

铜绿假单胞菌 *pfm* 基因对三型分泌系统 效应蛋白的影响

牟锐 杜星 王雪涵 徐海津 张秀明 白艳玲 乔明强*

(南开大学 生命科学学院 天津 300071)

摘 要: 【目的】检测铜绿假单胞菌基因 *pfm* 对三型分泌系统效应蛋白的影响。【方法】构建 *pfm* 基因互补菌株 *pfmC*。提取野生株 PAO1、敲除株 Δpfm 和互补株 *pfmC* 的 RNA, 利用 Real-time PCR 从转录水平检测效应蛋白 ExoS、ExoT 和 ExoY 转录水平的变化。以 ExoS 为代表, 检测细胞内和分泌到细胞外效应蛋白的含量。收集铜绿假单胞菌 PAO1、 Δpfm 和 *pfmC* 菌体内和分泌到细胞外的总蛋白, 利用 ExoS 多克隆抗体进行 Western 杂交, 特异检测 ExoS 的蛋白水平。【结果】与野生型相比, Δpfm 中 *exoS*、*exoT* 和 *exoY* 转录水平明显降低, 而 *pfmC* 中这 3 个蛋白的转录水平得到回补。 Δpfm 菌体内和分泌到细胞外的 ExoS 量均明显低于野生株 PAO1, *pfmC* 细胞内和细胞外分泌的 ExoS 蛋白量均得到恢复。【结论】铜绿假单胞菌基因 *pfm* 会影响三型分泌系统效应蛋白的水平。

关键词: 铜绿假单胞菌, 三型分泌系统, 蛋白表达水平, Western 杂交

Pseudomonas aeruginosa gene *pfm* affects the expression levels of type III secretion system effectors

MOU Rui DU Xing WANG Xue-Han XU Hai-Jin ZHANG Xiu-Ming
BAI Yan-Ling QIAO Ming-Qiang*

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30570089); 天津市应用基础研究计划项目(No. 07JCYBJC08000)

*通讯作者: Tel: 86-22-23503340; Fax: 86-22-23503692; ✉: mingqiangqiao@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-11-03; 接受日期: 2012-11-30

Abstract: [Objective] Detect the effect of gene *pfm* on type III secretion system effectors. **[Methods]** Complementary strain *pfmC* was constructed. Total RNA was extracted from the wild type strain PAO1, mutant strain Δpfm and complementary strain *pfmC* respectively and real-time PCR was performed to detect the transcription levels of *exoS*, *exoT* and *exoY*. Furthermore, both total intracellular proteins and secreted proteins of strains PAO1, Δpfm and *pfmC* were collected, and detected against the representative effector ExoS by western blot. **[Results]** The results showed that transcription levels of *exoS*, *exoT* and *exoY* were significantly decreased in Δpfm compared to PAO1, and recovered in *pfmC*. Western blot showed that both total intracellular and secreted ExoS of Δpfm were significantly lower than that of PAO1 and recovered in *pfmC*. **[Conclusion]** In conclusion, gene *pfm* of *Pseudomonas aeruginosa* can affect type III secretion system effectors.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Type III secretion system, Protein expression level, Western blot

铜绿假单胞菌属于革兰氏阴性细菌,是医院三大致病菌之一。该菌通过一系列毒力机制介导感染,三型分泌系统是其中一种重要的机制。细菌三型分泌系统在细胞表面形成针状结构,可以直接将毒力蛋白注入宿主细胞,造成宿主细胞死亡,与细菌快速感染直接相关^[1]。铜绿假单胞菌三型分泌系统由三部分独立但又协同发挥功能的蛋白复合物组成,包括三型分泌系统组成元件、转运和定向元件、效应蛋白和相应的分子伴侣^[2]。目前为止,铜绿假单胞菌三型分泌系统分泌的效应蛋白仅发现了4个,包括:ExoS、ExoT、ExoU和ExoY^[1]。在已发现的铜绿假单胞菌株中,均不同时含有ExoS和ExoU^[3-4]。

本实验中所用的模式菌株PAO1仅含有ExoS、ExoT和ExoY3种效应蛋白。其中,ExoS是双功能的效应蛋白,具有GTPase激活蛋白(GAP)活性和ADP核糖基转移酶(ADPRT)功能^[5-6]。分泌的效应蛋白ExoS能够介导宿主细胞凋亡^[7]。ExoT与ExoS具有76%的同源性,ExoT也是一个双功能效应蛋白,具有GAP活性和ADPRT功能。分泌的ExoT蛋白能够破坏宿主细胞肌动蛋白骨架,逃避宿主细胞的吞噬^[8]。ExoY

是一个腺苷酸环化酶,分泌的ExoY也会破坏细胞肌动蛋白骨架,抑制宿主细胞的吞噬^[9]。与宿主细胞接触和低钙离子的情况可以有效地诱导铜绿假单胞菌三型分泌系统的表达^[10-11]。

本实验室白芳等利用Mu转座技术,筛选出与铜绿假单胞菌泳动能力相关基因PA2950,并命名为*pfm*^[12]。随后有报道PA2950表达产物与*Vibrio cholerae*中的FabV蛋白具有同源性,具有丁烯酰ACP还原酶活性,并且参与到脂肪酸代谢中^[13]。针对*pfm*的功能,我们进行了系统地研究发现:(1)铜绿假单胞菌基因*pfm*影响了密度感应系统(铜绿假单胞菌密度感应系统包括LasI-LasR系统,RhlI-RhlR系统和PQS系统^[14-16]),与野生株相比,*pfm*敲除株中密度感应系统信号分子显著降低;(2)*pfm*与铜绿假单胞菌毒力相关,在小鼠感染模型和线虫快速杀伤模型中,*pfm*突变株与野生型相比,毒力显著降低^[17-18]。由于三型分泌系统在铜绿假单胞菌快速感染中发挥着主要作用,三型分泌系统效应蛋白更是直接参与了对宿主的杀伤^[19],*pfm*可能与三型分泌系统存在关联,因此本文检测了*pfm*对三型分泌系统效应蛋白的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

铜绿假单胞菌模式株 PAO1 为本实验室保存; 敲除株 Δpfm 为前期实验构建^[17]; ExoS 多克隆抗体为金守光实验室赠予; HRP 标记的羊抗兔二抗购自 Promega 公司; 显影底物购自 Usb 公司; RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; 反转录试剂盒和 SYBR Green 染料购自 Bio-Rad 公司。

1.2 互补菌株的构建

以 PAO1 基因组为模板, 用上游引物 pfmC-s (酶切位点为 *EcoR* I): 5'-CGGAATTCCAAGCGGAGGTGTCTCATT-3'和下游引物 pfmC-anti (酶切位点为 *Hind* III) 5'-CCCAAGCTTGACGGCTCGGATCCAGGC-3', 扩增 *pfm* 基因。利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后连接到用相同酶酶切后的 pDN18 载体上, 即构建好互补质粒 pDN18-*pfm*。将该质粒电转化入敲除株 Δpfm 中, 即构建好互补菌株 *pfmC*。

1.3 细菌分泌蛋白的收集和浓缩

配制 L-Broth 培养基(g/L): Trypton 10, Yeast extract 5, NaCl 5, pH 7.2。挑选单菌落, 接种到 5 mL L-Broth 培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养过夜。然后按照 1:50 接种比例, 接种到含有 0.2% 血清的 L-Broth 培养基中, 利用 5 mmol/L EGTA 诱导三型分泌系统效应蛋白的表达, 37 °C、200 r/min 振荡培养 6 h。

取适量菌液测定细菌浓度 OD_{600} 值。按照所测的 OD_{600} 值, 用液体 L-Broth 调整样品, 使得样品的细菌浓度相同。取 1 mL 菌液, 7 000×g 室温离心 10 min。取离心后所得上清 850 μ L 移入一个干净的 1.5 mL 离心管, 加入 150 μ L 预冷的 100% TCA, 冰上静置 30 min。13 000×g 离心 10 min, 收集沉淀。用 1 mL 预冷的丙酮洗涤, 重复 3 次, 以去除 TCA。13 000×g 室温离心 2 min, 吸去丙

酮, 冰上放置 3 min, 以挥发剩余的丙酮。将所得蛋白沉淀溶于适量 PBS 中, 并加入适量 Loading buffer, 沸水浴 10 min 左右, 至蛋白沉淀完全溶解。

1.4 SDS-PAGE 和 Western 杂交

配制浓缩胶为 5%、分离胶为 12% 的 SDS-PAGE, 进行电泳。电泳完成后, 用 Bio-Rad 半干转膜仪转膜, 将 PAGE 胶上的蛋白转到 PVDF 膜中, 恒流 300 mA、30 min。将 PVDF 膜用甲醛激活后, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 将 ExoS 抗体按照 1:2 000 的比例进行稀释, 一抗室温振荡反应 1 h; PBST 洗 4 次; 加入二抗, 羊抗兔二抗以 1:2 500 稀释, 室温振荡反应 1 h。PBST 洗 4 次。HRP 显影底物溶液 A 和溶液 B 各取 500 μ L, 混匀后, 静置 1 min, 均匀滴加到 PVDF 膜上, 反应 1 min 后, 即可显影。

1.5 Real-time PCR

利用 Bio-Rad CFX 96 荧光 PCR 仪测定样品中的 mRNA 水平。每个样品 3 个平行, *rpoD* 基因用作内参。运行程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 56 °C 30 s, 72 °C 20 s, 共 40 个循环。结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行分析计算。

2 结果与分析

2.1 基因 *pfm* 对效应蛋白转录水平的影响

为了探明 *pfm* 对三型分泌系统效应蛋白的影响, 我们首先从转录水平分析了 *pfm* 对 PAO1 效应蛋白 ExoS、ExoT、ExoY 的影响。如图 1 所示, 利用 Real-time PCR 检测菌株中 *exoS*、*exoT*、*exoY* 的 RNA 水平, 发现突变株 Δpfm 中 *exoS*、*exoT*、*exoY* 转录水平比野生型 PAO1 明显要低, 分别降低了约 6.2、4.3、2.8 倍; 互补株 *pfmC* 中 *exoS*、*exoT*、*exoY* 转录水平均得到回复。*rpoD* 为内参基因。上述结果说明 *pfm* 基因的敲除使得 *exoS*、*exoT*、*exoY* 转录的 RNA 量明显下降。

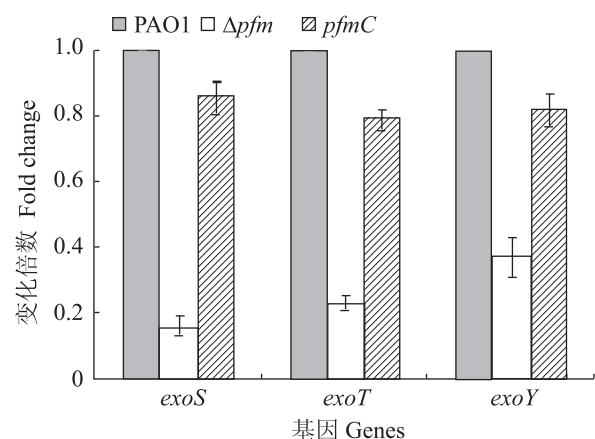


图 1 Real-time PCR 检测三型分泌系统效应蛋白 ExoS、ExoT 和 ExoY 的转录水平

Fig. 1 The transcription levels of *exoS*, *exoT* and *exoY* by real-time PCR

注: 纵坐标表示基因的变化倍数. PAO1: 野生株; Δpfm : 敲除株; *pfmC*: 互补株. *rpoD* 为内参基因.

Note: The ordinate indicated change folds of tested genes. PAO1: Wild strain; Δpfm : Mutant strain; *pfmC*: Complementary strain. *rpoD* was used as an internal control.

2.2 *pfm* 影响三型分泌系统效应蛋白

效应蛋白分泌到哺乳动物细胞内, 直接形成细菌对宿主的快速杀伤力^[20]. 我们利用 EGTA 在体外形成低钙环境, 诱导三型分泌效应蛋白的分泌, 以探明 *pfm* 对分泌到细胞外的效应蛋白的影响. 由于三型分泌效应蛋白都是通过三型分泌复合物进行转运, 可通过 ExoS 的分泌情况表征效应蛋白在分泌过程中受到的影响^[21-24].

我们利用 ExoS 多克隆抗体检测野生型 PAO1、*pfm* 敲除株 Δpfm 和互补株 *pfmC* 菌体内和分泌到细胞外的 ExoS 量. 分别挑取 PAO1、 Δpfm 、*pfmC* 单菌落接种到液体 L-Broth 培养基中, 过夜培养后, 1:50 接种到含有 0.2% 血清、5 mmol/L EGTA 的 L-Broth 培养基中, 诱导三型分泌系统的表达. 诱导表达后, 收集细菌分泌蛋白和菌体内蛋白. SDS-PAGE 电泳后, 用 ExoS 多克隆抗体分别检测 PAO1、 Δpfm 、*pfmC* 中 ExoS 在细菌内的产生量以及分泌到细胞外的蛋白量. 如图 2 所示,

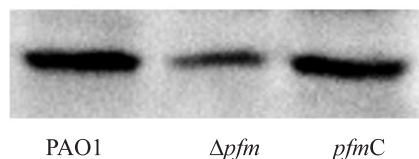


图 2 Western blot 检测菌体内 ExoS 蛋白表达水平
Fig. 2 Detection of intracellular ExoS protein levels by Western blot

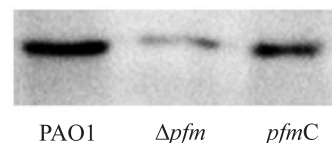


图 3 Western 检测分泌到细菌胞外的 ExoS 水平
Fig. 3 Detection of secreted ExoS protein levels by Western blot

突变株 Δpfm 菌体内 ExoS 量明显比野生型低. 互补株 *pfmC* 菌体内 ExoS 量比突变株明显要高, 并且基本回复到野生型 PAO1 ExoS 表达水平. 图 3 为分泌到细胞外的 ExoS 蛋白表达水平情况. 与菌体内蛋白表达情况一致, PAO1 明显高于 Δpfm , 互补株 *pfmC* 蛋白表达水平基本回复野生型的表达水平. 每个实验均重复 3 次.

3 讨论

本文发现铜绿假单胞菌基因 *pfm* 会影响其三型分泌系统效应蛋白的转录, 以 ExoS 为代表, *pfm* 突变株中分泌到胞外的效应蛋白也随之降低. 而三型分泌系统分泌的蛋白可以直接注入到细胞中, 是控制铜绿假单胞菌急性感染的关键因素^[25]. 因此, 本文的发现给 *pfm* 突变株在急性感染模型中毒力降低提供了一个解释.

已有文献报道铜绿假单胞菌基因 *pfm* 表达产物是丁烯酰 ACP 还原酶, 参与到脂肪酸代谢中^[13]. 我们的前期研究报道, *pfm* 的突变使得密度感应系统信号分子含量降低. 而菌体的代谢情况和密度感应系统均对铜绿假单胞菌的三型分泌系统有调节作用.

有研究表明菌体代谢紊乱后, 铜绿假单胞菌

三型分泌系统会因此受到抑制^[26], 如突变丙酮酸脱氢酶基因 *aceA*、*aceB*^[27]; 突变葡萄糖转运子基因 *glr*^[28]。基因 *pfm* 突变后, 脂肪酸代谢紊乱, 应该是导致三型分泌系统效应蛋白受到抑制的原因。但另一方面, 基因 *pfm* 的敲除, 使得密度感应系统信号分子含量降低。研究发现, 铜绿假单胞菌密度感应系统中的 RhlI-RhlR, PQS 系统对三型分泌系统有负调控作用, 而 LasI-LasR 系统对三型分泌系统几乎没有影响^[29-30,32]。前期我们已经报道 *pfm* 的突变抑制了 RhlI-RhlR 系统和 LasI-LasR 系统^[17]。由于 PQS 系统受到关键调节子 PqsR (MvfR) 的控制^[31], 本文中, 我们又通过 Real-time PCR 检测了 *pfm* 对 *pqsR* 基因的影响, 发现 *pfm* 的敲除对 *pqsR* 基因无显著影响(数据未列出)。既然 *pfm* 的突变抑制了 RhlI-RhlR 系统, 按照已有的理论, 三型分泌系统会因此受到一定程度的上调。而本文发现 *pfm* 的突变会导致三型分泌系统效应蛋白表达水平和分泌到细胞外的含量都下降, 这有可能是因为 *pfm* 突变导致代谢紊乱, 从而抑制三型分泌系统的作用覆盖了 *pfm* 通过 QS 系统对三型分泌系统产生的影响, 使得总体上呈现出对三型分泌系统的抑制。具体机制将得到进一步地研究。

参考文献

- [1] Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(9): 654-665.
- [2] Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 1998, 62(2): 379-433.
- [3] Feltman H, Schulert G, Khan S, et al. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 10): 2659-2669.
- [4] Fleiszig SM, Wiener-Kronish JP, Miyazaki H, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S[J]. Infection and Immunity, 1997, 65(2): 579-586.
- [5] Mody CH, Buser DE, Syme RM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces proliferation of human T lymphocytes[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(5): 1800-1805.
- [6] Knight DA, Finck-Barbançon V, Kulich SM, et al. Functional domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(8): 3182-3186.
- [7] Jia J, Alaoui-El-Azher M, Chow M, et al. c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Pseudomonas aeruginosa* ExoS-induced apoptosis[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(6): 3361-3370.
- [8] Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT[J]. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 2004, 152: 79-92.
- [9] Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, et al. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(23): 13899-13904.
- [10] Frank DW. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Molecular Microbiology, 1997, 26(4): 621-629.
- [11] Vallis AJ, Yahr TL, Barbieri JT, et al. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions[J]. Infection and Immunity, 1999, 67(2): 914-920.
- [12] Bai F, Li Y, Xu H, et al. Identification and functional characterization of *pfm*, a novel gene involved in swimming motility of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Gene, 2007, 401(1/2): 19-27.
- [13] Zhu L, Lin J, Ma J, et al. Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(2): 689-698.
- [14] Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and

- characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(9): 3000–3009.
- [15] Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, et al. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(5): 1490–1494.
- [16] Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR[J]. Molecular Microbiology, 2003, 50(1): 29–43.
- [17] Mou R, Bai F, Duan Q, et al. Mutation of *pfm* affects the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to host cells and the quorum sensing system[J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 324(2): 173–180.
- [18] Bai F, Xu H, Zhang Q, et al. Functional characterization of *pfm* in protein secretion and lung infection of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2011, 57(10): 829–837.
- [19] Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42973.
- [20] Dean P. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2011, 35(6): 1100–1125.
- [21] Ma L, Liu X, Liang H, et al. Molecular targets of 14- α -lipoyl andrographolide on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 10: 1112–1119.
- [22] Jin Y, Yang H, Qiao M, et al. MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(2): 399–410.
- [23] Aiello D, Williams JD, Majgier-Baranowska H, et al. Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(5): 1988–1999.
- [24] Sundin C, Thelais J, Bröms JE, et al. Polarisation of type III translocation by *Pseudomonas aeruginosa* requires PcrG, PcrV and PopN[J]. Microbial Pathogenesis, 2004, 37(6): 313–322.
- [25] Lee VT, Smith RS, Tümmler B, et al. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system *in vitro* and during infection[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(3): 1695–1705.
- [26] Rietsch A, Mekalanos JJ. Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(3): 807–820.
- [27] Hornef MW, Roggenkamp A, Geiger AM, et al. Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: a GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis[J]. Microbial Pathogenesis, 2000, 29(6): 329–343.
- [28] Wolfgang MC, Lee VT, Gilmore ME, et al. Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway[J]. Developmental Cell, 2003, 4(2): 253–263.
- [29] Hogardt M, Roeder M, Schreff AM, et al. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 4): 843–851.
- [30] Shen DK, Filopon D, Chaker H, et al. High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 8): 2195–2208.
- [31] Déziel E, Lépine F, Milot S, et al. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(5): 1339–1344.
- [32] 孔伟娜, 梁海华, 沈立新, 等. 铜绿假单胞菌中 III 型分泌系统受 Rhl 和 PQS 群体感应系统调节[J]. 微生物学报, 2009, 49(9): 1158–1164.