

ВЛИЯНИЕ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

**Старикова Э.А.¹, Маммедова Дж.Т.², Бурова Л.А.¹, Соколов А.В.^{1,3},
Васильев В.Б.^{1,3}, Фрейдлин И.С.^{1,3,4}**

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последнее время в литературе накапливается все больше данных о цитопатическом влиянии бактериальной аргининдеиминазы на эндотелиальные клетки человека, однако точные механизмы эндотелиальной дисфункции, вызванной активностью фермента, остаются слабоизученными. Активность аргининдеиминазы истощает запасы аргинина в микроокружении клеток в различных тканях организма-хозяина. Исходя из данных о том, что аргинилирование белков актинового цитоскелета регулирует их функции, мы предположили, что цитопатическое действие аргининдеиминазы *S. pyogenes* в отношении эндотелиальных клеток может быть связано с нарушением структуры их цитоскелета. Целью исследования было изучение влияния аргининдеиминазы *S. pyogenes* на миграционную активность и структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток линии EA.hy926. В работе использовали супернатанты разрушенных *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена аргининдеиминазы *S. pyogenes* M49-16delAD, а также супернатанты разрушенных *S. pyogenes* M22 и аргининдеиминазу, выделенную из стрептококков этого штамма. Влияние бактериальных компонентов на миграционную активность эндотелиальных клеток изучали в модели «раны» *in vitro*. Для анализа влияния бактериальных компонентов на структуру актинового цитоскелета проводили окрашивание клеток фаллоидин-родамином. Было показано, что супернатанты разрушенных *S. pyogenes*, так же как выделенная из супернатанта аргининдеиминаза, вызывали достоверное снижение миграционной активности эндотелиальных клеток и изменения структуры их актинового цитоскелета. Супернатант разрушенных *S. pyogenes* M49-16delAD с делецией гена аргининдеиминазы отличался достоверно ослабленной способностью подавлять миграцию клеток по сравнению с супернатантом разрушенных *S. pyogenes* M49-16. Это различие между штаммами не сопровождалось существенными различиями в характере влияния на структуру актиновых филаментов у клеток, культивируемых в присутствии соответствующих супернатантов. Добавление экзогенного аргинина в культуру клеток, содержащую супернатанты разрушенных *S. pyogenes*, не приводило к восстановлению их миграционной активности и структуры актинового цитоскелета. Однако при добавлении аргинина в культуру клеток, содержащую выделенную из супернатанта аргининдеиминазу, миграционная активность клеток достоверно усиливалась, а структура актинового цитоскелета эндотелиальных клеток восстанавливалась. Снижение миграционной активности эндотелиальных клеток под влиянием стрептококковой аргининдеиминазы сопряжено с нарушением структуры их актинового цитоскелета на фоне деплеции аргинина.

Ключевые слова: *S. pyogenes*, аргининдеиминаза, эндотелиальные клетки, метаболизм аргинина, миграция, цитоскелет

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Address for correspondence:

Starikova Eleonora A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-68.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.А. Старикова, Дж.Т. Маммедова, Л.А. Бурова, А.В. Соколов, В.Б. Васильев, И.С. Фрейдлин «Влияние аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* на миграционную активность и структуру цитоскелета эндотелиальных клеток человека» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 521-528.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-521-528

© Старикова Э.А. и соавт., 2017

For citation:

E.A. Starikova, J.T. Mammedova, L.A. Burova, A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev, I.S. Freidlin "Effect of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* on cytoskeleton structure and migration activity of human endothelial cells", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 521-528.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-521-528

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-521-528

EFFECT OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ON CYTOSKELETON STRUCTURE AND MIGRATION ACTIVITY OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS

Starikova E.A.^a, Mammedova J.T.^b, Burova L.A.^a, Sokolov A.V.^{a,c}, Vasilyev V.B.^{a,c}, Freidlin I.S.^{a,c,d}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State Technological University, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^d Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. There is a growing body of data about the cytopathic effect of bacterial arginine deiminase on human endothelial cells, but the precise mechanisms of endothelial dysfunction caused by the activity of the enzyme remain poorly understood. Activity of arginine deiminase causes arginine depletion in the microenvironment of the host organism cells. In view that arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton structure and cell motility, we proposed that the cytopathic effect of arginine deiminase may be associated with disruption of actin in the cytoskeleton of endothelial cells. The aim of this study was to investigate the effect of arginine deiminase from *S. pyogenes* on migration and actin cytoskeleton structure of the human endothelial cells, line EA.hy926. The supernatant of sonicated *S. pyogenes* M49-16, its isogenic mutant with a deletion of the arginine deiminase gene (*S. pyogenes* M49-16delAD), supernatant of sonicated *S. pyogenes* M22, and arginine deiminase isolated from the latter strain were used. The effect of bacterial factors on migration activity of endothelial cells was studied in the model of "wound healing" *in vitro*. To analyze the influence of bacterial factors on the actin cytoskeleton structure, cells were stained with phalloidin-rhodamine. It was shown that supernatants of destroyed *S. pyogenes*, as well as arginine deiminase significantly reduced the migration activity of endothelial cells and altered the structure of their actin cytoskeleton. The supernatants of destroyed *S. pyogenes* M49-16delAD with deleted gene of arginine deiminase showed a significantly reduced ability to suppress cell migration as compared with the supernatant of sonicated *S. pyogenes* M49-16. No significant differences were revealed in the structure of actin filaments in cells cultured in the presence of supernatants of destroyed *S. pyogenes* M19-16, and cells cultured in the presence of isogenic mutant *S. pyogenes* M49-16delAD. Adding exogenous arginine to the cells cultured with supernatants of destroyed *S. pyogenes* did not restore their migratory activity and the structure of their actin cytoskeleton. However, if arginine deficiency caused by the activity of arginine deiminase was compensated, endothelial cells migration activity was restored, and the structure of actin cytoskeleton was recovered. A decrease of migration activity of endothelial cells under the influence of streptococcal arginine deiminase was due to the disruption of actin cytoskeleton structure.

Keywords: *S. pyogenes*, arginine deiminase, endothelial cells, arginine metabolism, cell migration, cytoskeleton

Введение

Streptococcus pyogenes – стрептококк группы А (СГА), является одним из основных бактериальных патогенов, колонизирующих слизистую верхних дыхательных путей и эпителий кожи, а также обуславливающих ряд гнойных инфекций и их осложнений у человека [7]. В последние годы отмечаются подъем заболеваемости стрептококковой инфекцией и циркуляция штаммов СГА, характеризующихся повышенной патогенностью. На общем фоне высокого уровня заболеваний верхних дыхательных путей регистрируются тяжелые формы инвазивных стрептококковых заболеваний, такие как: сепсис, синдром токсического шока, токсические формы скарлатины и некротические фасциты [3].

Одним из факторов патогенности *S. pyogenes* является аргининдеиминаза (АД). АД катализирует необратимый гидролиз аргинина с образованием цитруллина и аммиака, является

одним из трех ферментов, образующих систему АД у бактерий. Система АД защищает бактерии от кислой среды микроокружения, помогая бактериям выживать в очаге воспаления и фаголизосомах [8, 9, 24]. АД может оказывать цитопатическое действие на клетки организма-хозяина, что подтверждают многочисленные исследования *in vitro*. Наши собственные исследования [1, 20], а также данные других авторов [4, 15, 22] показывают, что АД влияет на функциональную активность эндотелиальных клеток: подавляет их пролиферацию, адгезию, миграцию, формирование капилляроподобных структур, а также ангиогенез *in vivo*. Механизмы действия, лежащие в основе обнаруженных эффектов, изучены недостаточно. Между тем, в литературе накапливается все больше данных, указывающих на взаимосвязь метаболизма аргинина с регуляцией структуры цитоскелета. Многие белки, в том числе белки цитоскелета, в естественных условиях являются аргинилированными. Посттрансляционное арги-

нирование белков – перенос аргинина с тРНК на N-концевые остатки аминокислот (аспарагиновой кислоты, глутамина и цистеина) осуществляет фермент аргинил-тРНК-трансфераза (АТЕ1) [23]. Аргинилирование актина может быть одним из механизмов регуляции клеточной миграции. На культуре клеток фибробластов было показано, что аргинилирование β-актина регулирует образование ламелл, внутриклеточной актиновой сети и структуру движущего края клеток. Недостаток аргинилированных белков приводит к дефектам формирования актиновой сети, к резкому снижению уровня полимерного актина, укорочению актиновых фибрилл и формированию агрегатов актина [10, 11, 19].

Аргинин является физиологическим субстратом для синтеза NO и полиаминов [13, 15, 16]. Возможно, цитопатические эффекты АД связаны со снижением продукции этих молекул. Доказательством этого служат данные о способности АД подавлять продукцию NO и регулировать миграцию эндотелиальных клеток. В экспериментах с эндотелиальными клетками линии TR-BVV индуцированная под влиянием провоспалительных цитокинов iNOS-зависимая продукция NO полностью ингибировалась после воздействия АД и полностью восстанавливалась при добавлении в культуральную среду экзогенного аргинина [5]. Показано, что миграция клеток эпителия кишечника связана с аргинин-зависимой продукцией клетками NO, активностью FAK – киназы фокальных контактов [17] и киназой pp70s6k – ключевым регулятором 5' – концевой олигопиримидин mRNA трансляции [18]. Полиамины синтезируются во всех типах клеток и участвуют в процессах транскрипции, трансляции и репликации [6]. От синтеза полиаминов зависит миграция клеток кишечного эпителия [17], а снижение уровня синтеза полиаминов подавляет формирование ламеллиподий и стресс-волокон в мигрирующих клетках [13, 21].

Цель данного исследования состояла в оценке влияния АД *S. pyogenes* на миграционную активность и структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926. Для этого проводили сравнительное изучение влияния на исследуемые процессы супернатантов разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* типа M49 (штамм 16) и его изогенного мутанта с делецией гена АД (49-16delAD) [2], а также влияния супернатанта разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* типа M22 (штамм AL 168) и АД, выделенной из этого супернатанта.

Материалы и методы

Культура клеток эндотелия

В работе использовали эндотелиальные клетки человека перевиваемой линии EA.hy926, любезно предоставленные доктором Сога-Жан S. Edgell (Университет Северная Каролина, США). Линия воспроизводит основные фенотипические и функциональные характеристики

эндотелиальных клеток макрососудов человека. Клетки культивировали в среде DMEM с F12 («Биолот»), с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 50 мкг/мл сульфата гентамицина, 2 мМ L-глутамин-все («Биолот»), при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. Пересев производили 1 раз в 3-4 дня с кратностью 1:3. Дезинтеграцию монослоя клеток вызывали инкубацией в растворе Версена («Биолот»).

Приготовление супернатантов разрушенных стрептококков

Супернатанты разрушенных стрептококков (CPC): *S. pyogenes* тип M22, *S. pyogenes* тип M49-16, и его изогенного мутанта с делецией гена АД (M49-16delAD), содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты, были приготовлены, как описано нами ранее [20]. CPC вносили в культуры в максимальном нетоксичном для клеток разведении – 1/50, апробированном в наших предыдущих исследованиях [1].

Выделение аргининдеиминазы из супернатанта разрушенных *S. pyogenes* тип M22

Для выделения АД использовали последовательные хроматографии: ионообменную хроматографию на UNO-Sphere Q, гель-фильтрацию на Sephacryl S-200 HR и аффинную хроматографию на Аргинин-Сефарозе. Колонку с UNO-Sphere Q (18 × 2,5 см) уравнивали PBS разбавленным в 5 раз водой (PBS/5), наносили CPC, разбавленный в 5 раз водой, промывали балластные белки PBS/5 и элюировали белки линейными градиентами по 40 мл от PBS/5 до PBS и по 50 мл от PBS до 1M NaCl. Фракции, содержавшие активность АД, концентрировали до 0,7 мл на ячейке VivaSpin20 (с пределом концентрирования 30 кДа) и наносили на колонку с Sephacryl S-200 HR (115 × 1 см), уравниваемую PBS. Фракции, содержавшие активность АД, разбавляли в 5 раз водой и наносили на колонку с Аргинин-Сефарозой (5 × 1 см), уравниваемую PBS/5, белки элюировали с колонки ступенчатым градиентом по 5 мл PBS/5, PBS/4, PBS/3, PBS/2 и PBS. Фракция (PBS/2), содержавшая активность АД, была сконцентрирована на ячейке VivaSpin20 до 1,2 мл. Аликвота (10 мкг) чистого фермента была использовала для повторного масс-спектрометрического анализа, а к оставшимся 140 мкг АД было добавлено 100 мг BSA для стабилизации белка, как описано в [20]. Бактериальный фермент вносили в культуры клеток в концентрации – 3 мкг/мл, что соответствовало концентрации этого фермента в культуре клеток при внесении CPC в разведении 1/50.

Анализ структуры актинового цитоскелета

Для анализа структуры актинового цитоскелета суспензию эндотелиальных клеток в концентрации 10 тыс. в 300 мкл полной культуральной среды вносили в 6-луночные плоскодонные планшеты (Sarstedt), на дно которых были предварительно помещены стерильные обезжиренные покровные стекла. Одновременно вносили

исследуемые вещества. Клетки инкубировали 72 часа при температуре 37 °С, во влажной атмосфере с 5% CO₂. По окончании инкубации среду удаляли. Покровные стекла фиксировали в 50 мкл 4% формальдегида 10 мин при 25 °С. Фиксатор удаляли и 3 раза промывали PBS. Пермебилизацию клеток производили 0,01% раствором Тритона X-100 (Sigma) 5 мин при 25 °С. После этого детергент удаляли и стекла 3 раза промывали PBS. Далее вносили 50 мкл раствора родамин-фаллоидина на 3,3% метаноле (Invitrogen), в концентрации 6,7 ЕД/мл, (0,22 μМ), инкубировали в термостате 10 мин при температуре 37 °С, 3 раза промывали PBS, высушивали и наносили среду для заключения, содержащую краситель для ядер DAPI (Invitrogen). Препараты анализировали с помощью микроскопа AxioObserver. D1 (Zeiss) и программы AxioVisionRel. 4.7 (Zeiss).

Анализ миграционной активности клеток в модели «раны» *in vitro*

Для анализа миграционной активности суспензию клеток вносили в 96-луночные планшеты (Sarstedt) по 25 тыс. клеток в 100 мкл полной

культуральной среды. Клетки инкубировали 24 часа при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂ до образования конфлюэнтного монослоя. После этого монослой частично разрушали пластиковым наконечником («рана») и проводили однократную отмывку 100 мкл полной культуральной среды. Далее в лунки вносили по 100 мкл полной культуральной среды, содержащей 2,5% ЭТС. Одновременно вносили исследуемые субстанции. После чего клетки инкубировали 24 часа при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. По окончании инкубации среду удаляли. Клетки фиксировали 5 мин в 50 мкл 10% раствора кристаллического фиолетового в метаноле при комнатной температуре. По окончании инкубации избыток красителя удаляли трехкратной отмывкой дистиллированной водой. После этого производили фотографирование лунок. Размеры свободной от клеток площади оценивали с помощью программы AxioVisionRel. 4.7 (Zeiss). Результат выражали в процентах, принимали за 100% среднее значение площади, свободной от клеток в контрольных лунках.

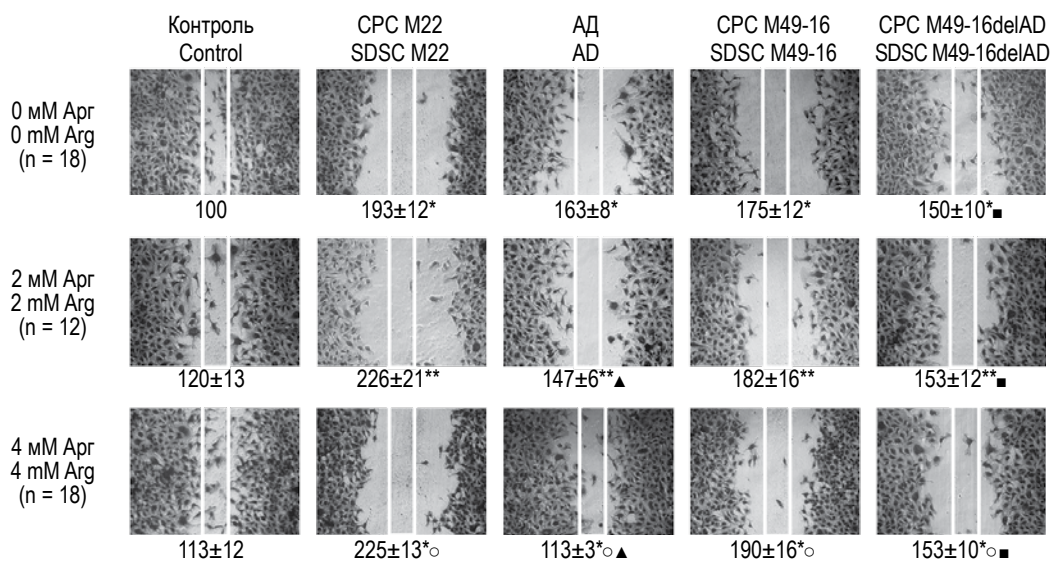


Рисунок 1. Влияние супернатантов разрушенных *S. pyogenes* и АД на интенсивность миграции эндотелиальных клеток линии EA. hy926

Примечание. Значения площади, свободной от клеток (M±SD) %.

* – отличия от контроля достоверны при p < 0,001;

■ – отличия от контроля в присутствии 2 mM аргинина достоверны при p < 0,001;

○ – отличия от контроля в присутствии 4 mM аргинина достоверны при p < 0,001;

▲ – миграция клеток в присутствии АД достоверно ниже, чем миграция клеток в присутствии АД и аргинина, при p < 0,05;

■ – миграция клеток в присутствии CPC *S. pyogenes* тип M49-16 достоверно ниже, чем миграция клеток в присутствии CPC *S. pyogenes* тип M49-16 delAD, при p < 0,01.

Figure 1. EA.hy926 cell migration in the presence of supernate of destroyed *S. pyogenes* and arginine deiminase

Note. Cells stained with crystal violet dye; 100× magnification. Data are shown as mean values of cell-free areas (M±m), 100% – mean value of the cell-free area in the control;

* – significant difference from control at, p < 0.001;

■ – significant difference from control with 2 mM arginine, p < 0.001;

○ – significant difference from control with 4 mM arginine, p < 0.001;

▲ – cell migration in the presence of AD was significantly lower than cell migration in the presence of AD and arginine, p < 0.05;

■ – cell migration in the presence of supernatant of destroyed *S. pyogenes* M49-16 was significantly lower than cell migration in the presence of supernatant of destroyed *S. pyogenes* M49-16delAD, p < 0.01.

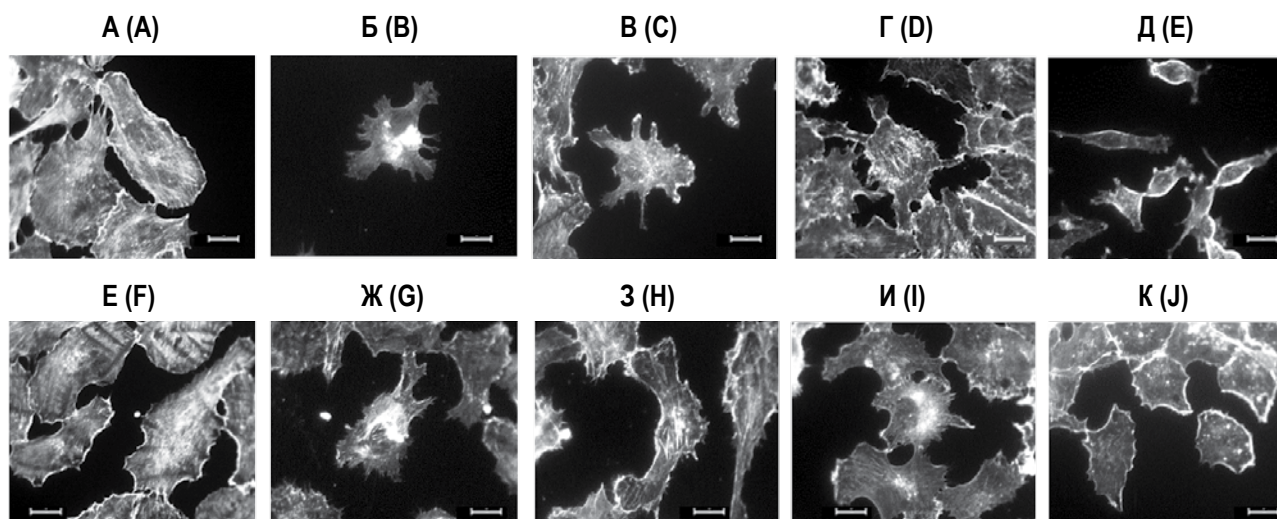


Рисунок 2. Влияние супернатантов разрушенных *S. pyogenes* и АД на морфологию и структуру актинового цитоскелета клеток линии EA.hy926

Примечание. Окраска DAPI (ДНК) и родамин-фаллоидин (F-актин); увеличение в 400 раз.

А – культуральная среда (контроль); Б – СРС *S. pyogenes* M22; В – СРС *S. pyogenes* M49-16wt; Г – СРС *S. pyogenes* M49-16delAD; Д – 3 µg/ml АД; Е – культуральная среда с добавлением 4 mM аргинина; Ж – СРС *S. pyogenes* M22 с добавлением 4 mM аргинина; З – СРС *S. pyogenes* M49-16wt с добавлением 4 mM аргинина; И – СРС *S. pyogenes* M49-16delAD с добавлением 4 mM аргинина; К – 3 µg/ml АД с добавлением 4 mM аргинина.

Figure 2. EA.hy926 cell morphology and actin cytoskeleton structure in the presence of supernatant of destroyed *S. pyogenes* and arginine deiminase

Note. Cells stained with DAPI (DNA) and phalloidin-rhodamine (F-actin); 400× magnification:

А – cell culture medium (control); Б – supernate of destroyed *S. pyogenes* M22; В – supernate of destroyed *S. pyogenes* M49-16wt; Д – supernate of destroyed *S. pyogenes* M49-16delAD; Е – 3 µg/ml AD; F – cell culture medium and 4 mM arginine; Г – supernate of destroyed *S. pyogenes* M22 and 4 mM arginine; И – supernate of destroyed *S. pyogenes* M49-16wt and 4 mM arginine; I – supernate of destroyed *S. pyogenes* M49-16delAD and 4 mM arginine; J – 3 µg/ml AD and 4 mM arginine.

Статистическая обработка данных

Анализ и обработку данных производили с помощью программы STATISTICA 5.0 с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

Анализ миграционной активности эндотелиальных клеток линии EA.hy926 в модели «раны» *in vitro*.

Исследования показали, что культивирование клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16 и *S. pyogenes* M49-16delAD приводило к достоверному снижению их миграционной активности (рис. 1). При этом подавление миграции клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16delAD (изогенный мутант с делецией гена АД) было выражено достоверно слабее, чем подавление миграции в присутствии СРС исходного штамма (*S. pyogenes* M49-16). Так, площадь, свободная от клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16, составляла 168%, а в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16delAD – 150% ($p < 0,001$).

СРС *S. pyogenes* M22 и АД, выделенная из этого СРС, также подавляли миграцию эндотелиальных клеток. При этом площадь «раны» в присутствии СРС *S. pyogenes* M22 была на 93%, а в присутствии АД на 63% больше, чем в контроле ($p < 0,001$).

Для проверки предположения, что именно дефицит аргинина приводит к подавлению миграции эндотелиальных клеток в среду, содержащую СРС, добавляли экзогенный аргинин. Результаты экспериментов показали, что сам аргинин в концентрации 2 mM и 4 mM не оказывал заметного влияния на миграционную активность клеток. В том случае, когда экзогенный аргинин добавляли к клеткам одновременно с СРС *S. pyogenes*, происходило достоверное снижение интенсивности их миграции по сравнению с интенсивностью миграции клеток, которые культивировались в присутствии СРС *S. pyogenes* без добавления аргинина. Однако в том случае, когда экзогенный аргинин добавляли к клеткам, культивируемым в присутствии АД, напротив, происходило ускорение заполнения площади экспериментальной «раны» до значений в контроле. Площадь «раны» в присутствии АД составила 163%, а при добавлении аргинина и АД – 113% ($p < 0,001$).

Анализ структуры актинового цитоскелета

Эндотелиальные клетки в стандартных условиях культивирования имели преимущественно овоидную форму или полигональную форму (рис. 2А). Актиновый цитоскелет был представлен хорошо структурированными фибриллами, клетки формировали широкие ламеллы с выра-

женным по краю кортикальным актином и факельными контактами.

Существенных различий между эффектами СРС *S. pyogenes* М49-16 и М49-16delAD обнаружено не было. В присутствии СРС *S. pyogenes* М49-16 (рис. 2В), а также в присутствии СРС его изогенного мутанта М49-16delAD (рис. 2Г) происходило заметное уменьшение размера клеток. При этом также значительно снижалось количество актиновых стресс-фибрилл, их расположение в клетке становилось более хаотично, чем в контроле. В большинстве клеток не происходило формирования ламеллы, края клеток становились сильно изрезанными и образовывали большое количество филоподий.

Культивирование клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* М22 (рис. 2Б) тоже приводило к уменьшению размеров и изменению формы клеток по сравнению с контролем. Значительно снижалось количество фибриллярного актина. Клетки в подавляющем большинстве образовывали многочисленные выросты с филоподиями, но теряли способность к формированию ламеллиподий.

В присутствии АД изменения структуры актинового цитоскелета эндотелиальных клеток были более выраженными (рис. 2Д). Происходило сильное уменьшение размера клеток (в несколько раз по сравнению с контролем). Форма клеток становилась фибробластоподобной, практически отсутствовал фибриллярный актин, ламеллиподии не образовывались.

Для проверки зависимости обнаруженных изменений от дефицита аргинина в культуральную среду, содержащую бактериальные компоненты, добавляли 4 мМ аргинина. Добавление аргинина в стандартных условиях культивирования (культуральная среда без добавок) не приводило к значительным изменениям морфологии клеток, однако при этом увеличивалось количество клеток, в которых формировались раффлы (рис. 2Е). Добавление аргинина в культуральную среду, содержащую СРС стрептококков (рис. 2Ж, 3, И), приводило к увеличению в клетках количества фибриллярного актина и к частичному восстановлению их способности формировать ламеллиподии. Появление большего количества клеток, имеющих ровный край и широкие ламеллы, указывало на восстановление их способности к миграции. В том случае, когда экзогенный аргинин добавляли к клеткам, культивируемым в присутствии АД (рис. 2К), происходило заметное восстановление размера и формы клеток, однако клетки по-прежнему не формировали ламеллиподии, актин был представлен только в виде гранул.

Обсуждение

В настоящем исследовании при сравнительном изучении эффектов СРС *S. pyogenes* и АД, выделенной из СРС стрептококков, было показано выраженное подавление миграционной активности эндотелиальных клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* М49-16, М22 и чистого фермен-

та. В то же время СРС *S. pyogenes* с делецией гена АД М49-16delAD подавлял миграционную активность эндотелиальных клеток значительно слабее, чем СРС исходного штамма М49-16wt. Сопоставление изученных эффектов говорит в пользу решающей роли АД в подавлении миграции эндотелиальных клеток, но вместе с тем свидетельствует о наличии в составе СРС дополнительных факторов, которые вносят свой вклад в ингибирующее действие СРС на миграционную активность. О наличии таких факторов говорит и то, что добавление экзогенного аргинина в культуру, содержащую СРС, не приводило к ожидавшемуся усилению миграционной активности клеток. В отличие от этого, при культивировании клеток в присутствии АД добавление аргинина приводило к восстановлению их миграционной активности. Это доказывает, что миграция клеток в условиях эксперимента зависела от концентрации аргинина в среде. Различие действия АД и СРС в присутствии экзогенного аргинина могло быть обусловлено тем, что очищенный фермент приводил к накоплению в среде конечных продуктов метаболизма аргинина аммиака и цитруллина, а в составе СРС могли содержаться еще два фермента системы АД, катализирующих образование орнитина из цитруллина и продукцию АТФ.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о цитопатическом действии АД в отношении разных типов клеток организма хозяина, в том числе эндотелиальных [15]. Для АД выделенных клеток вены пупочного канатика человека (HUVEC – human umbilical vein endothelial cells), было показано, что фермент подавляет рост эндотелиальных клеток, их миграцию в модели «раны» и формирование капилляроподобных структур на матригеле *in vitro* [4]. Эти данные были подтверждены в работе Park et al., в ходе которой было выявлено дозозависимое подавление АД формирования капилляроподобных структур *in vitro*, а также подавление ангиогенеза *in vivo* в модели хориоаллантоисной мембраны и в мышечной модели с матригелем [15]. В исследованиях Wei Zhuo [22] было показано, что подавление направленной миграции НМЕС (human microvascular endothelial cells) АД обусловлено нарушением формирования актиновых филаментов в эндотелиальных tip-cells [22].

В нашем исследовании СРС, полученные из *S. pyogenes* всех использованных штаммов, вызывали значительные изменения морфологии клеток и структуры актинового цитоскелета. Эти изменения были связаны как со снижением количества фибриллярного актина, так и с потерей способности формировать ламеллиподии – структуры, обеспечивающие направленную миграцию клеток. Наиболее сильные изменения наблюдались при культивировании клеток в присутствии АД. В этом случае в клетках практически полностью разрушался фибриллярный актин, значительно уменьшалось их распластывание по субстрату и размер.

Созвучные результаты были получены другими исследователями при изучении влияния

дефицита аргинина на клетки глиобластомы человека [16]. В этой модели культивирование клеток в среде без аргинина приводило к значительному снижению их подвижности, адгезивности и инвазивности. В условиях дефицита аргинина клетки приобретали вытянутую форму, ламеллоподии движущего края не были такими широкими, как ламеллоподии клеток в контроле. При окрашивании актиновых филаментов выявлялось сниженное количество стресс-фибрилл и кортикального актина в сравнении с контролем. Описанные эффекты носили обратимый характер, так как добавление аргинина в среду для культивирования приводило к быстрому восстановлению морфологии и структуры цитоскелета уже через 3 часа. Авторы доказывают, что обнаруженные эффекты были обусловлены специфическими нарушениями организации актинового цитоскелета, вызванными дефицитом аргинилирования бета-актина [16].

В нашем исследовании добавление экзогенного аргинина в культуральную среду с супернатантами приводило только к частичному восстановлению морфологии клеток и структуры ламеллы, а заметное восстановление размера и формы клеток происходило только в случае культивирования их с АД. Этот факт можно объяснить тем, что в наших исследованиях дефицит аргинина был вызван действием фермента, который постоянно гидролизует добавляемый субстрат, что приводит к его непрерывному истощению в среде.

Полученные в наших исследованиях результаты подтверждают исследования Wei et al., в которых на клетках эндотелия микрососудов человека

было показано, что АД *Mycoplasma sp.* в концентрации 10 мкг/мл вызывала нарушение индуцированной под влиянием VEGF-A направленной миграции клеток из-за изменения структуры актиновых филаментов в эндотелиальных tip-cells. Эти процессы были связаны с модуляцией активности eNOS, индукцией синтеза прооксидантов в клетках и следующего за этим каспаза-8-зависимого апоптоза [22]. Выявленные в нашей работе изменения структуры актиновых филаментов и подавление миграции клеток не были связаны с их гибелью, т.к. исходно подбирали концентрацию АД (3 мкг/мл), которая не оказывала ни проапоптотического, ни цитотоксического действия [1].

Полученные в данном исследовании результаты доказывают, что одним из механизмов подавления миграционной активности эндотелиальных клеток стрептококковой АД является нарушение структуры цитоскелета, вызванное дефицитом аргинина. Такое действие АД может служить причиной эндотелиальной дисфункции при стрептококковой инфекции с нарушением поступления биологически активных веществ и миграции лейкоцитов в очаг воспаления. Принимая во внимание, что актиновый цитоскелет обеспечивает не только миграцию, но и другие клеточные функции (адгезию, пролиферацию, фагоцитоз, дегрануляцию), действие бактериальной АД может приводить к нарушению различных функций всех типов клеток, в том числе участвующих в защитных реакциях при бактериальной инфекции. Эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Старикова Э.А., Лебедева А.М., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С. Изменение функциональной активности эндотелиальных клеток под влиянием лизата *S. pyogenes* // Цитология, 2012. Т. 54, № 1. С. 49-57. [Starikova E.A., Lebedeva A.M., Burova L.A., Freidlin I.S. Regulation of endothelial cells functions by ultrasonic supernatant of *Streptococcus pyogenes*. *Tsitologiya = Cytology*, 2012, Vol. 54, no. 1, pp. 49-57. (In Russ.)]
2. Старикова Э.А., Карасева А.Б., Бурова Л.А., Суворов А.Н., Соколов А.В., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* M49-16 в ингибции пролиферации эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 555-562. [Starikova E.A., Karaseva A.B., Burova L.A., Suvorov A.N., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. Role of *Streptococcus pyogenes* M49-16 arginine deiminase in inhibition proliferation of human endothelial cell line EA.hy926. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 555-562. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-555-562.
3. Тотолян А.А. Современные представления о *Streptococcus pyogenes* и вызываемой им патологии // Эволюция стрептококковой инфекции. Под ред. В.В. Левановича и В.Н. Тимченко. СПб.: Спецлит, 2015. С. 32-48. [Totolyan A.A. Cotemporary ideas about *Streptococcus pyogenes* and associated pathology. Evolution of streptococcal infection. Ed. by V.V. Levanovich, V.N. Timchenko]. St. Petersburg: Spetslit, 2015, pp. 32-48.
4. Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent. *Cancer Lett.*, 2002, Vol. 183, no. 2, pp. 155-162.
5. Chen F., Lucas R., Fulton D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 184.
6. Cohen S.S. A guide to the polyamines. New York.: Oxford University Press, 1998. 565 p.
7. Cunningham M.W. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clin. Microbial. Rev.*, 2000, Vol. 13, no. 3, pp. 470-511.
8. Cusumano Z.T., Caparon M. Citrulline Protects *Streptococcus pyogenes* from Acid Stress Using the Arginine Deiminase Pathway and the F1Fo-ATPase. *J. Bacteriol.*, 2015, Vol. 197, no. 7, pp. 1288-1296.
9. Gallego P., Planell R., Benach J., Querol E., Perez-Pons JA, Reverter D. Structural Characterization of the Enzymes Composing the Arginine Deiminase Pathway in *Mycoplasma penetrans*. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 10, p. 86.
10. Karakozova M., Kozak M., Wong C.C., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd, Mogilner A., Zebroski H., Kashina A. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science*, 2006, Vol. 313, pp. 192-196.
11. Kurosaka S., Leu A.N., Zhang F., Bunte R., Saha S., Wang L., Guo C., He W., Kashina A. Arginylation-Dependent Neural Crest Cell Migration Is Essential for Mouse Development. *PLoS Genet.*, 2010, Vol. 6, no. 3, pp. 45-50.

12. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 1991, Vol. 43, pp. 109-142.
13. Morrison R.F., Seidel E.R. Vascular endothelial cell proliferation: regulation of cellular polyamines. *Cardiovasc Res.*, 1995, Vol. 29, pp. 841-847.
14. Noris M., Ruggenti P., Todeschini M., Figliuzzi M., Macconi D., Zoja C., Paris S., Gaspari F., Remuzzi G. Increased nitric oxide formation in recurrent thrombotic microangiopathies: a possible mediator of microvascular injury. *Am. J. Kidney Dis.*, 1996, Vol. 27, pp. 790-791.
15. Park I.S., Kang S.W., Shin Y.J., Chae K.Y., Park M.O., Kim M.Y., Wheatley D.N., Min B.H. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Br. J. Cancer*, 2003, Vol. 89, pp. 907-914.
16. Pavlyk I., Rzhetskiy Y., Jagielski A.K., Drozak J., Wasik A., Pereverzieva G., Olchowik M., Kunz-Schugart L.A., Stasyk O., Redowicz M.J. Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of β actin arginylation. *Amino Acids*, 2015, Vol. 47, pp. 199-212.
17. Rhoads J.M., Chen W., Gookin J., Wu G.Y., Fu Q., Blikslager A.T., Rippe R.A., Argenzio R.A., Cance W.G., Weaver E.M., Romer L.H. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal adhesion kinase dependent mechanism. *Gut*, 2004, Vol. 53, no. 4, pp. 514-522.
18. Rhoads J.M., Liu Y., Niu X., Surendran S., Wu G. Arginine stimulates cdx2-transformed intestinal epithelial cell migration via a mechanism requiring both nitric oxide and phosphorylation of p70 S6 kinase. *J. Nutr.*, 2008, Vol. 138, no. 9, pp. 1652-1657.
19. Saha S., Mundia M.M., Zhang F., Demers R.W., Korobova F., Svitkina T., Perieteanu A.A., Dawson J.F., Kashina A. Arginylation regulates intracellular actin polymer level by modulating actin properties and binding of capping and severing proteins. *Mol. Biol. Cell.*, 2010, Vol. 21, pp. 1350-1361.
20. Starikova E., Sokolov A., Vlasenko A., Burova L., Freidlin I., Vasilyev V. Biochemical antibiologic activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochem. Cell Biol.*, 2016, Vol. 94, pp. 1-9.
21. Takaku H., Takase M., Abe S., Hayashi H., Miyazaki K. *In vivo* antitumour activity of arginine deiminase purified from *Mycoplasma arginine*. *Int. J. Cancer*, 1992, Vol. 51, pp. 244-249.
22. Wei Zh., Xiaomin S., Zhou H., Luo Y. Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans.*, 2011, Vol. 39, no. 5, pp. 143-147.
23. Wong C.C., Xu T., Rai R., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd, Wolf Y.I., Zebroski H., Kashina A. Global analysis of posttranslational protein arginylation. *PLoS Biol.*, 2007, Vol. 5, p. 258.
24. Zúñiga M., Pérez G., González-Candelas G.F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2002, no. 25, pp. 429-444.

Авторы:

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Маммедова Дж.Т. — аспирант ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия

Бурова Л.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Соколов А.В. — к.б.н., заведующий лабораторией, отдел молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Васильев В.Б. — д.м.н., заведующий отделом молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Фрейдлин И.С. — д.м.н., член.-корр. РАН, главный научный сотрудник, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Mammedova J.T., Research Fellow, St. Petersburg State Technological University, St. Petersburg, Russian Federation

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov A.V., PhD (Biology), Head of Laboratory, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Vasilyev V.B., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Freidlin I.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Medical Sciences, Main Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg State University; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 05.03.2017
Принята к печати 14.03.2017

Received 05.03.2017
Accepted 14.03.2017