

БЕЛОК INLB, СЕКРЕТИРУЕМЫЙ *LISTERIA MONOCYTOGENES*, КОНТРОЛИРУЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ С МАКРОФАГАМИ

Я. М. Чаленко¹✉, М. М. Абдулкадиева², П. В. Сафарова^{1,3}, Е. В. Калинин¹, Д. А. Слонова⁴, С. А. Ермолаева¹

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

² Объединенный институт высоких температур, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего профессионального образования «Сколковский институт науки и технологий», Москва, Россия

Способность инфицировать и размножаться в непрофессиональных фагоцитах лежит в основе вирулентности грамположительной бактерии *Listeria monocytogenes*. В процессе протекания инфекции захваченные клетками системы мононуклеарных фагоцитов листерии устойчивы к перевариванию и могут размножаться внутри макрофагов. Один из ключевых факторов патогенности *L. monocytogenes* белок интерналин В (InIB) взаимодействует с рецепторами клеток млекопитающих c-Met и gC1qR. При его взаимодействии с рецепторами, находящимися на поверхности эпителиальных клеток, происходит активация рецепторов, перестройки цитоскелета и, как результат, активная инвазия бактерий внутрь непрофессиональных фагоцитов. На сегодняшний день ничего неизвестно о влиянии InIB на взаимодействие *L. monocytogenes* с макрофагами, в то время как оба таргетных рецептора экспрессируются на поверхности макрофагов и вовлечены в развитие иммунных реакций. Целью работы было определить потенциальное влияние InIB на взаимодействие *L. monocytogenes* с макрофагами. Установлено, что 1) наличие InIB в 3,5 раза достоверно улучшает поглощение *L. monocytogenes* макрофагами; 2) через 24 ч штаммы EGD Δ inIB, EGD Δ e и EGD Δ inIB::pInIB увеличили свою численность внутри макрофагов в $182,5 \pm 16,7$, 96 ± 12 и $13,3 \pm 3$ раз соответственно; 3) Штамм EGD Δ inIB::pInIB, комплементированный плазмидной копией гена *inIB*, продуцировал InIB в 3,3 раза лучше, чем штамм EGD Δ e. Таким образом мы предполагаем, что InIB влияет на выживаемость листерий внутри макрофагов. Полученные результаты углубляют понимание процессов взаимодействия возбудителя с макрофагами.

Ключевые слова: листериоз, *Listeria monocytogenes*, интерналин В, врожденный иммунитет, макрофаги человека

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-00105).

Вклад авторов: Я. М. Чаленко — планирование исследования, подготовка и непосредственное участие во всех экспериментах, интерпретация данных и написание статьи; М. М. Абдулкадиева, П. В. Сафарова — проведение экспериментов по инфицированию макрофагов; Е. В. Калинин — анализ экспрессии InIB; Д. А. Слонова — выделение и дифференцировка макрофагов, С. А. Ермолаева — планирование исследования и написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (протокол № 3 от 26 февраля 2018 г.). Исследование проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской организации.

✉ **Для корреспонденции:** Ярослава Михайловна Чаленко
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098, Россия; yaroslavazaka@yandex.ru

Статья получена: 11.05.2022 **Статья принята к печати:** 03.06.2022 **Опубликована онлайн:** 24.06.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.034

INLB PROTEIN SECRETED BY *LISTERIA MONOCYTOGENES* CONTROLS THE PATHOGEN INTERACTION WITH MACROPHAGES

Chalenko YM¹✉, Abdulkadieva MM², Safarova PV^{1,3}, Kalinin EV¹, Slonova DA⁴, Ermolaeva SA¹

¹ Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² Joint Institute for High Temperatures, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

The virulence of gram-positive bacterium *Listeria monocytogenes* depends on its capacity to infect non-professional phagocytes and proliferate inside them. *Listeria monocytogenes* captured by mononuclear phagocytic cells during the infectious process are resistant to lysosomal digestion and can proliferate inside macrophages. Internalin B (InIB), one of the key pathogenicity factors of *L. monocytogenes*, interacts with mammalian receptors c-Met and gC1q-R. For epithelial cells, such interactions with surface receptors promote activation of these receptors and cytoskeletal remodeling, which leads to massive bacterial invasion into non-professional phagocytes. For macrophages, by contrast, nothing is known about the role of InIB in their interactions with *L. monocytogenes* apart from the fact that both receptors are abundantly expressed by macrophages and participate in the development of immune reactions. This study aimed at determination of the potential role of InIB in the interactions between *L. monocytogenes* and macrophages. We found that 1) InIB expression promoted a significant 3.5-fold increase in the rates of *L. monocytogenes* capture by macrophages; 2) the 24 h fold increase in bacterial number inside macrophages constituted 182.5 ± 16.7 , 96 ± 12 and 13.3 ± 3 for EGD Δ inIB, EGD Δ e and EGD Δ inIB::pInIB strains, respectively; 3) the EGD Δ inIB::pInIB strain, complemented with a plasmid copy of *inIB*, produced InIB at 3.3-fold higher rates than the type strain EGD Δ e. We conclude that InIB negatively affects the survival of listeria inside macrophages. The results enable advanced understanding of the host-pathogen interactions for *L. monocytogenes*.

Keywords: listeriosis, *Listeria monocytogenes*, internalin B, innate immunity, human macrophages

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (project number 21-74-00105).

Author contribution: Chalenko YM — research planning, preparation and direct participation in all experiments, data interpretation and manuscript writing; Abdulkadieva MM, Safarova PV — macrophage infection assay; Kalinin EV — InIB expression analysis; Slonova DA — macrophage isolation and differentiation assay; Ermolaeva SA — research planning and manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the research was conducted in compliance with the ethical principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Yaroslava M. Chalenko
Gamaleya, 18, Moscow, 123098, Russia; yaroslavazaka@yandex.ru

Received: 11.05.2022 **Accepted:** 03.06.2022 **Published online:** 24.06.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.034

Самые ранние сведения о существовании *Listeria monocytogenes* относятся к 1926 г., когда была описана летальная инфекция у кроликов, у которых развивался выраженный моноцитоз [1]. Грамположительная бактерия *L. monocytogenes* вызывает листериоз — тяжелое системное заболевание животных и человека [2]. У людей основными клиническими признаками листериоза являются сепсис, менингит и менингоэнцефалит [3]. Иммунологическая защита от *L. monocytogenes* обусловлена в основном системой врожденного и адаптивного клеточного иммунитета. Первыми эффекторными клетками являются макрофаги. *L. monocytogenes* относится к факультативным внутриклеточным бактериям, фагоцитируется клетками системы мононуклеарных фагоцитов и может размножаться внутри них.

Критическим этапом инфекционного процесса является инвазия *L. monocytogenes* в непрофессиональные фагоциты. Для этого *L. monocytogenes* имеет на клеточной поверхности белки интерналин А (InlA) и интерналин В (InlB). InlA ковалентно связан с бактериальной поверхностью и его взаимодействие с целевым рецептором Е-кадгеринном опосредует ремоделирование цитоскелета и бактериальную интернализацию [4]. InlB присутствует в двух формах: одна из них связана с бактериальной поверхностью и опосредует активную инвазию бактерий внутрь клеток непрофессиональных фагоцитов; роль второй формы (растворимой) может заключаться в неспецифичной активации сигнальных путей при связывании с целевыми рецепторами, и ее функциональное значение до конца не изучено. с-Met и gC1q-R — эукариотические рецепторы InlB [5–6]. с-Met — это рецептор для фактора роста гепатоцитов. Его активация приводит к запуску сигнальных путей, опосредующих пролиферацию и миграцию клеток, а также контролирующую иммунный ответ в некоторых типах клеток [7]. с-Met экспрессируется во множестве эпителиальных клеток, а также в клетках иммунной системы: макрофагах, моноцитах, дендритных клетках и Т-клетках [8]. Известно также, что передача сигналов от с-Met смещает макрофаги М1-фенотипа в сторону М2-подобного фенотипа [9].

Второй таргетный рецептор InlB gC1q-R представляет собой повсеместно экспрессируемый белок, который первоначально идентифицировали как рецептор глобулярных головок с-Мет [10]. Позднее было установлено, что gC1q-R многофункционален и взаимодействует с широким спектром лигандов эндогенного и экзогенного происхождения [11]. Связывание InlB с gC1qR способствует проникновению листерий в клетки млекопитающих. Продемонстрировано, что взаимодействие InlB с с-Met и gC1qR существенно влияет на динамику фосфорилирования в сигнальных каскадах, контролируемых PI3-и MAPK-киназами в эпителиальных клетках человека, и описаны структурно-функциональные особенности взаимодействий между InlB и его таргетными рецепторами [12–14]. Как и рецептор с-Met, gC1qR активно экспрессируется на поверхности В-лимфоцитов и макрофагах [15].

Таким образом оба рецептора для InlB вовлечены во множество сигнальных путей, опосредующих иммунные реакции организма. Была высказана гипотеза, что InlB может быть вовлечен в регуляцию врожденного иммунного ответа макроорганизма за счет активации NF-κарраВ и запуска PI3-киназного пути в макрофагах [16]. В пользу гипотезы свидетельствуют опубликованные факты о том, что взаимодействие с-Met с InlB способствует миграции некоторых типов иммунных клеток и

приводит к продукции перитонеальными дендритными клетками провоспалительного цитокина IL6 [17]. Однако экспериментальных данных о роли InlB во взаимодействии *L. monocytogenes* с макрофагами до настоящего времени опубликовано не было.

Целью данной работы было изучение роли InlB во взаимодействиях листерий с макрофагами человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение макрофагов человека из периферической крови

Макрофаги человека дифференцировали из моноцитов, выделенных из мононуклеарной фракции периферической крови. Кровь получали от здоровых доноров. Выделение моноцитов осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием Ficoll-Paque Premium (HyClone; США) и с последующей адгезией [18]. Моноциты инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение 6 дней в среде RPMI-1640, содержащей 2%-ю инактивированную сыворотку крови человека, 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES, 50 мкМ β-меркаптоэтанол, 2 мМ пируват натрия и 2 мМ витаминов MEM (HyClone; США). В первый день в среду добавляли 50 нг/мл GM-CSF (Sci-Store; Россия). Обновление среды проводили на 4-й день с добавлением 50 нг/мл GM-CSF. Клетки окрашивали конъюгированными с флуорофором первичными антителами против CD11b (APC-Cy7), CD80 (PE-Cy5), CD86 (BV421), HLA-DR (PE-Cy7) и анализировали с помощью проточного цитометра (Beckman Coulter; США).

Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе использовали следующие штаммы *L. monocytogenes*: типовой штамм EGDe, и штамм EGDeΔinlB (с хромосомной делецией гена *inlB*), а также штамм EGDeΔinlB::pInlB, содержащий плазмиду, несущую ген *inlB*, которая комплементировала делецию хромосомной копии гена. Штамм EGDeΔinlB был любезно предоставлен профессором J. Vazquez-Boland, Univ. Эдинбург, Великобритания. InlB-экспрессирующая плазида и штамм EGDeΔinlB::pInlB были описаны ранее [14]. Все штаммы *L. monocytogenes* культивировали на жидкой питательной среде BHI (Becton, Dickinson and Company; США) при 37 °С и постоянном встряхивании при 200 об./мин. Штаммы, несущие InlB-экспрессирующую плазмиду, выращивали в присутствии 10 мкг/мл эритромицина для поддержания плазмиды. Для получения заражающих культур бактерии выращивали до середины логорифмической фазы, трижды промывали PBS (Amresco; США), разделяли на аликвоты по 100 мкл и замораживали в присутствии 10% глицерина (Sigma-Aldrich; США).

Анализ эффективности захвата бактерий

Макрофаги выращивали в 24-луночных планшетах. Концентрацию бактериальных клеток в замороженной культуре определяли методом серийных разведений. К макрофагам в питательной среде вносили бактерии в соотношении 1 : 100 (MOI). Через 1 ч инкубации при 37 °С и 5% CO₂ клетки трижды промывали PBS, после добавляли среду DMEM (ПанЭко; Россия), содержащую гентамицин (Sigma-Aldrich; США) в концентрации 100 мкг/мл для уничтожения внеклеточных бактерий. После 1 ч

инкубации клетки тщательно промывали PBS для удаления гентамицина и лизировали 1% Triton X 100 (Sigma-Aldrich; США). Далее делали серийные разведения и высевали бактерии на твердую питательную среду ВНИ. Для комплементированных штаммов высевы делали на среду с добавлением эритромицина 10 мкг/мл. Эффективность захвата оценивали по соотношению количества захваченных бактерий к количеству добавленных бактерий.

Анализ выживаемости *L. monocytogenes* в макрофагах человека

Через 1 ч инкубации при 37 °С и 5% CO₂ клетки трижды промывали PBS, после добавляли среду DMEM (ПанЭко; Россия), содержащую гентамицин (Sigma-Aldrich; США) в концентрации 100 мкг/мл для уничтожения внеклеточных бактерий. Через 1 ч инкубации с высокой концентрацией гентамицина среду удаляли, клетки промывали, в лунки 24-луночных планшетов вносили DMEM (ПанЭко; Россия) с содержанием гентамицина (Sigma-Aldrich; США) 20 мкг/мл для препятствия выживанию листерий вне макрофагов. Планшеты инкубировали 24 ч (от начала инфекции) при 37 °С и 5% CO₂. Далее клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) для удаления гентамицина и макрофаги лизировали добавлением 100 мкл 1% Triton X 100. Лизат доводили до 1 мл добавлением 900 мкл PBS. Далее делали серийные разведения и высевали бактерии на твердую питательную среду ВНИ. Для комплементированного штамма высевы делали на среду с добавлением эритромицина 10 мкг/мл. Эффективность выживания оценивали по соотношению количества выживших бактерий на количество захваченных бактерий.

ИФА-тест система для определения уровня экспрессии InIB

Штаммы *L. monocytogenes* были выращены в ВНИ в течение 18 ч. Супернатант и клетки отделяли центрифугированием (4200 об/мин, 15 мин). Клетки были отмыты трижды PBS и

ресуспендированы в 500 мкл карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6). Для проведения анализа уровня InIB на клеточной поверхности мы использовали прямой метод. В лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл образца. Инкубировали ночь при + 4 °С. Затем отмывали ТТБС трижды по 250 мкл. Далее к образцам добавляли по 200 мкл блокирующий буфер и инкубировали 1 ч при комнатной температуре (NT). Конъюгированные с HRP антитела к InIB добавляли к образцам в разведение 1 : 4000 по 100 мкл на лунку и инкубировали в течение 1 ч при NT. Затем отмывали 6 раз по 250 мкл ТТБС. Для визуализации добавляли по 100 мкл ТМВ (ThermoFischer scientific; США). Реакцию останавливали внесением в каждую лунку по 100 мкл 2 М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на планшетном фотометре iMark (Bio-Rad; США). Для проведения анализа уровня секретируемого InIB использовали «Сэндвич»-метод. В лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл антител против InIB (4 мкг/мл), разведенных в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6), и инкубировали ночь при + 4 °С. Затем промывали ТТБС 3 раза по 250 мкл. Далее в лунки вносили по 200 мкл блокирующего буфера (2% BSA) и инкубировали 1 ч при RT. Затем удаляли блокирующий буфер и добавляли 100 мкл образца и инкубировали 1 ч при RT. После отмывали 3 раза ТТБС по 250 мкл. Конъюгированные с HRP антитела к InIB в разведение 1 : 4000 добавляли в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали 1 ч. Отмывали 6 раз по 250 мкл ТТБС. Проявляли ТМВ-субстратом 100 мкл. Для остановки реакции использовали 100 мкл серной кислоты (2 М). Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм на планшетном фотометре iMark (Bio-Rad; США). Концентрацию InIB определяли по калибровочной кривой и пересчитывали на число клеток в образце.

Статистический анализ

Все эксперименты проводили в трех повторениях и не менее четырех раз. Для статистического анализа использовали односторонний ANOVA с post hoc-Tukey

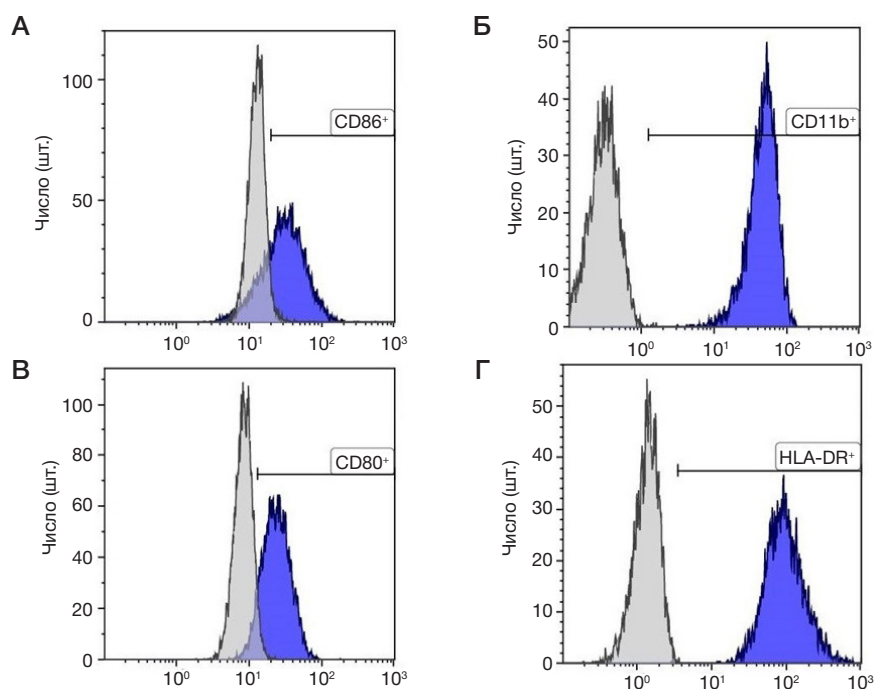


Рис. 1. Проточная цитометрия макрофагов, полученных из моноцитов крови здоровых доноров. Макрофаги были дифференцированы до M1-фенотипа. А. Экспрессия маркера CD86. Б. Экспрессия маркера CD11b. В. Экспрессия маркера CD80. Г. Экспрессия маркера HLA-DR

(<https://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx>). Значение $p < 0,05$ считали показателем статистически значимой разницы (см. Приложение 1 и 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика дифференцированных макрофагов

Макрофаги играют важную роль во врожденном иммунном ответе и в стимулировании дифференцировки иммунных эффекторных клеток; в целом ответ первых инфицированных клеток в организме хозяина формирует последующий врожденный и адаптивный иммунитет к *L. monocytogenes*. Макрофаги были проанализированы с использованием проточной цитометрии. Фенотип клеток, полученных из моноцитов, характеризовался наличием на поверхности CD11b, CD80, CD86 и HLA-DR — маркеров, экспрессируемых на провосполительных макрофагах M1-типа [19] (рис. 1). Клетки содержали крупное округлое ядро с гетерохроматином, локализованным под ядерной мембраной, и имели множество отростков на поверхности. Клетки были прочно адгезированы к поверхности лунок (рис. 2).

Фагоцитоз *L. monocytogenes* макрофагами зависит от наличия InlB

Взаимодействие с-Met непрофессиональных фагоцитов с InlB, который связан с бактериальной поверхностью, опосредует перестройки цитоскелета эукариотической клетки, приводит к формированию фагосомной чашки с последующей интернализацией бактерий внутрь клеток. Однако значение InlB для взаимодействия с профессиональными фагоцитами остается неизвестным. В первом эксперименте мы проанализировали, влияет ли наличие InlB на эффективность захвата макрофагами *L. monocytogenes*. Для этого мы добавили к макрофагам M1-типа три штамма *L. monocytogenes*: типовой штамм EGDe, штамм EGDe Δ inlB (Δ InlB) — лишенный гена inlB и полученный на основе штамма EGDe, и штамм EGDe Δ inlB::pInlB (InlB) — содержащий плазмиду, несущую ген inlB. Полученные данные показали, что наличие InlB в 3,5 раза достоверно улучшает поглощение *L. monocytogenes* макрофагами (рис. 3). Достоверных различий между штаммами дикого типа EGDe и EGDe Δ inlB::pInlB выявлено не было (см. Приложение 1).

Выживаемость *L. monocytogenes* в макрофагах зависит от наличия InlB

Через 24 ч мы оценили, влияет ли наличие InlB на выживаемость листерий внутри макрофагов человека. Мы обнаружили, что через это время штамм, лишенный InlB, увеличил численность внутри макрофагов в $182,5 \pm 16,7$ раз, типовой штамм EGDe размножился менее эффективно и увеличил свою численность в 96 ± 12 раз. Удивительно, что штамм EGDe Δ inlB::pInlB, комплементированный плазмидной копией гена inlB, размножился хуже всего и увеличил свою численность только в $13,3 \pm 3$ раз (рис. 4) (см. Приложение 2). Такой эффект мог быть связан с тем, что штамм комплементирован на основе плазмиды и экспрессия плазмиды может потреблять дополнительные клеточные ресурсы. Для подтверждения возможности данного факта мы провели инфицирование клеток линии HEp-2, аналогично анализу захвата макрофагами,

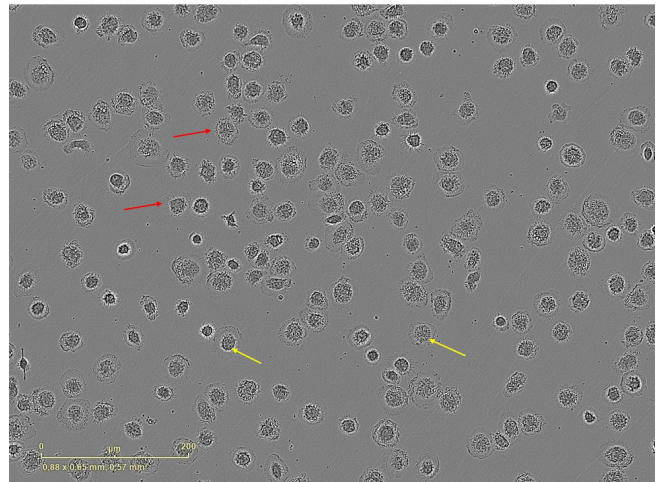


Рис. 2. Морфология клеток, полученных из моноцитов крови здоровых доноров. Красные стрелки указывают на выросты клеточной поверхности, желтые — на крупное округлое ядро. Фотографии были получены с помощью прибора IncuCyte® S3 Live-Cell Imaging System (Sartorius; Göttingen, Germany)

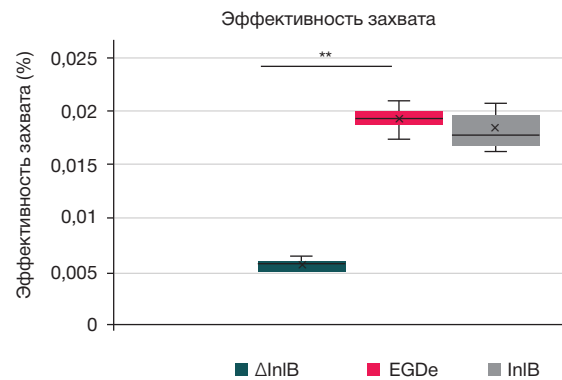


Рис. 3. Гистограмма, отражающая эффективность захвата макрофагами человека M1-типа *L. monocytogenes*, в зависимости от наличия InlB. Штамм Δ InlB — нокаутный по гену inlB, EGDe — типовой штамм, InlB — штамм, комплементированный по гену inlB; ** — $p < 0,01$ ($n = 4$)

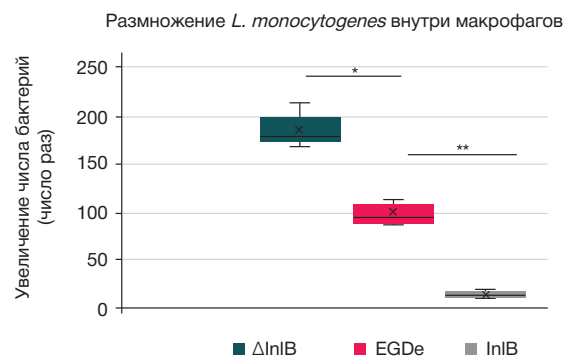


Рис. 4. Выживаемость *L. monocytogenes* в макрофагах M1-типа через 24 ч от начала инфекции. Штамм Δ InlB — нокаутный по гену inlB, EGDe — типовой штамм, InlB — штамм, комплементированный по гену inlB; * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ ($n = 4$)

штаммами EGDe и EGDe Δ inlB::pInlB. Через 24 ч штамм EGDe увеличил свою численность в 515,78 раз, а штамм EGDe Δ inlB::pInlB увеличил свою численность в 508,9 раз ($n = 3$). Таким образом размножение штамма «дикого типа» и штамма, несущего дополнительную плазмиду, было сопоставимым в клетках линии HEp-2.

Учитывая, что наличие InlB снижает выживаемость типовой штамма EGDe по сравнению со штаммом, лишенным гена inlB, мы предположили, что наблюдаемый эффект сниженной выживаемости комплементированного штамма может быть связан с уровнем продукции InlB.

Для определения уровня продукции между штаммами мы использовали ИФА-тест систему, чтобы оценить количество InlB на бактериальной поверхности и в окружающей среде. Мы обнаружили, что на клеточной поверхности количество InlB было сопоставимо между штаммами EGDe и EGDe Δ InlB::pInlB. Однако в супернатанте уровень InlB для EGDe Δ InlB::pInlB был в 3,3 раза выше, чем для типового штамма EGDe (рис. 5). Таким образом наблюдаемые результаты свидетельствуют в пользу нашего предположения, что выживаемость и/или размножение *L. monocytogenes* в макрофагах человека зависит от количества InlB.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы показали, что взаимодействие *L. monocytogenes* с макрофагами зависит от экспрессии бактериями фактора патогенности белка InlB: наличие InlB на бактериальной поверхности усиливает захват бактерий макрофагами, а также существенно снижает выживаемость листерий внутри макрофагов. Более того, чем выше уровень продукции InlB, тем хуже выживаемость *L. monocytogenes* внутри макрофагов.

Анализируя литературные данные, мы обнаружили исследование, где сравнивали различия в уровне экспрессии гена inlB между клиническими и неклиническими изолятами и продемонстрировали, что уровень продукции InlB достоверно ниже у клинических изолятов [20]. При этом чем ниже уровень продукции InlB, тем ниже был уровень IL8 вырабатываемого непрофессиональными фагоцитами [20]. Авторы предположили, что более низкая способность клинических штаммов индуцировать IL8, возможно, является механизмом уклонения от иммунитета, хотя это приводит к уменьшению эффективности инвазии в клетки непрофессиональных фагоцитов [20]. Результаты нашего исследования, демонстрирующие, что высокие уровни продукции InlB негативно сказываются на выживаемости листерий внутри макрофагов человека, подтверждают эти наблюдения.

Из двух целевых рецепторов InlB выбрать рецептор, ответственный за наблюдаемый эффект, пока не представляется возможным. Известно, что активация с-Met его физиологическим лигандом — фактором роста гепатоцитов (HGF) — приводит к изменению фенотипа макрофагов с M1 на M2 [9]. Взаимодействие InlB с с-Met имитирует активность HGF, что приводит к активации NF- κ B и запуску PI3-киназного и MAPK-киназного путей, в том числе в макрофагах [14, 16]. Известно, что взаимодействие с-Met с InlB может способствовать миграции некоторых типов иммунных клеток. Позже появились работы, доказывающие, что взаимодействие с-Met с InlB приводит к продукции перитонеальными дендритными клетками про-воспалительного цитокина IL6

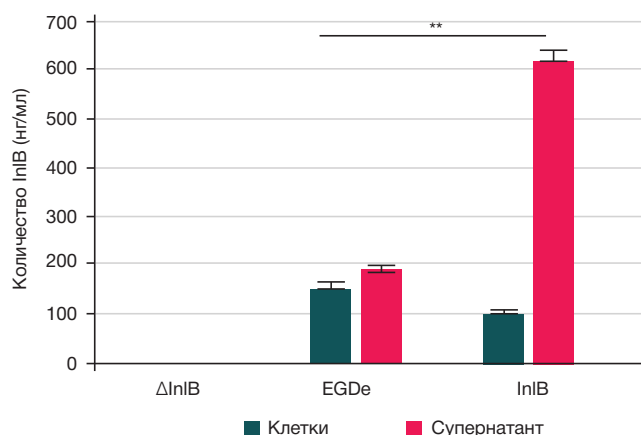


Рис. 5. Уровень продукции InlB штаммами *L. monocytogenes* через 18 ч культивирования. Штамм Δ InlB — не экспрессирует InlB, штамм EGDe на клеточной поверхности содержит 149,2 ± 13,3 нг/мл и 187,3 ± 9,8 нг/мл в супернатанте, штамм InlB на клеточной поверхности содержит 100,7 ± 4,2 нг/мл и 614,6 ± 23 нг/мл; ** — $p < 0,01$ ($n = 3$)

[16]. В то же время в нашей работе дозозависимый эффект наблюдался после захвата листерий макрофагами, что может указывать на роль внутриклеточных рецепторов InlB. Таким рецептором может быть gC1qR, для которого были описаны как внеклеточная, так и внутриклеточная локализация. Не исключено также существование еще не описанных внутриклеточных рецепторов InlB.

Наши результаты продемонстрировали, что InlB оказывает негативное влияние на уклонение листерий от врожденного иммунитета. В то же время InlB необходим для полноценной инвазии в клетки непрофессиональных фагоцитов. Баланс между взаимодействием с клетками иммунной системы и целевыми клетками организма может определять вирулентность разных штаммов *L. monocytogenes*.

ВЫВОД

Целью данной работы было изучение влияния фактора патогенности *L. monocytogenes* InlB на взаимодействие листерий с макрофагами человека. Наши результаты показали, что InlB статистически значимо улучшает захват листерий макрофагами и уменьшает выживание / размножение листерий внутри макрофагов. Таким образом, мы впервые показали, что InlB оказывает негативное влияние на уклонение листерий от врожденного иммунитета. Баланс между положительным эффектом InlB на взаимодействие *L. monocytogenes* с непрофессиональными фагоцитами и отрицательным эффектом на уклонение листерий от врожденного иммунитета и механизмы поддержания этого баланса должны быть более детально изучены для лучшего понимания процессов взаимодействия возбудителя с разными типами клеток в организме.

Литература

- Murray E, Webb R, Swann M. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear monocytois, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Pathol Bacteriol.* 1926; 29: 407–39.
- Vázquez-boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domi G, González-zorn B, et al. *Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants Listeria Pathogenesis and Molecular*
- Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 584–640.
- Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 16–23.
- Braun L, Cossart P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect.* 2000; 2: 803–11.
- Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine

- kinase. *Cell*. 2000; 103: 501–10.
6. Cossart P. Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 105–7.
 7. Organ S, Tsao M. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011; 3: 7–9.
 8. Chen Q, DeFrances MC, Zarnegar R. Induction of Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) expression during human monocyte-macrophage differentiation. *Cell Growth Differ*. 1996; 7: 821–32.
 9. Nishikoba N, Kumagai K, Kanmura K, Nakamura Y, Ono M, Eguchi H, et al. HGF-MET Signaling Shifts M1 Macrophages Toward an M2-Like Phenotype Through PI3K-Mediated Induction of Arginase-1 Expression. *Front Immunol*. 2020; 11: 1–10.
 10. Ghebrehiwet B, Lim B, Peerschke E, Willis A, Reid K. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kDa cell surface glycoprotein that binds to the globular heads of C1q. *J Exp Med*. 1994; 179: 1809–21.
 11. Ghebrehiwet B, Peerschke E. Structure and function of gC1q-R a multiligand binding membrane protein. *Immunobiology*. 1998; 199: 225–38.
 12. Chalenko Y, Kalinin E, Marchenkov V, Sysolyatina E, Surin A, Sobyenin K, et al. Phylogenetically Defined Isoforms of *Listeria monocytogenes* Invasion Factor InIB Differently Activate Intracellular Signaling Pathways and Interact with the Receptor gC1q-R. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 1–15.
 13. Chalenko Y, Kolbasova O, Pivova E, Abdulkadieva M, Povolyaeva O, Kalinin E. *Listeria monocytogenes* Invasion Into Sheep Kidney Epithelial Cells Depends on InIB, and Invasion Efficiency Is Modulated by Phylogenetically Defined InIB Isoforms. *Front Microbiol*. 2022; 13: 1–14.
 14. Sobyenin K, Sysolyatina E, Krivozubov M, Chalenko Y, Karyagina A, Ermolaeva S. Naturally occurring InIB variants that support intragastric *Listeria monocytogenes* infection in mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2017; 1: 1–8.
 15. Nepomuceno R, Tenner A. C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol*. 1998; 160: 1929–35.
 16. Mansell A, Braun L, Cossart P, O'Neill L. A novel function of InIB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol*. 2000; 2: 127–36.
 17. Calame D, Mueller-Ortiz S, Wetsel R. Innate and adaptive immunologic functions of complement in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunobiology*. 2016; 221: 1407–17.
 18. Fuss I, Kanof M, Smith P, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2009; 85: 1.1–7.1.8.
 19. Huang X, Li Y, Fu M, Xin H. Polarizing Macrophages In Vitro. Germain Rousselet (ed.), *Macrophages: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2018; 1784: 119–26.
 20. Werbrouck H, Grijspeerdt K, Botteldoorn N, Pamel E, Rijpens N, Damme J, et al. Differential InIA and InIB Expression and Interaction with Human Intestinal and Liver Cells by *Listeria monocytogenes* Strains of Different Origins. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (6): 3862–71.

References

1. Murray E, Webb R, Swann M. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear monocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Pathol Bacteriol*. 1926; 29: 407–39.
2. Vázquez-boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domi G, González-zorn B, et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 584–640.
3. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16: 16–23.
4. Braun L, Cossart P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect*. 2000; 2: 803–11.
5. Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*. 2000; 103: 501–10.
6. Cossart P. Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*. 2001; 9: 105–7.
7. Organ S, Tsao M. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011; 3: 7–9.
8. Chen Q, DeFrances MC, Zarnegar R. Induction of Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) expression during human monocyte-macrophage differentiation. *Cell Growth Differ*. 1996; 7: 821–32.
9. Nishikoba N, Kumagai K, Kanmura K, Nakamura Y, Ono M, Eguchi H, et al. HGF-MET Signaling Shifts M1 Macrophages Toward an M2-Like Phenotype Through PI3K-Mediated Induction of Arginase-1 Expression. *Front Immunol*. 2020; 11: 1–10.
10. Ghebrehiwet B, Lim B, Peerschke E, Willis A, Reid K. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kDa cell surface glycoprotein that binds to the globular heads of C1q. *J Exp Med*. 1994; 179: 1809–21.
11. Ghebrehiwet B, Peerschke E. Structure and function of gC1q-R a multiligand binding membrane protein. *Immunobiology*. 1998; 199: 225–38.
12. Chalenko Y, Kalinin E, Marchenkov V, Sysolyatina E, Surin A, Sobyenin K, et al. Phylogenetically Defined Isoforms of *Listeria monocytogenes* Invasion Factor InIB Differently Activate Intracellular Signaling Pathways and Interact with the Receptor gC1q-R. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 1–15.
13. Chalenko Y, Kolbasova O, Pivova E, Abdulkadieva M, Povolyaeva O, Kalinin E. *Listeria monocytogenes* Invasion Into Sheep Kidney Epithelial Cells Depends on InIB, and Invasion Efficiency Is Modulated by Phylogenetically Defined InIB Isoforms. *Front Microbiol*. 2022; 13: 1–14.
14. Sobyenin K, Sysolyatina E, Krivozubov M, Chalenko Y, Karyagina A, Ermolaeva S. Naturally occurring InIB variants that support intragastric *Listeria monocytogenes* infection in mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2017; 1: 1–8.
15. Nepomuceno R, Tenner A. C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J Immunol*. 1998; 160: 1929–35.
16. Mansell A, Braun L, Cossart P, O'Neill L. A novel function of InIB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol*. 2000; 2: 127–36.
17. Calame D, Mueller-Ortiz S, Wetsel R. Innate and adaptive immunologic functions of complement in the host response to *Listeria monocytogenes* infection. *Immunobiology*. 2016; 221: 1407–17.
18. Fuss I, Kanof M, Smith P, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol*. 2009; 85: 1.1–7.1.8.
19. Huang X, Li Y, Fu M, Xin H. Polarizing Macrophages In Vitro. Germain Rousselet (ed.), *Macrophages: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2018; 1784: 119–26.
20. Werbrouck H, Grijspeerdt K, Botteldoorn N, Pamel E, Rijpens N, Damme J, et al. Differential InIA and InIB Expression and Interaction with Human Intestinal and Liver Cells by *Listeria monocytogenes* Strains of Different Origins. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (6): 3862–71.