析 LLO 蛋白活性变化并研究该序列在李斯特菌感染触发

的 ERK1/2 磷酸化过程中的生物学功能。本研究发现突变蛋白 LLO_{ΔPEST}、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A} 均具有和 LLO 相当的溶血活性,说明 PEST 序列缺失或突变并不影响 LLO 的膜裂解活性。研究进一步发现,重组 LLO 及其突变蛋白刺激 Caco-2 细胞后均能激活 ERK1/2 的磷酸化。研究表明 LLO 的关键结构域 PEST 序列对于维持该蛋白的膜裂解能力及穿孔活性并非必需,且该结构域的缺失不影响李斯特菌在感染宿主时依赖 LLO 介导 ERK1/2 磷酸化的生物学过程,这对下一步深入研究 LLO 在李斯特菌从吞噬体逃逸机制中发挥的生物学功能及分子机理具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和培养条件: 试验用到的菌株为单增李斯特菌 EGD-e 和大肠杆菌 DH5 α Rosetta,来自本实验冻存库。EGD-e 菌株需要接种于脑心浸出液肉汤(Brain Heart Infusion, BHI),DH5 α 菌株需要接种于肉汤(Luria-Bertani, LB),37 °C 振荡培养过夜。质粒 pSL270 和 pET30a(+)均来自本实验室冻存库。

1.1.2 主要试剂: BHI 培养基购自 Oxoid 公司;LB 培养基购自上海生工生物工程有限公司;实验所用几种限制性内切酶购自 NEB 公司;高保真聚合酶 2 \times phanta max master mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司;T4 DNA ligase 购自 Thermo Fisher Scientific 公司;PCR 产物和胶回收纯化试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司;质粒提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术公司;ERK1/2、p-ERK1/2 和 β -actin 单克隆抗体购自 CST 公司;HRP 标记二抗购自 Sigma-Aldrich 公司。卡那霉素

(50 mg/mL)储存于-20 °C, 在 LB 培养基中卡那霉素使用浓度为 50 µg/mL。

1.1.3 引物: 对于重组质粒 pSL1553 的构建, 所用的模板为 EGD-e 菌株全基因组, 设计一对用于扩增缺失 PEST 序列基因 *hly*_{ΔPEST} 的特异性引物。对于含 *hly*_{S44A}、*hly*_{S48A} 和 *hly*_{T51A} 突变质粒的构建, 以实验室已有的 *hly* 重组表达质粒 pSL270 为模板, 设计点突变引物将 PEST 序列区的 3 个关键氨基酸位点 S44、S48 和 T51 进行定点突变, 分别得到突变载体。本研究中用到的引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 引物序列详见表 1。

1.2 方法 *hly*_{ΔPEST} 重组质粒构建和筛选

从 NCBI 上获取 *hly* 基因序列(登录号 NC_003210.1)下载并导入到 Vector NTI 软件中, 通过 Vector NTI 软件设计 *hly*_{ΔPEST} 基因片段的引物 pSL1553-fwd (*Nde* I)和 pSL1553-rev (*Xho* I)。以 EGD-e 为模板, 采用引物 pSL1553-fwd (*Nde* I)和 pSL1553-rev (*Xho* I)从单增李斯特菌 EGD-e 基因组中扩增得到 *hly*_{ΔPEST} 基因。表达载体质粒 pET30a(+)及 PCR 扩增的目的基因片段经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切并纯化后, 利用 T₄ 连接酶过夜连接后转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 通过 PCR

筛选得到带有重组质粒(根据实验室规定命名为 pSL1553)的重组菌, 经测序验证正确后提取质粒用于下一步蛋白表达。

1.3 *hly*_{S44A}、*hly*_{S48A} 和 *hly*_{T51A} 点突变质粒构建和筛选

以实验室已有表达 *hly* 重组质粒 pSL270 为模板, 分别通过特定的引物 EGD-e LLO_{S44A}-fwd、EGD-e LLO_{S44A}-rev、EGD-e LLO_{S48A}-fwd、EGD-e LLO_{S48A}-rev、EGD-e LLO_{T51A}-fwd 和 EGD-e LLO_{T51A}-rev 对 *hly* 上 3 个位点 S44、S48 和 T51 分别进行单点突变。将得到的 PCR 产物用 *Dpn* I 处理 3 h 后进行纯化并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 经测序验证正确后提取质粒用于下一步蛋白表达。

1.4 LLO 重组蛋白及 PEST 序列突变蛋白原核表达与纯化

将测序结果正确的重组质粒及突变质粒转入大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞中, 于 LB 培养基中 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6, 加入 IPTG 16 °C 诱导 12 h 使其大量表达目的蛋白, 离心收集菌体并重悬于 50 mmol/L PBS 缓冲液, 对其进行超声破碎。破碎后溶液离心收集上清并与镍柱 4 °C 结合 6 h。

表 1. 本试验所用引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Products
pSL1553-fwd (<i>Nde</i> I)	CGCC <u>ATATG</u> GAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTAC	<i>hly</i> _{ΔPEST} (1410 bp)
pSL1553-rev (<i>Xho</i> I)	CCG <u>CTCGAG</u> TTCGATTGGATTATCTACTTTTATTACTATATTTTCG	
EGD-e LLO _{S44A} -fwd	GGCACCACCAGCAGCTCCGCTGCAAG	<i>hly</i> _{S44A} (1515 bp)
EGD-e LLO _{S44A} -rev	CTTGCAGGCGGAGCTGCTGGTGGTGCC	
EGD-e LLO _{S48A} -fwd	CAGCATCTCCGCTGCAGCTCCTAAGACGCC	<i>hly</i> _{S48A} (1515 bp)
EGD-e LLO _{S48A} -rev	GGCGTCTTAGGAGCTGCAGGCGGAGATGCTG	
EGD-e LLO _{T51A} -fwd	TCCGCTGCAAGTCCTAAGGCGCCAATCGAAAA	<i>hly</i> _{T51A} (1515 bp)
EGD-e LLO _{T51A} -rev	TTTTCGATTGGCGCTTAGGACTTGCAGGCGGA	

The restriction enzyme sites are underlined.

使用 30 mmol/L 咪唑洗脱杂蛋白和 300 mmol/L 咪唑收集目的蛋白。BCA 试剂盒测定纯化的蛋白浓度后, 进行 SDS-PAGE 验证。用同样的方法表达纯化 LLO 重组蛋白。最后将纯化的蛋白用半透膜透析后适当浓缩, 使用酶标仪检测其浓度, 用 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 滤器过滤除菌并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 待用。

1.5 LLO 的 PEST 序列缺失及突变蛋白的红细胞裂解试验

分别制备 pH 7.4 和 5.5 的含 5% 的绵羊红细胞和含 2 ng/ μL 的蛋白溶液。将绵羊血 1000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 弃上清和白细胞层。加入生理盐水轻轻重悬红细胞, 1000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 弃上清并重复上述步骤 2 次。将红细胞和生理盐水以 1:20 混匀, 配制成 5% 的绵羊红细胞-生理盐水悬液。经上述步骤处理后所获悬液与蛋白等体积混匀, 静置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内反应 30 min。将反应结束的混合液 12000 r/min 离心 1 min。取上清 200 μL 加入 96 孔板中, 测 OD_{550} 。

1.6 Western blotting 检测突变蛋白对细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化影响

Caco-2 细胞以 1×10^6 个/mL 密度铺于 12 孔板

并过夜培养, 将透析并除菌保存的蛋白以 5 nmol/L 浓度与细胞混合, 置于培养箱中培育 30 min。去除细胞培养液, 用 PBS 洗涤 3 次后裂解细胞并收集, 12000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min。去除沉淀, 检测上清蛋白浓度并计算蛋白量, 后与染色液混合并以 5 倍体系制备样品, 沸水煮 5 min 后瞬离。将样品进行 SDS-PAGE 后利用半干转膜法转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉将 PVDF 膜封闭 1 h, TBST 洗涤 3 遍后分别按比例加入 ERK1/2、p-ERK1/2 和 β -actin 单克隆抗体后 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗涤 3 遍后加入 HRP 标记的二抗(羊抗兔或羊抗鼠)继续孵育 1 h, 最后利用成像系统拍摄并分析结果。

2 结果和分析

2.1 *hly* _{Δ PEST} 重组质粒的构建

以单增李斯特菌 EGD-e 基因组为模板, 引物如表 1 所示, 通过 PCR 扩增得到 *hly* _{Δ PEST} 基因片段。结果如图 1-A 和 B 所示, PCR 扩增的基因片段长度约为 1400 bp, 与已知的 *hly* _{Δ PEST} 基因的长度 (1410 bp) 相吻合, PCR 扩增产物和质粒 pET30a(+)

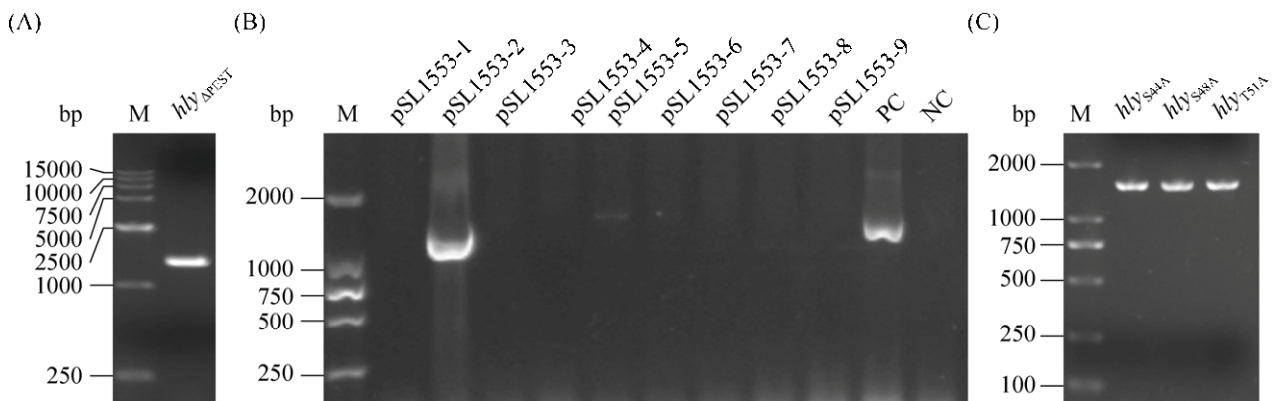


图 1. PEST 序列重组质粒的构建

Figure 1. Construction of PEST sequence recombinant plasmids. A–B: *hly* PEST sequence deletion PCR amplification and verification; C: amino acid mutations PCR amplification; M: DNA marker.

经酶切、酶连后, 转入 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含卡那霉素的 LB 平板上, 挑取单克隆经 PCR 验证后提取质粒送公司测序, 测序结果与已知 *hly* 序列比对, 确认不含 PEST 序列, 说明重组质粒构建成功, 得到重组质粒 pSL1553。

2.2 *hly*_{S44A}、*hly*_{S48A} 和 *hly*_{T51A} 点突变质粒的构建

以 pSL270 为模板, 引物如表 1 所示, 通过 PCR 扩增得到 *hly*_{S44A}、*hly*_{S48A} 和 *hly*_{T51A} 的点突变重组质粒, 结果如图 1-C 所示, PCR 扩增的基因片段约为 1500 bp, 与已知序列基因的长度 (1515 bp) 相吻合。将 PCR 产物用 *Dpn* I 去甲基化后纯化, 热激转化入 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含卡那霉素的 LB 平板上, 挑取单克隆培养 12 h 后提取质粒送公司测序, 比对结果显示, 成功得到 3 个突变质粒。

2.3 成功获得重组蛋白 LLO Δ PEST、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A}

将重组质粒 pSL1553 及 3 个点突变质粒分别热激转化入大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞中, 使用 IPTG 诱导蛋白表达。收集菌体, 超声破碎使表达的重组蛋白从菌体的胞质释放出来。获得含有重组蛋白的样品, 经镍柱亲和层析后, 纯化得到重组蛋白 LLO Δ PEST、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A}。重组蛋白样品透析处理后, 进行 SDS-PAGE, 结果如图 2-A 所示, 与已有重组蛋白 LLO 条带对比, 均有明显的目的蛋白条带。

2.4 PEST 序列突变后蛋白溶血活性分析

pH 5.5 和 7.4 环境下, 以 LLO 重组蛋白为阳性对照, PBS 组作为阴性对照。结果发现 LLO Δ PEST、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A} 均具有较明显的溶血现象。如图 2-B 所示, pH 5.5 环境下

的红细胞细胞膜全部破碎, pH 7.4 环境下的红细胞部分破碎, 即 pH 5.5 时的溶血活性较 pH 7.4 时的更高。如图 2-C 所示, 在 pH 5.5 和 7.4 条件下, LLO Δ PEST、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A} 均具有和 LLO 相当的溶血活性, 说明 PEST 序列缺失或突变并不影响 LLO 的膜裂解活性。

2.5 LLO 的 PEST 序列突变蛋白均能引起细胞 ERK1/2 磷酸化表达

已有研究表明 LLO 能够引起细胞中 ERK1/2 蛋白发生磷酸化, 但对 PEST 序列的 S44、S48 和 T51 位点进行突变后是否影响 LLO 蛋白对宿主细胞的磷酸化尚未知, 因此利用突变蛋白分别与 Caco-2 细胞进行孵育并利用 Western blotting 检测细胞 ERK1/2 磷酸化表达水平。结果发现, 与空白组对比, LLO 及其突变蛋白均能导致细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化, 表明 LLO PEST 序列及其 3 个潜在的磷酸化位点并不影响细胞 ERK1/2 蛋白的磷酸化, 如图 3。

3 讨论

单增李斯特菌通过类似吞噬作用的过程内化到哺乳动物细胞中后, 最初存在于源自质膜的液泡中, 随后通过成孔毒素 LLO 穿透液泡, 在两种细菌磷脂酶(PlcA 和 PlcB)的共同参与下, 介导单增李斯特菌逃逸到宿主细胞质, 并大量复制^[2,25-26]。单增李斯特菌通过这种方式为自身提供有利的生长环境并保护自身免受宿主体液免疫应答清除^[3]。在这一过程中, LLO 作为胆固醇依赖性胞质溶素(CDC)家族的一员^[9]发挥了关键作用。而在所有 CDC 中, 包括来自产气荚膜梭菌的穿孔毒素 O、炭疽杆菌中的炭疽毒素 O、肺炎链球菌的肺炎球菌

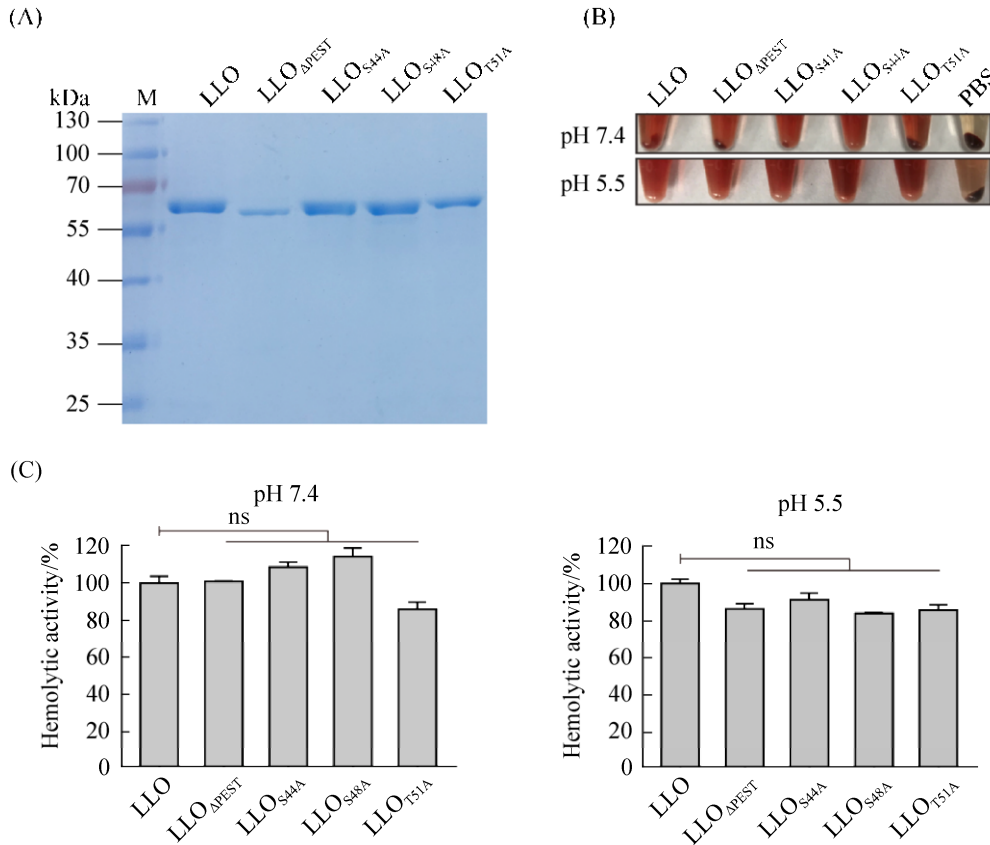


图 2. 重组蛋白 LLO_{ΔPEST}、LLO_{S44A}、LLO_{S48A}、LLO_{T51A} 的 SDS-PAGE 分析及溶血活性分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of recombinant proteins LLO, LLO_{ΔPEST}, LLO_{S44A}, LLO_{S48A}, LLO_{T51A} and hemolytic activity analysis. A: SDS-PAGE analysis of LLO and variants purification; M: Protein marker. B: Hemolysis of proteins at different pH environment. C: Hemolytic activity analysis. ns: no significant level; *: $P < 0.05$.

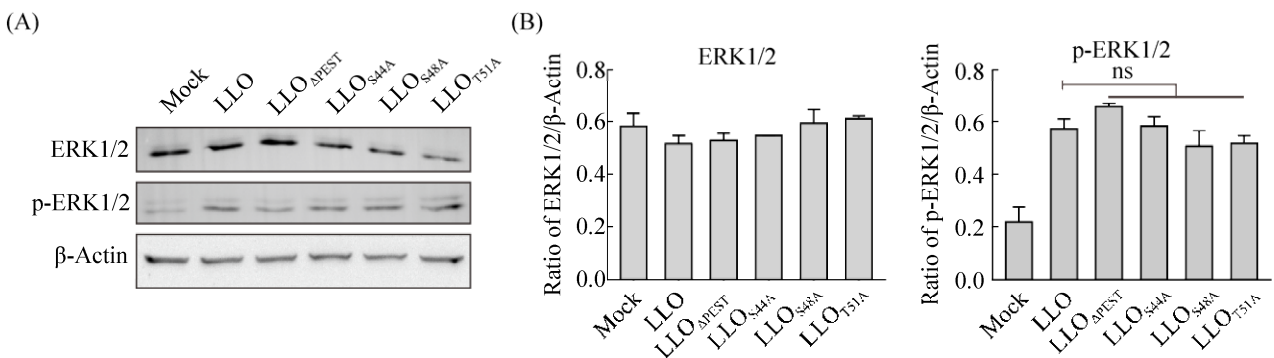


图 3. 重组 LLO 及其突变体蛋白激活细胞 ERK1/2 磷酸化水平分析

Figure 3. Analysis of cellular ERK1/2 phosphorylation level. A: Western blotting analysis of ERK1/2 and p-ERK1/2 protein expression in Caco-2 cells incubated with LLO and variants; B: The gray scale analysis results of proteins expression; ns: no significant level.

溶血素和来自化脓性链球菌的链球菌溶血素, 只有 LLO 进化为仅在液泡中起作用, 其他 CDC 均作用于质膜外部造成宿主细胞的裂解。因此, 确保胞质中 LLO 不会穿透宿主质膜、维持细胞内生存环境对于李斯特菌发病机制至关重要。

首先, LLO 具有的 pH 传感器保证其在液泡中的活性, 并控制其对宿主细胞的裂解。另外, 由于其他 CDC 中不存在 PEST 样序列, 把 LLO 的 PEST 序列加入链球菌溶血素 O(SLO)的氨基末端会降低 SLO 的细胞毒性^[27-28], 因此 PEST 序列对 LLO 活性的调控显得尤为重要。尽管 PEST 序列与蛋白酶体介导的降解有关, 但已有研究表明 LLO 中的 PEST 样序列不影响蛋白质稳定性^[22]。本研究通过体外表达 PEST 全部缺失以及 PEST 序列三个位点突变的重组蛋白, 在不同 pH 下检测突变蛋白溶血活性, 发现 PEST 序列在酸性条件下对 LLO 体外溶血能力略有影响。而 PEST 序列中的磷酸化残基特别是 S44, 作为 MAPK 共有位点的一部分, 并没有影响 LLO 对于宿主肠上皮细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化的激活。那么 PEST 对于 LLO 究竟有着怎样的生物学意义? 最近 Chen 等的研究发现全长 LLO 一旦接触质膜后, 随即迅速从膜上消失, 而缺乏 PEST 样序列的 LLO 大部分保留在质膜上^[29]。由于异四聚体衔接蛋白 2(AP2)的组分 Ap2a2 唯一已知的作用是募集有助于胞吞作用的辅助蛋白^[30], 而 LLO 的 PEST 序列能够通过 Ap2a2 阻止质膜损伤, 但 LLO 通过 PEST 序列调节细胞内吞机制的具体原因尚未被阐明。另外其这一研究中使用的是小鼠的 cDNA 文库, 单增李斯特菌作为高致病性食源性病原菌^[31], 从人源基因进行进一步探索也十分必要。

LLO 蛋白作为胆固醇依赖的穿孔素家族蛋白

主要协助李斯特菌逃逸吞噬体, 在感染过程中主要和细胞膜或吞噬体膜发生作用或联系^[9], 已有研究表明该蛋白穿透宿主细胞质膜并迅速诱导细胞内 Ca^{2+} 内流、 K^{+} 外流^[32-33], 从而激活包括 ERK 在内的多条信号传导途径。该蛋白单体也能在细胞胞质内短时间存在^[34], 这一过程中有可能直接与胞质蛋白发生互作。我们猜测 LLO 跟 ERK 及其通路上游关键激酶可能发生互作, 目前该研究正在进一步开展中。

4 结论

本研究成功构建并表达了重组突变蛋白 LLO_{ΔPEST}、LLO_{S44A}、LLO_{S48A} 和 LLO_{T51A}, 证实在 PEST 序列缺失或突变后, 在 pH 5.5 和 7.4 条件下, LLO 溶血活性不受影响。说明 PEST 序列缺失或突变并不影响 LLO 的膜裂解活性。且 PEST 序列上 3 个潜在的磷酸化位点并不影响 LLO 激活 ERK1/2 磷酸化, 该结果为进一步探索李斯特菌感染过程中 PEST 序列对 LLO 发挥生物学功能的潜在分子机制奠定基础。

参考文献

- [1] Mitchell G, Chen C, Portnoy DA. Strategies used by bacteria to grow in macrophages. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(3), doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0012-2015.
- [2] Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(1): 32-46.
- [3] Vdovikova S, Luhr M, Szalai P, Nygård Skalman L, Francis MK, Lundmark R, Engedal N, Johansson J, Wai SN. A novel role of *Listeria monocytogenes* membrane vesicles in inhibition of autophagy and cell death. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 154.
- [4] Kortebe M, Milohanic E, Mitchell G, Péchoux C, Prevost MC,

- Cossart P, Bierne H. *Listeria monocytogenes* switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cells. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(11): e1006734.
- [5] Studer P, Staubli T, Wieser N, Wolf P, Schuppler M, Loessner MJ. Proliferation of *Listeria monocytogenes* L-form cells by formation of internal and external vesicles. *Nature Communications*, 2016, 7: 13631.
- [6] Osborne SE, Sit B, Shaker A, Currie E, Tan JMJ, van Rijn J, Higgins DE, Brumell JH. Type I interferon promotes cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, 2017, 19(3): e12660.
- [7] Chen GY, Mcdougal CE, D'Antonio MA, Portman JL, Sauer JD. A genetic screen reveals that synthesis of 1,4-dihydroxy-2-naphthoate (DHNA), but not full-length menaquinone, is required for *Listeria monocytogenes* cytosolic survival. *mBio*, 2017, 8(2): e00119–17.
- [8] Quereda JJ, Dussurget O, Nahori MA, Ghazlane A, Volant S, Dillies MA, Regnault B, Kennedy S, Mondot S, Villoing B, Cossart P, Pizarro-Cerda J. Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(20): 5706–5711.
- [9] Nguyen BN, Peterson BN, Portnoy DA. Listeriolysin O: a phagosome-specific cytolysin revisited. *Cellular Microbiology*, 2019, 21(3): e12988.
- [10] Cheng CY, Jiang L, Ma TT, Wang H, Han X, Sun J, Yang YC, Chen ZW, Yu HF, Hang Y, Liu FD, Wang BS, Fang WH, Huang HR, Fang C, Cai C, Freitag N, Song HH. Carboxyl-terminal residues N478 and V479 required for the cytolytic activity of listeriolysin O play a critical role in *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1439.
- [11] Vadia S, Arnett E, Haghighat AC, Wilson-Kubalek EM, Tweten RK, Seveau S. The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(11): e1002356.
- [12] Osborne SE, Brumell JH. Listeriolysin O: from bazooka to Swiss army knife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2017, 372(1726): 20160222, doi: 10.1098/rstb.2016.0222.
- [13] Seveau S. Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*//Anderlueh G, Gilbert R. MACPF/CDC Proteins - Agents of Defence, Attack and Invasion. Dordrecht: Springer, 2014: 161–195.
- [14] Cassidy SKB, O'Riordan MXD. More than a pore: the cellular response to cholesterol-dependent cytolysins. *Toxins*, 2013, 5(4): 618–636.
- [15] Farrand AJ, LaChapelle S, Hotze EM, Johnson AE, Tweten RK. Only two amino acids are essential for cytolytic toxin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(9): 4341–4346.
- [16] Bavdek A, Kostanjšek R, Antonini V, Lakey JH, Dalla Serra M, Gilbert RJC, Anderlueh G. pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability. *The FEBS Journal*, 2012, 279(1): 126–141.
- [17] Schuerch DW, Wilson-Kubalek EM, Tweten RK. Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(35): 12537–12542.
- [18] Lam JGT, Vadia S, Pathak-Sharma S, McLaughlin E, Zhang XL, Swanson J, Seveau S. Host cell perforation by listeriolysin O (LLO) activates a Ca²⁺-dependent cPKC/Rac1/Arp2/3 signaling pathway that promotes *Listeria monocytogenes* internalization independently of membrane resealing. *Molecular Biology of the Cell*, 2018, 29(3): 270–284.
- [19] Weiglein I, Goebel W, Troppmair J, Rapp UR, Demuth A, Kuhn M. *Listeria monocytogenes* infection of HeLa cells results in listeriolysin O-mediated transient activation of the Raf-MEK-MAP kinase pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 148(2): 189–195.
- [20] Hashino M, Tachibana M, Nishida T, Hara H, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Watanabe K, Shimizu T, Watarai M. Inactivation of the MAPK signaling pathway by *Listeria monocytogenes* infection promotes trophoblast giant cell death. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1145.
- [21] Hamon MA, Batsché E, Régault B, Tham TN, Seveau S, Muchardt C, Cossart P. Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007,

- 104(33): 13467–13472.
- [22] Decatur AL, Portnoy DA. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science*, 2000, 290(5493): 992–995.
- [23] Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21(7): 267–271.
- [24] Lety MA, Frehel C, Dubail I, Beretti JL, Kayal S, Berche P, Charbit A. Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(5): 1124–1139.
- [25] Suryawanshi RD, Malik SVS, Jayarao B, Chaudhari SP, Savage E, Vergis J, Kurkure NV, Barbuddhe SB, Rawool DB. Comparative diagnostic efficacy of recombinant LLO and PI-PLC-based ELISAs for detection of listeriosis in animals. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 137: 40–45.
- [26] Pizarro-Cerdá J, Charbit A, Enninga J, Lafont F, Cossart P. Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2016, 60: 155–167.
- [27] Schnupf P, Zhou JM, Varshavsky A, Portnoy DA. Listeriolysin O secreted by *Listeria monocytogenes* into the host cell cytosol is degraded by the N-end rule pathway. *Infection and Immunity*, 2007, 75(11): 5135–5147.
- [28] Lety MA, Frehel C, Berche P, Charbit A. Critical role of the N-terminal residues of listeriolysin O in phagosomal escape and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(2): 367–379.
- [29] Chen C, Nguyen BN, Mitchell G, Margolis SR, Ma D, Portnoy DA. The listeriolysin O PEST-like sequence co-opts AP-2-mediated endocytosis to prevent plasma membrane damage during *Listeria* infection. *Cell Host & Microbe*, 2018, 23(6): 786–795.e5.
- [30] Smith SM, Baker M, Halebian M, Smith CJ. Weak molecular interactions in clathrin-mediated endocytosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2017, 4: 72.
- [31] Witter AR, Okunnu BM, Berg RE. The essential role of neutrophils during infection with the intracellular bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology*, 2016, 197(5): 1557–1565.
- [32] Chen RQ, Ji GQ, Wang L, Ren H, Xi LY. Activation of ERK1/2 and TNF- α production are regulated by calcium/calmodulin signaling pathway during *Penicillium marneffei* infection within human macrophages. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 93: 95–99.
- [33] Vadia S, Seveau S. Fluxes of Ca²⁺ and K⁺ are required for the listeriolysin O-dependent internalization pathway of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 2014, 82(3): 1084–1091.
- [34] Schnupf P, Portnoy DA, Decatur AL. Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(2): 353–364.

Roles of the PEST-like sequence of Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* in activating ERK1/2 phosphorylation

Tiantian Ma[#], Yi Hang[#], Qi Tao, Xiaorong Yu, Yiran Zhu, Houhui Song, Changyong Cheng^{*}

College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine of Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] The determinant virulence factor Listeriolysin O (LLO) of *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen, contains a unique N-terminal amino acid sequence that is absent in other cytolysins and was previously referred as the PEST-like sequence (containing three putative phosphorylation sites, S44, S48, and T51). We here, therefore, aimed to explore the biological roles of the PEST-like sequence in LLO-induced ERK1/2 kinases phosphorylation in human epithelial cells (Caco-2). [Methods] The plasmid for expressing the recombinant LLO was constructed and transformed into *E. coli* Rosetta, and the his-tagged soluble protein was purified using the nickel-chelated affinity column chromatography. The LLO variants (LLO_{ΔPEST}, LLO_{S44A}, LLO_{S48A}, and LLO_{T51A}) were then obtained by using the site-directed mutagenesis strategy and expressed as above for LLO. The hemolytic activity for these recombinant proteins was assessed by lysis the erythrocytes, and moreover, effects of LLO or its variants on ERK1/2 kinases phosphorylation in Caco-2 cells was detected by using the Western blotting method. [Results] The results in the present study showed that the recombinant LLO, as well as the four LLO variants were able to lyse the erythrocytes at pH 5.5 and pH 7.4, suggesting that the PEST-like sequence was not required for the pore-forming activity of LLO. Besides, treatment of the LLO or its variants at the cytolytic concentration of 5 nmol/L could significantly induce ERK1/2 kinases phosphorylation in Caco-2 cells. [Conclusion] Our data collectively showed that the PEST-like sequence was not necessary for the LLO-mediated perforation ability on host membranes and not required for the LLO-triggered ERK1/2 signaling, which laid the foundation for further exploration of the potential roles of this motif during *L. monocytogenes* infection.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, Listeriolysin O, the PEST-like sequence, pore-forming activity, ERK1/2 kinases phosphorylation

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872620, 31770040), by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY17C180001, LZ19C180001, LQ19C180002), by the National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (201810341024) and by the Zhejiang University Student Science and Technology Innovation Program Fund Project (2018R412037)

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: lamge@zafu.edu.cn

Received: 11 April 2018; Revised: 7 July 2018; Published online: 12 November 2019