

УДК 579.017.7

ИНАКТИВАЦИЯ ФИМБРИЙ ТИПА 3 УСИЛИВАЕТ АДГЕЗИЮ *Klebsiella oxytoca* К КЛЕТКАМ ЭПИТЕЛИЯ ЛЕГКИХ

© 2024 г. А. Г. Гилязева^{а, *}, А. М. Марданова^а^аИнститут фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет,
Казань, 420008 Россия

*e-mail: adeliyagilyazeva@gmail.com

Поступила в редакцию 09.02.2024 г.

После доработки 25.03.2024 г.

Принята к публикации 29.03.2024 г.

Бактерии *Klebsiella oxytoca* являются возбудителями различных внебольничных и внутрибольничных инфекций, в том числе инфекций мочевыводящих путей, внутрибольничной пневмонии, антибиотик-ассоциированной диареи, однако факторы вирулентности данного вида изучены недостаточно. С помощью разных субстратов нами охарактеризован адгезивный потенциал урологического изолята *K. oxytoca* НК-1. Показано, что этот штамм эффективно адгезирует к эпителиальным клеточным линиям, гликозилированным и негликозилированным белкам и полистиролу, а также вызывает агрегацию клеток дрожжей, что указывает на наличие фимбрий типа 1 и 3 — органелл, обеспечивающих адгезию энтеробактерий к широкому кругу субстратов. В геноме *K. oxytoca* НК-1 обнаружены опероны фимбрий типа 1 и типа 3; оперон фимбрий типа 3 представлен двумя копиями. Сконструированы мутанты с инактивированными генами этих фимбрий. Показано, что инаktivация генов фимбрий типа 1 не влияет на адгезию бактерий, в то время как инаktivация генов фимбрий типа 3 повышает адгезию *K. oxytoca* НК-1 к клеткам эпителия легких (линия H1299); дополнительным индуктором повышенной адгезивности является манноза. При этом адгезия данного мутанта к другим субстратам не меняется. Полученные данные указывают на многофакторность аппарата адгезии *K. oxytoca* и возможность компенсаторной экспрессии или сверхэкспрессии генов других адгезинов в отсутствие фимбрий типа 1 и / или 3.

Ключевые слова: *Klebsiella oxytoca*, адгезия, фимбриии типа 1 и 3, адгезин, нокаут генов и оперонов, манноза, компенсаторная экспрессия, гиперадгезивный фенотип

DOI: 10.31857/S0026898424050084, EDN: HUMBXW

ВВЕДЕНИЕ

Порядок Enterobacterales включает множество абсолютно и условно патогенных бактерий. Факторы вирулентности абсолютных патогенов, таких как *Yersinia spp.*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.* и др., изучены достаточно подробно, тогда как гораздо меньше известно о факторах вирулентности условных патогенов, таких как *Klebsiella oxytoca*. *K. oxytoca* представлена

комплексом видов: *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. pasteurii*, *K. grimontii*, *K. spallanzanii*, *K. huaxiensis* и тремя новыми неназванными видами, дифференцируемыми по нуклеотидной последовательности гена *bla_{OXA}*, кодирующего β-лактамазу [1]. Фенотипически виды этого комплекса неотличимы друг от друга, поэтому в рутинной практике все бактериальные изоляты, как правило, определяют как вид *K. oxytoca*.

K. oxytoca — второй по клинической значимости вид внутри этого рода после *K. pneumoniae* [2]. Установлено, что пенициллинотерапия приводит к дисбиозу кишечной микробиоты и чрезмерному росту бактерий *K. oxytoca* [3], что, в свою очередь, может привести к развитию воспалительного заболевания кишечника — антибиотик-ассоциированного геморрагического колита [3], а также к развитию позднего неона-

Сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин; ИМП — инфекция мочевыводящих путей; КАИМП — катетер-ассоциированная инфекция мочевыводящих путей; КОЕ — колониеобразующая единица; ЛБ — лизогенный бульон; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ФСБ — фосфатно-солевой буфер; COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года; FRT-сайт — сайт узнавания Flp-рекомбиназой; SOC — супероптимальный бульон с подавлением катаболитов.

тального сепсиса, менингита или некротизирующего энтероколита у недоношенных младенцев [4]. *K. oxytoca* является также возбудителем инфекций мочевыводящих путей (ИМП), в том числе катетер-ассоциированных (КАИМП), мягких тканей, ран, внутрибрюшных инфекций, бактериемии и внутрибольничной пневмонии [3, 5–8]. В частности, доля *K. oxytoca* в спектре уропатогенных возбудителей варьирует между 1 и 3.5%, однако среди беременных женщин это значение достигает 19–38% [9].

Недавно было показано, что у пациентов с COVID-19 микробиота легких насыщается *K. oxytoca* [10]. Кроме того, у находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ) пациентов, в том числе с COVID-19, часто развивается нозокомиальная пневмония, имеющая бактериальную природу [11]. По данным Национальной сети безопасности здравоохранения США за 2006–2007 гг. развитие ИВЛ-ассоциированной пневмонии в 2.2% случаев вызвано *K. oxytoca* [12]. Тем не менее, этиология ИВЛ-ассоциированной пневмонии зависит от многих факторов, включая демографические особенности, географическое положение и др. [11].

Изучение факторов вирулентности патогенов важно не только с фундаментальной точки зрения, но и с практической: за последние десятилетия возрос интерес к разработке и применению новых лекарственных средств, действующих на факторы вирулентности возбудителей — вакцин и патоблокаторов [13, 14]. Вакцинация направляет иммунные реакции организма на ключевые этапы патогенеза, а патоблокаторы инактивируют структуры, обеспечивающие вирулентность бактерий, тем самым подавляя их способность вызывать заболевание [13, 14]. Таким образом, действие препаратов обоих типов направлено на факторы вирулентности патогенов, а главная роль в защите от них отводится собственным механизмам иммунитета хозяина.

Адгезия бактерий к поверхности является начальным и ключевым этапом развития инфекции [15]. Патогенные бактерии адгезируют к эпителию или имплантируемым медицинским изделиям (катетерам, трахеальным трубкам и др.) с помощью разнообразных поверхностных афимбриальных и фимбриальных белковых адгезинов. Афимбриальные адгезины расположены на поверхности клетки в виде отдельных молекул или многокомпонентных агрегатов. Однако более эффективную адгезию обеспечивают адгезины, расположенные на фимбриях — нитевидных полимерных структурах, присущих большинству грамотрицательных и ряду грамположительных бактерий [16, 17]. Важную роль в патогенезе инфекций играют шаперон-ашерные фимбрии, экспорт и сборка

которых происходит с помощью собственного молекулярного аппарата, а не общей системы секреции [18]. Периплазматический шаперон формирует комплекс с каждой структурной субъединицей фимбрии, обеспечивая фолдинг и препятствуя преждевременной полимеризации, и переносит ее к белку-ашеру в наружной мембране, который производит сборку фимбрий на поверхности клетки.

К шаперон-ашерным фимбриям относятся фимбрии типа 1 и 3, характерные для вида *K. pneumoniae*, близкородственного *K. oxytoca*. Они обеспечивают адгезию бактерий к клеткам эпителия кишечника, мочевого пузыря и других органов, а также к поверхности медицинских изделий, что необходимо для формирования биопленок [18]. Фимбрии типа 1 и 3 хорошо охарактеризованы у *K. pneumoniae*, тогда как у *K. oxytoca* их функциональное значение подробно не изучено, а имеющиеся данные сводятся лишь к результатам скрининговых описательных исследований. Так, в ряде работ отмечена взаимосвязь продукции фимбрий типа 1 и 3 и способности клинических штаммов *K. oxytoca* к формированию биопленок [19, 20]. Продукция этих фимбрий описана также у штаммов *K. oxytoca*, способных к адгезии на эпителиальные клетки [21, 22]. В связи с этим, цель данной работы заключалась в том, чтобы охарактеризовать адгезивный потенциал *K. oxytoca* NK-1 и оценить вклад фимбрий типа 1 и 3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования и условия культивирования. Штамм *K. oxytoca* NK-1 выделен с поверхности мочеточникового стента пациентки с КАИМП. Бактерии культивировали при 37°C в лизогенном бульоне (ЛБ) [23], при необходимости добавляли антибиотики: гентамицин (7 мкг/мл), хлорамфеникол (20 мкг/мл) или канамицин (50 мкг/мл). Агаризированная среда содержала 2% агара. Бактерии для оценки их адгезивных свойств выращивали в условиях, оптимальных для продукции фимбрий (без аэрации в течение 48 ч при 37°C); для подавления продукции фимбрий бактерии выращивали в тех же условиях, но при 30°C [24]. Для восстановления жизнеспособности бактерий после трансформации использовали супероптимальный бульон с подавлением катаболитов (SOC) [23]; для получения ночной культуры бактерии культивировали с аэрацией в течение 16 ч.

Плазмиды и клеточные линии, использованные в работе, любезно предоставлены доктором Rafał Kolenda, сотрудником лаборатории много-

параметрического анализа Бранденбургского технического университета Cottbus-Senftenberg (Германия). Плазмиды pKD4, pKD46-Gm и pCP20 [25, 26] использовали на разных этапах инактивации генов и оперонов. Линии клеток эпителия мочевого пузыря (5637), кишечника (Caco-2) и легких человека (H1299) использовали для определения адгезивности бактерий. Клеточные линии выращивали в коммерческих средах (“Merck”, Германия; 5637 в RPMI-1640, остальные линии в DMEM/F12), содержащих дополнительно 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 2 mM *L*-глутамин, 1 mM пируват натрия, 1% заменимых аминокислот (только для H1299) и антибиотики — пенициллин и стрептомицин (по 100 ЕД /мл). Клеточные линии культивировали при 37°C, повышенной влажности и 5% CO₂.

Характеристика адгезивных свойств бактерий. Фимбрии на поверхности штамма *K. oxytoca* NK-1 выявляли методом дрожжевой агглютинации [27]. Бактерии (ОП₆₀₀ = 1) и 2%-ные пекарские дрожжи, ресуспендированные в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), смешивали на предметном стекле в равном соотношении (по 15 мкл); для определения типа фимбрий к смеси добавляли 15 мкл 0.2 М маннозы. Степень агглютинации определяли визуально и оценивали по скорости образования хлопьев как слабую (+ — время образования более 20 с), умеренную (++) — время образования 5–20 с), высокую (+++) — до 5 с).

Адгезию исследовали на плоскодонных полистирольных планшетах Nunc (“Thermo Fisher Scientific”, США) разного формата. В качестве субстратов для адгезии использовали клеточные линии и адсорбированные белки — гликозилированные (РНКаза В) и негликозилированные (бычий сывороточный альбумин, БСА). Клеточные линии выращивали в 24-луночных планшетах с поверхностью Nunclon Delta (“Thermo Fisher Scientific”) до достижения 80–90% монослоя, промывали 2 раза в ФСБ и добавляли в лунки свежую среду без антибиотиков. В лунки 96-луночного планшета MaxiSorp добавляли РНКазу В (“Sigma-Aldrich”, США) или БСА (“Roth”, Германия) — 50 мкл в концентрации 5 мг/мл в 0.1 М Na₂CO₃ pH 9.6. После инкубации в течение 12 ч при 4°C лунки промывали 1%-ным БСА и высушивали на воздухе.

Бактериальную культуру центрифугировали при 4500 об/мин в течение 10 мин. Клетки промывали 3 раза в ФСБ и ресуспендировали в среде для культивирования клеточных линий без антибиотиков (для анализа адгезии к эукариотическим клеткам) или 1% БСА (для анализа адгезии к адсорбированным белкам). Лунки инфицировали бактериальной суспензией —

20 × 10⁶ бактерий (клеточные линии) или 5 × 10⁶ бактерий (белки). После 2 ч инкубации лунки 3 раза промывали ФСБ для удаления несвязавшихся бактерий. Клетки эукариот с адгезированными бактериями разрушали, добавляя в лунку 200 мкл 0.1%-го Тритона X-100 на 5 мин. Готовили серию десятикратных разведений, которые высевали на агаризованную среду ЛБ для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ). Результаты выражали как количество КОЕ на 1 мм² поверхности монослоя (площадь поверхности лунки 1.9 см²). Бактерии, связанные с белками, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде, промывали в ФСБ, окрашивали иодидом пропидия и сканировали с помощью автоматизированной системы флуоресцентной микроскопии Aklides (“Medipan”, Германия); подсчет бактерий в 1 мм² проводили в программе Maxislider v.4.02. О влиянии инактивации на адгезивность мутанта судили по эффективности адгезии, выраженной как отношение уровня адгезии мутанта к уровню адгезии штамма дикого типа, принятого за 100%.

Для визуализации адгезированных бактерий клеточную линию 5637 выращивали на стерильных покровных стеклах в 24-луночном планшете. Инфицированные и промытые клетки фиксировали 1%-ным глутаровым альдегидом (“Sigma-Aldrich”) в течение 12 ч, промывали 2 раза в ФСБ и обезвоживали растворами этанола в восходящей концентрации (от 30 до 96%) по 2 раза в течение 30 мин. Анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Merlin (“Carl Zeiss”, Германия) [28].

Поиск генов фимбрий в геноме штамма NK-1, секвенированном нами ранее [29], проводили с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Сравнительный анализ геномных локусов проводили с помощью программы Easyfig v. 2.2.3. Белковые мотивы в аминокислотных последовательностях предсказывали с помощью программы ScanProsite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>).

Инактивацию генов и оперонов проводили с помощью системы рекомбинации фага λ Red по методу, описанному ранее [25], с модификациями для энтеробактерий [30]. Удаляли как гены адгезинов, так и полные опероны, чтобы исключить вклад других структурных субъединиц в адгезию.

На всех этапах генетический материал доставляли в клетки бактерий с помощью электропорации: 50 мкл электрокомпетентных клеток и 1 мкл плазмиды (40–50 нг) или 5 мкл ПЦР-продукта (1000 нг) помещали в холодную кювету с зазором 4 мм. Процедуру проводили с помощью прибора MicroPulser (“Bio-Rad”,

США) при следующих параметрах: напряжение 2.5 кВ, емкость 25 мкФ, сопротивление 200 Ом. Сразу после воздействия электрического импульса к клеткам добавляли 900 мкл среды SOC.

Для получения электрокомпетентных клеток нативного штамма ночную культуру инокулировали в свежую среду в соотношении 1 : 100 и выращивали с аэрацией до $ОП_{600} = 0.5–0.6$. Далее клетки инкубировали на льду в течение 30 мин, осаждали (12 мин при 4500 g), 2 раза промывали холодной дистиллированной водой и концентрировали в ней же в 100 раз относительно первоначального объема культуры. Далее клетки трансформировали плазмидой pKD46-Gm, кодирующей рекомбиназу фага λ Red, и культивировали при 30°C с аэрацией в течение 1 ч.

Трансформанты культивировали на плотной среде ЛБ с гентамицином при 30°C и использовали для получения вторичных электрокомпетентных клеток. После достижения $ОП_{600} = 0.2–0.3$ к культуре добавляли 0.2% арабинозы для индукции экспрессии гена рекомбиназы фага λ Red. После дальнейшего культивирования в течение 30–45 мин культуру инкубировали в течение 15 мин в водяной бане при 42°C и далее 15 мин во льду. После осаждения и промывания клетки трансформировали ПЦР-амплификатом гена устойчивости к канамицину kan, фланкированного прямыми повторами (FRT-сайтами). Благодаря использованию составных праймеров для инактивации (табл. 1),

ген был фланкирован также участками удаляемого элемента, по которым ген kan, фланкированный FRT-сайтами, в ходе гомологичной рекомбинации встраивался в геном вместо удаляемого элемента с помощью накопленной в клетках рекомбиназы. После трансформации клетки культивировали при 37°C в течение 2 ч с аэрацией, а затем в течение 2 ч без аэрации. Скрининг мутантов проводили на плотной среде ЛБ с канамицином, используя праймеры для верификации (табл. 2). ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле [31], ДНК-маркер — GeneRuler 1 kb Plus (“Thermo Fisher Scientific”).

Полученные мутантные штаммы использовали для получения электрокомпетентных клеток, которые затем трансформировали плазмидой pCP20, кодирующей Flp-рекомбиназу. Эта рекомбиназа, узнающая FRT-сайты, вырезала ген kan из генома. Протокол приготовления электрокомпетентных клеток был таким же, как для нативного штамма. Трансформанты культивировали на плотной среде ЛБ с хлорамфениколом при 30°C.

Для элиминации плазмиды pCP20 из мутантных штаммов бактерии культивировали на плотной среде ЛБ без антибиотиков при 42°C. Колонии мутантов, утративших устойчивость ко всем трем антибиотикам, использовали для подтверждения инактивации с помощью ПЦР с праймерами для верификации (табл. 2).

Статистическая обработка результатов. Эксперименты проводили 3–5 раз по три

Таблица 1. Праймеры для инактивации, использованные в работе

Ген/оперон	Праймер	Нуклеотидная последовательность*	T, °C
<i>fimH</i>	Ko.fH.ina f	aagaggaatgaaaaaatagtcaccctgttgtaac GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	63.5
	Ko.fH.ina r	ttattcgtaacaaagggtactccgataattgactg ATGGGAATTAGCCATGGTCC	
<i>mrkD</i> (обе копии)	Ko.mD.ina f	agtcaggaaaaaacaaggaaacgctatgtcgctaa GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	62.0
	Ko.mD.ina r	caattgtgctgaatcacgcatacccgctcccgaat ATGGGAATTAGCCATGGTCC	
<i>fim</i>	Ko.fim.ina f	atgaacaaattagccgttatcggttttcagcactgttcctgagcgctacGTGTAGGCTGGAG CTGCTTC	64.5
	Ko.fim.ina r	ctacactcgatgccgactgcggctccgcttcgctgagagctccgccaATGGGAATTAGC CATGGTCC	
<i>mrk1</i> (первая копия)	Ko.mrk1.ina f	atgaaaaagggttctctctctgctgcaatggcgactgcggttttttggtatGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC	65.5
	Ko.mrk1.ina r	tcaattataacaagttcccaggtcgccagctggtcaacggaccgctggATGGGAATTAGCC ATGGTCC	
<i>mrk2</i> (вторая копия)	Ko.mrk2.ina f	gcggcaaatgctgctgataccaatgtaggcgcggtcaggttaattcttGTGTAGGCTGGAG CTGCTTC	66.0
	Ko.mrk2.ina r	tcgctttttccggcgctggcgtaacgtagccaatgtaataagtaaatatcATGGGAATTAGCCA TGGTCC	

* Нижний регистр обозначает выступы целевого гена/оперона.

Таблица 2. Праймеры для верификации мутантов, использованные в работе

Сайт амплификации	Праймер	Нуклеотидная последовательность	T, °C
<i>Фланкирующие праймеры</i>			
<i>fimH</i>	Ko.fH f	GGAACGATCCAGGCGGTGAT	56.0
	Ko.fH r	CGACAGGATGCAGTCGACCT	56.0
<i>mrkD</i>	Ko.mD f	GAAGGCCACGGTTAAGTGGGA	54.0
	Ko.mD r	AGGGCCAGTTGAATGAGTCG	54.0
<i>fim</i>	Ko.fim f	AGCATTGCTTCAGGATTATT	50.0
	Ko.fim r	ATCCTTGATGAACTGATTGT	50.0
<i>mrk1</i>	Ko.mrk1 f	TGCTCATTGATACTTAATTC	51.0
	Ko.mrk1 r	ATTGTAACATTTGCGCAAGA	50.0
<i>mrk2</i>	Ko.mrk2 f	ATCCATAAAACAGTCTCAAT	52.0
	Ko.mrk2 r	TTAATGCAAAAAGATTCTGG	51.0
<i>Внутренние праймеры</i>			
<i>fimH/fim</i>	Ko.inn.fH f	CGGTTTCATTAATCGCGGTCC	54.0
<i>mrkD</i>	Ko.inn.mD f	ACGGCAATAACCCGATCCTC	54.0
<i>mrk1/mrk2</i>	Ko.inn.mrk f	TATTCTCGCCGGAAAGCGGC	56.0
<i>kan</i>	K2 f	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	56.0
	K1 r	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	52.0

повторности в каждой серии. Данные представлены в виде среднего $\pm$ ошибка среднего. Статистическую обработку проводили с помощью программы PSPP-1.4.1-g79ad47. Данные сравнивали с использованием непарного двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

K. oxytoca NK-1 обладает способностью к адгезии к широкому кругу субстратов

Культура штамма NK-1, выращенная при 37°C, вызывала умеренную агглютинацию клеток дрожжей (++), которая подавлялась маннозой (+), что указывает на продукцию бактериями чувствительных и нечувствительных к маннозе фимбрий типов 1 и 3 соответственно.

В то же время, культивирование бактерий при 30°C приводило к снижению агглютинации дрожжей (+), которая при этом не изменялась при добавлении маннозы, что указывало на наличие на поверхности бактерий, выращенных в данных условиях, лишь фимбрий типа 3. Таким образом, температура культивирования влияет на продукцию штаммом NK-1 фимбрий типа 1 и 3. Для дальнейшей характеристики адгезивных свойств бактерии культивировали при 37°C.

Адгезивный потенциал штамма был охарактеризован на разных биотических и абиотических поверхностях. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что бактерии эффективно адгезируют как к линии клеток 5637 эпителия мочевого пузыря (рис. 1а), так и к стеклу (рис. 1б). Количественная оценка адгезии также подтвердила способность штамма адгезировать к биотическим и абиотическим поверхностям.

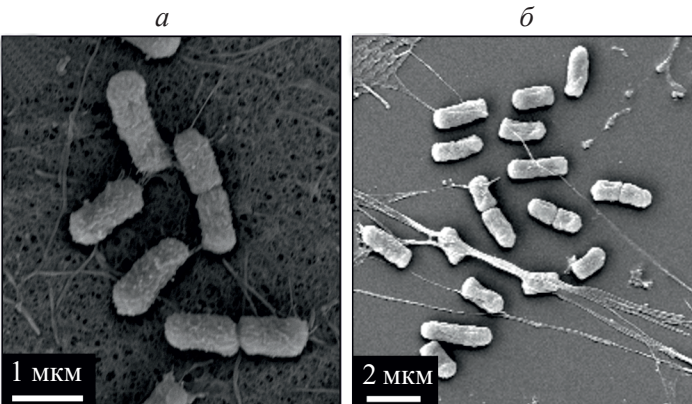


Рис. 1. Адгезивный потенциал *K. oxytoca* NK-1. С помощью сканирующей электронной микроскопии (увеличение 15000 $\times$ и 2000 $\times$) показано, что бактерии способны адгезировать как к живым клеткам эпителия мочевого пузыря 5637 (а), так и к стеклу (б).

Так, уровень адгезии штамма к клеткам эпителия кишечника Сасо-2, легких H1299 и мочевого пузыря 5637 составлял 2100 ± 100 , 1500 ± 100 и 450 ± 30 КОЕ/мм² соответственно. На разных абиотических субстратах адгезивность штамма была примерно одинаковой, составляя 23000 ± 3000 бактерий/мм² на РНКазе В, 17000 ± 3000 бактерий/мм² на БСА и столько же на полистироле без адсорбированных белков. Адгезия штамма к РНКазе В, богатой остатками маннозы, может объясняться продукцией фимбрий типа 1, адгезин которых (FimH) специфически связывает маннозилированные белки [32]. В свою очередь, фимбрии типа 3 участвуют в неспецифической адгезии и могут быть фактором эффективной адгезии штамма NK-1 к БСА и полистиролу [33, 34].

Геном *K. oxytoca* NK-1 кодирует фимбрии типа 1 и 3

С помощью BLAST-анализа в геноме *K. oxytoca* NK-1 обнаружены кластеры генов, участвующих в биогенезе фимбрий типа 1 и 3 (*fim*- и *mrk*-опероны соответственно) (рис. 2). Общими для этих оперонов являются следующие структурные гены:

– *fimA* и *mrkA*, кодирующие главную субъединицу тела фимбрий;

– *fimC* и *mrkB*, кодирующие шаперон, обеспечивающий фолдинг и транспорт субъединиц через периплазму;

– гены *fimD* и *mrkC* ашера, обеспечивающего сборку субъединиц на наружной мембране;

– гены *fimH* и *mrkD* адгезина, расположенного на дистальном конце тела фимбрии и обеспечивающего специфичное прикрепление бактерий.

Оперон фимбрий типа 1 (*fim*-оперон) представлен в геноме одной копией размером 8.05 т.п.н. Подобно *fim*-оперону *K. pneumoniae*, *fim*-оперон *K. oxytoca* NK-1 включает восемь генов: *fimA*, *fimC*, *fimD*, *fimH* и следующие минорные гены:

– *fimI* с неохарактеризованной функцией. Имеющиеся данные позволяют предположить, что продукт этого гена терминирует сборку фимбрии и закрепляет ее на наружной мембране;

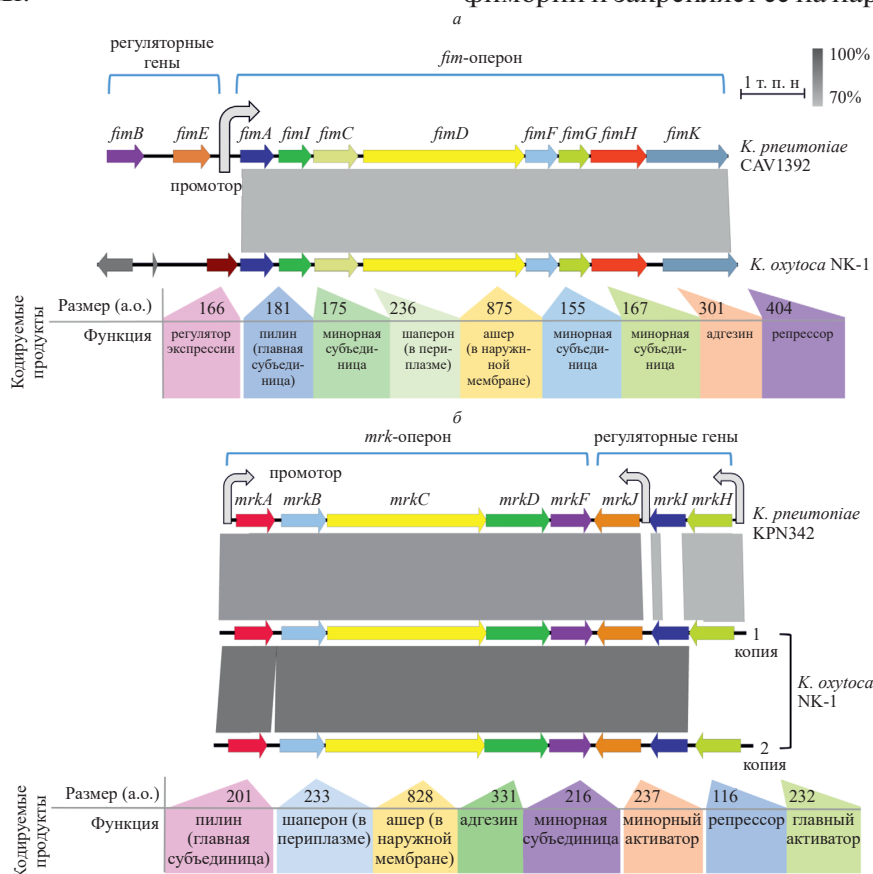


Рис. 2. Сравнительный анализ генных кластеров, ответственных за продукцию фимбрий типа 1 (а) или типа 3 (б), в геномах *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*. Под генами представлены гипотетические генные продукты в аминокислотных остатках (а.о.). Цветная шкала — степень идентичности сравниваемых генов.

— *fimF* и *fimG* — продукты этих генов закрепляют адгезин на теле фимбрии и контролируют ее длину;

— дополнительный ген *fimK* кодирует белок-репрессор экспрессии *fim*-оперона *Klebsiella* spp, отсутствующий у *Escherichia coli* [35, 36].

В то же время, в отличие от *K. pneumoniae*, перед *fim*-опероном *K. oxytoca* NK-1 вместо генов рекомбиназ *fimB* и *fimE*, меняющих ориентацию промотора и тем самым регулирующих экспрессию оперона [36], расположен ген гипотетического белка. Согласно проведенному нами BLAST-анализу, гомологи этого гена характерны только для членов видового комплекса *K. oxytoca*. С помощью программы ScanProsite в продукте данного гена выявлен структурный мотив “спираль-поворот-спираль”, характерный для ДНК-связывающих регуляторных белков [37]. Можно предположить, что экспрессия *fim*-оперона в клетках *K. oxytoca* и других членов видового комплекса *K. oxytoca* контролируется продуктом этого гена.

Оперон фимбрий типа 3 (*mrk*-оперон) в геноме *K. oxytoca* NK-1 представлен двумя копиями размером 5.58 и 5.65 т.п.н. (рис. 2б), нуклеотидная последовательность которых идентична на 94%. Структурно обе копии состоят из пяти генов, они идентичны *mrk*-оперону *K. pneumoniae* и, помимо уже упомянутых генов *mrkA*, *mrkB*, *mrkC*, *mrkD*, включают также минорный ген *mrkF*, продукт которого участвует в сборке и стабилизации фимбрий [38]. Экспрессия *mrk*-оперона контролируется прилежащим и расположенным на обратной цепи кластером регуляторных генов, который организован аналогично в соответствующих геномных локусах обеих бактерий и состоит из следующих генов: *mrkH* (главный активатор), *mrkI* (репрессор) и *mrkJ* (минорный активатор). Вместе с тем, нуклеотидные последовательности этих генов различаются. Так, обе копии гена *mrkJ* *K. oxytoca* гомологичны соответствующему гену *K. pneumoniae*. Обе копии гена *mrkI* *K. oxytoca* NK-1 гомологичны гену *mrkI* *K. pneumoniae* на 70% только в пределах 25% длины последовательности. Интересно отметить, что копии гена *mrkH* *K. oxytoca* не гомологичны друг другу по всей длине, лишь одна копия гена *mrkH* гомологична гену *mrkH* *K. pneumoniae* на 74%.

С целью изучения вклада фимбрий типа 1 и 3 в адгезивный потенциал *K. oxytoca* NK-1 проведен нокаут генов адгезинов — *fimH* и *mrkD* соответственно. Чтобы исключить возможное влияние других структурных субъединиц фимбрий на адгезию и другие клеточные процессы, например, при накоплении в периплазме, мы инактивировали также целые опероны фимбрий типа 1 (*fim*) и типа 3 (*mrk*). Для полного нокаута

фимбрий типа 3 инактивировали вторую копию гена *mrkD* или оперона *mrk* у мутантов по первым копиям. Чтобы получить мутантов по обоим типам фимбрий, инактивировали ген адгезина или оперон фимбрий типа 1 у полных мутантов по фимбриям типа 3. В геноме мутантов вместо удаленного элемента оставался так называемый “шрам” меньшего размера, что подтверждено с помощью ПЦР (рис. 3а). На рис. 3б показана линейка мутантов с нокаутом генов отдельных адгезинов фимбрий типа 1 (Δ *fimH*) или типа 3 (Δ *mrkD1*, Δ *mrkD1,2*), оперонов фимбрий типа 1 (Δ *fim*) или типа 3 (Δ *mrk1*, Δ *mrk1,2*), а также генов адгезинов и оперонов фимбрий типа 1 и 3 одновременно (Δ *fimH* Δ *mrkD1,2* и Δ *fim* Δ *mrk1,2* соответственно).

Инактивация генов фимбрий типа 3 повышает адгезию *K. oxytoca* NK-1 к клеткам эпителия легких

Адгезивные свойства мутантных штаммов исследовали с помощью тех же клеточных линий, белков, адсорбированных на полистироле, и чистого полистирола. Согласно полученным результатам, инактивация генов адгезинов и оперонов обоих типов фимбрий не влияла на адгезию бактерий к абиотическим поверхностям (РНКазе В, БСА и полистиролу), а также к линиям клеток эпителия кишечника Сасо-2 и мочевого пузыря 5637 (рис. 4а). Однако на клетках эпителия легких Н1299 адгезия мутантов по генам фимбрий типа 3 неожиданно повышалась; и этот эффект усиливался при последующем удалении генов фимбрий типа 1 у данного мутанта. Необходимо отметить, что инактивация только генов фимбрий типа 1 не влияла на адгезию бактерий. При этом фенотип мутантов по генам адгезинов не отличался от фенотипа мутантов по целым оперонам, что позволяет сделать вывод о том, что наблюдаемый эффект действительно вызван отсутствием в геноме детерминант адгезинов фимбрий типа 3. Так, уровень адгезии мутантов по одной копии гена адгезина Δ *mrkD1* или оперона Δ *mrk1* к клеткам линии Н1299 повышался относительно дикого типа на 34 ± 10 и $30 \pm 5\%$, соответственно, мутантов по обоим генам адгезина (Δ *mrkD1,2*) и оперонов (Δ *mrk1,2*) — на 79 ± 7 и $87 \pm 4\%$, а мутантов по фимбриям типа 1 и 3 одновременно, то есть по генам адгезинов Δ *fimH* Δ *mrkD1,2* и оперонам Δ *fim* Δ *mrk1,2* — на 129 ± 12 и $140 \pm 13\%$ соответственно (рис. 4а).

Инактивация фимбрий типа 1 не влияет на адгезию *K. oxytoca* NK-1 к клеткам эпителия кишечника и легких, а инактивация фимбрий типа 3 не влияет на адгезию к клеткам эпителия кишечника и мочевого пузыря, что согласуется с данными, описывающими колонизирующую

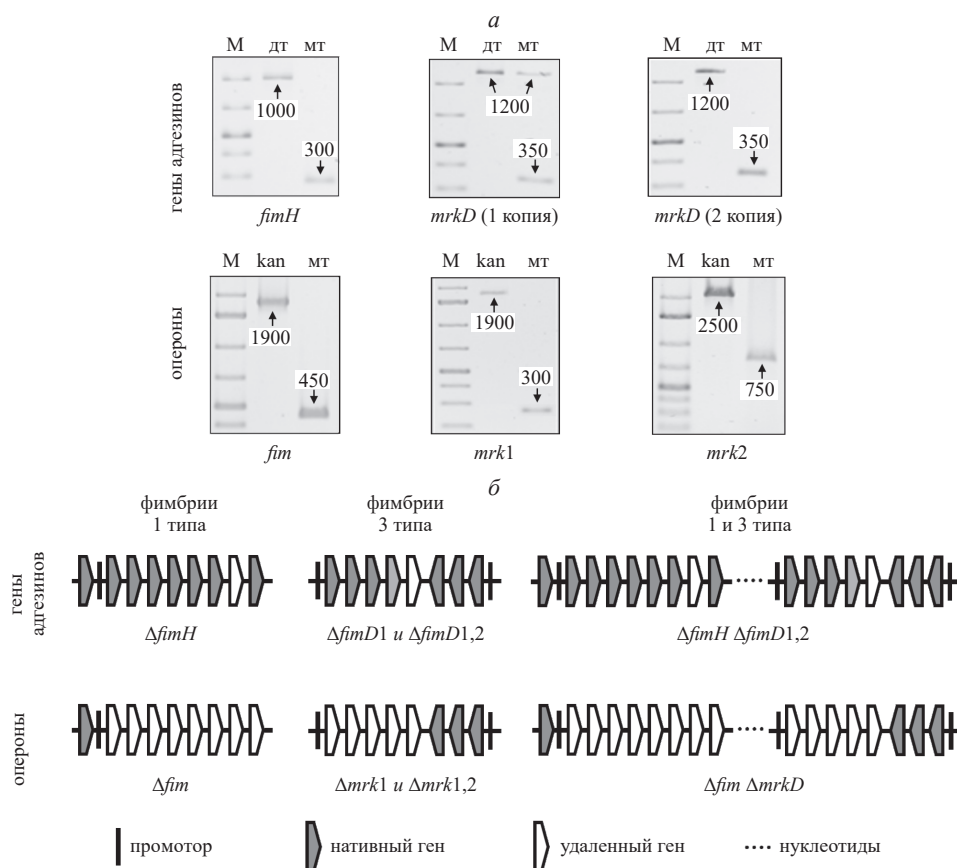


Рис. 3. Верификация мутантных штаммов *K. oxytoca* NK-1 (а) и схематичное изображение генотипов полученных мутантов (б). Генетические детерминанты фимбрий типа 1 и 3, которые обеспечивают адгезию энтеробактерий к биотическим и абиотическим поверхностям, инактивированы. Элиминацию генов адгезинов или целых оперонов фимбрий подтверждали с помощью ПЦР, используя пары праймеров к удаляемым элементам генома: генам адгезинов *fimH* и *mrkD*, оперонам *fim*, *mrk1* и *mrk2*. Размеры амплификатов (п.н.), определенные с помощью электрофореза в агарозном геле, указаны на электрофореграммах. М — ДНК-маркер, ДТ — дикий тип, кан — мутантный тип до элиминации гена устойчивости к канамицину, МТ — мутантный тип.

способность *K. pneumoniae* в модели инфекции у мышей [39]. Однако полученные нами данные об отсутствии эффекта инактивации фимбрий на адгезию *K. oxytoca* NK-1 к полистиролу и клеткам эпителия мочевого пузыря отличаются от данных для *K. pneumoniae* [39, 40]. Так, инактивация фимбрий типа 1 или 3 негативно влияла на способность *K. pneumoniae* колонизировать мочевой пузырь и катетер в мышинной модели КАИМП [40]. Кроме того, инактивация фимбрий типа 3 подавляла способность *K. pneumoniae* к формированию биопленок на абиотической поверхности — процессу, ключевым этапом которого является неспецифическое прикрепление бактерий [39]. В то же время, в отличие от показанной нами повышенной адгезии мутанта *K. oxytoca* по фимбриям типа 3 к клеткам эпителия легких, аналогичная мутация у *K. pneumoniae* никак не сказывалась на способности бактерий колонизировать легкие мышей [39].

Мы предполагаем, что отсутствие влияния инактивации фимбрий типа 1 или 3 на адгезию бактерий к определенным субстратам связано с тем, что их удаление меняет белковый профиль внешней мембраны и в свою очередь вызывает стресс клеточной оболочки, на который бактериальная клетка реагирует компенсаторной экспрессией генов других адгезинов, в частности, сверхэкспрессией адгезинов, тропных к клеточной линии H1299 эпителия легких. Установлено, что у грамотрицательных бактерий реакция клеточной оболочки на стресс обеспечивается двухкомпонентной сигнальной системой Сrx, которая контролирует экспрессию многих генов, в том числе оперонов фимбрий [41, 42].

Компенсаторная экспрессия фимбриальных генов осуществляется за счет механизмов координированной регуляции на уровне как локальных, так и глобальных регуляторов и направлена на предотвращение биогенеза одновременно нескольких типов фимбрий для

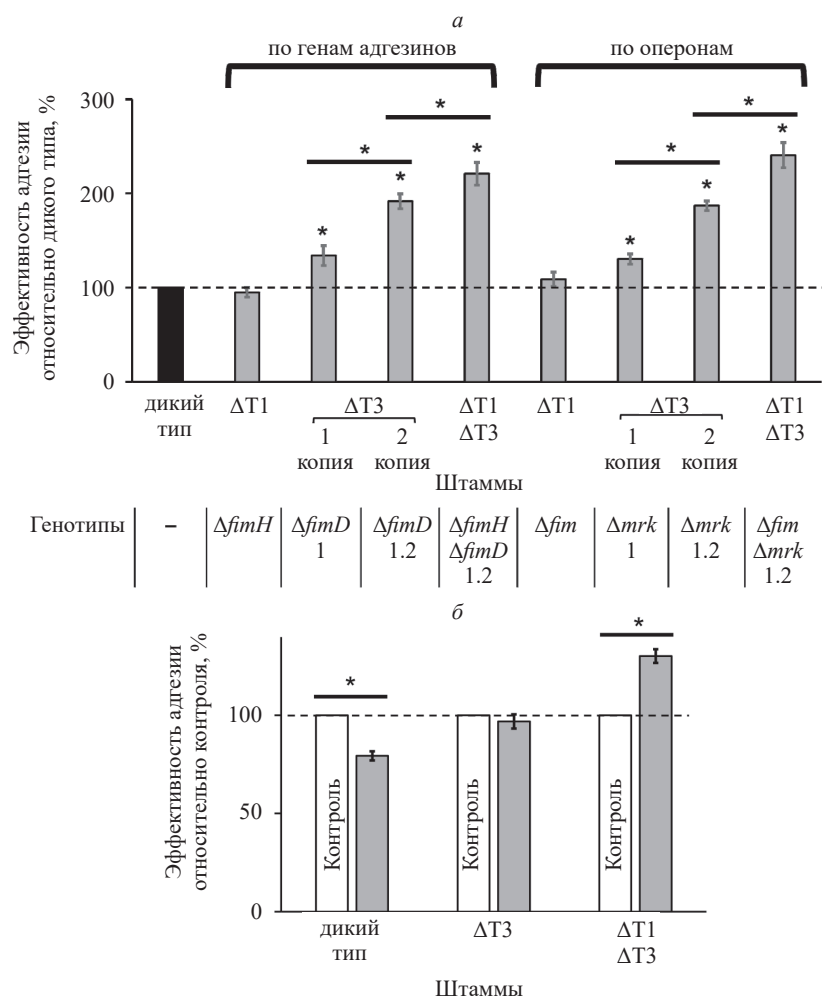


Рис. 4. Адгезивные фенотипы мутантов с инактивированными фимбриями типов 1 и/или 3. Чтобы оценить влияние инактивации фимбрий на адгезию *K. oxytoca* NK-1 к клеткам эпителия легких H1299 (а), эффективность адгезии (%) каждого мутантного штамма рассчитывали как соотношение уровней адгезии мутантного штамма и штамма дикого типа, принятого за 100%. Чтобы оценить влияние маннозы на адгезию штаммов дикого типа и мутантов (б), рассчитывали эффективность адгезии (%) каждого штамма — отношение уровня адгезии после обработки маннозой (опыт) к уровню адгезии до обработки, принятому за 100% (контроль). * $p < 0.05$.

снижения энергозатрат [43, 44]. Это показано, например, для S-, P-, F1C-фимбрий и фимбрий типа 1 *E. coli* [45]. В ходе BLAST-анализа мы обнаружили в геноме *K. oxytoca* NK-1 еще три гипотетических гомолога оперонов шаперон-ашерных фимбрий из 10, описанных у *K. pneumoniae* [46, 47]: Кра, Kpg и Esp. Таким образом, адгезивный профиль мутантных штаммов *K. oxytoca* может объясняться компенсаторной экспрессией данных оперонов или других генов адгезинов, еще не идентифицированных.

Возможно также, что функциональные особенности фимбрий типа 1 и 3 *K. oxytoca* не обеспечивают их специфичность, характерную для соответствующих фимбрий у *K. pneumoniae*, а именно, адгезию к клеткам эпителия мочевого пузыря, гликопротеинам, БСА и полистиролу.

Поскольку у *K. pneumoniae* экспрессия оперонов фимбрий типа 1 и 3 подвержена компенсаторной регуляции [48], мы предположили, что сверхадгезивность мутанта *K. oxytoca* NK-1 по фимбриям типа 3 может быть связана с гиперпродукцией фимбрий типа 1. Чтобы понять это, мы исследовали влияние маннозы на адгезивные свойства мутантных штаммов. Поскольку адгезивный фенотип мутантов по генам адгезинов не отличался от фенотипа мутантов по целым оперонам соответствующих фимбрий (рис. 4а), в данном эксперименте использовали только мутантов по генам адгезинов. Перед адгезией бактерии (дикого типа и мутантные) обрабатывали 0.2 М маннозой и рассчитывали эффективность адгезии каждого штамма как отношение адгезии обработанных бактерий к адгезии необработанных, принятой за 100% (контроль). Манноза положительно влияла

на адгезивность мутантов с одновременно инактивированными генами адгезинов обоих типов фимбрий в отношении клеток эпителия легких (рис. 4б). Обработка штамма дикого типа маннозой незначительно снижала его адгезивность — остаточная адгезия составляла $79 \pm 2\%$ от контроля. Наблюдаемый эффект может быть связан с функционированием маннозачувствительных фимбрий типа 1. Интересно отметить, что манноза не влияла на адгезию мутанта по адгезинам фимбрий типа 3 ($\Delta mrkD1,2$) и неожиданно повышала адгезию мутанта по адгезинам фимбрий обоих типов ($\Delta fimH \Delta mrkD1,2$) на $30 \pm 3\%$ относительно контроля.

Согласно одной из разновидностей механизма РНК-интерференции [49], трансляция мРНК генного кластера *mrkHII*, расположенного на противоположной цепи после оперона фимбрий типа 3 и кодирующего его регуляторы, в нативном состоянии может быть частично подавлена за счет гибридизации 5'-удлиненного конца его транскрипта с 3'-удлиненным концом транскрипта *mrk*-оперона. В случае инактивации промотора фимбриальных генов можно было бы допустить, что измененный фенотип мутантов по фимбриям типа 3 вызван частичной депрессией кластера *mrkHII*, обусловленной отсутствием *mrk*-транскрипта, и, как следствие, изменением экспрессии других гипотетических генов адгезинов, перекрестными регуляторами которых являются продукты *mrkHII*. Тем не менее, поскольку инактивация была направлена лишь на структурные гены оперона и не затрагивала промоторы и регуляторные гены, депрессия *mrkHII*-кластера возможна лишь у мутанта по целым *mrk*-оперонам (ввиду полного отсутствия транскрипта), но не у мутанта по генам адгезинов *mrkD* — в этом случае продолжалось бы частичное подавление. Поскольку адгезивные фенотипы мутантов по генам адгезинов *mrkD* и целым *mrk*-оперонам не различались, мы не можем однозначно говорить о вкладе генов-регуляторов *mrk*-оперона в экспрессию других адгезинов.

Согласно опубликованным данным, манноза усиливает экспрессию генов вирулентности энтеробактерии *Edwardsiella piscicida*, патогенной для рыб, за счет связывания и активации маннозависимого активатора транскрипции [50]. В геноме *K. oxytoca* нами обнаружен ген, на 73% идентичный этому гену-активатору, что позволяет предположить возможность его экспрессии в рамках ответа оболочки *K. oxytoca* на стресс, связанный с удалением фимбрий типа 3 или одновременно типов 1 и 3. В присутствии экзогенной маннозы это усиливает экспрессию генов адгезинов, тропных к клеткам эпителия легких.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что адгезивный аппарат *K. oxytoca* NK-1 характеризуется многообразием компонентов, которые обеспечивают адгезию к широкому кругу субстратов и способны заменять друг друга. Это осуществляется благодаря перекрестной регуляции экспрессии соответствующих генов и обеспечивает быструю и эффективную адаптацию бактерий к разным экологическим нишам. В частности, высокий природный потенциал штамма *K. oxytoca* NK-1 к адгезии на клетках эпителия легких повышается при инактивации фимбрий типа 3, и этот эффект усиливается при одновременном отсутствии фимбрий типов 1 и 3, а также в присутствии экзогенной маннозы. Это радикально отличается от эффекта, наблюдаемого после аналогичных манипуляций с фимбриальными генами у близкородственного вида — *K. pneumoniae*, что может свидетельствовать об отличиях в регуляции механизмов адгезии у *K. oxytoca*. Учитывая возрастающую клиническую значимость *K. oxytoca*, важной представляется роль факторов, контролирующей функционирование фимбрий типа 3, которые обладают потенциальной способностью индуцировать компенсаторную сверхэкспрессию генов других адгезинов. Чтобы понять, как это может сказаться на патогенезе инфекций и, в первую очередь, пневмонии, необходимо дальнейшее изучение способности мутантов колонизировать легочный эпителий на животной модели, поскольку адгезины, обеспечивающие повышенную адгезию бактерий *in vitro*, могут служить антигенами для развития иммунного ответа *in vivo* в богатой фагоцитами легочной среде и тем самым ускорять элиминацию патогенов. Кроме того, для идентификации структур, обеспечивающих повышенную адгезию мутантов, требуется проведение транскриптомного и протеомного анализа. Таким образом, полученные нами данные поднимают вопросы о механизмах адгезии условно-патогенных бактерий *K. oxytoca* и приоткрывают новые перспективы в дальнейшем поиске мишеней для патоблокаторов и вакцин, контроля инфекций, вызванных этими возбудителями.

Мы благодарим доктора Rafał Kolenda, сотрудника лаборатории многопараметрического анализа Бранденбургского технического университета Cottbus-Senftenberg (Германия), за предоставление плазмид, использованных в работе.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang J., Long H., Hu Y., Feng Y., McNally A., Zong Z. (2022) *Klebsiella oxytoca* complex: update on taxonomy, antimicrobial resistance, and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **35**, e0000621.
2. Broberg C.A., Palacios M., Miller V.L. (2014) *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* **6**, 64.
3. Herzog K.A., Schneditz G., Leitner E., Feierl G., Hoffmann K.M., Zollner-Schwetz I., Krause R., Gorkiewicz G., Zechner E.L., Högenauer C. (2014) Genotypes of *Klebsiella oxytoca* isolates from patients with nosocomial pneumonia are distinct from those of isolates from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1607–1616.
4. Cosic A., Leitner E., Petternel C., Galler H., Reinthaler F.F., Herzog-Obereder K.A., Tatscher E., Raffl S., Feierl G., Högenauer C., Zechner E.L., Kienesberger S. (2021) Variation in accessory genes within the *Klebsiella oxytoca* species complex delineates monophyletic members and simplifies coherent genotyping. *Front. Microbiol.* **12**, 692453.
5. Sibi G., Kumari P. Kabungulundabungi N. (2014) Antibiotic sensitivity pattern from pregnant women with urinary tract infection in Bangalore, India. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **7S1**, S116–S120.
6. Singh L., Cariappa M.P., Kaur M. (2016) *Klebsiella oxytoca*: an emerging pathogen? *Med. J. Armed Forces India.* **72S1**, S59–S61.
7. Papajk J., Mezerová K., Uvízl R., Štosová T., Kolář M. (2021) Clonal diversity of *Klebsiella* spp. and *Escherichia* spp. strains isolated from patients with ventilator-associated pneumonia. *Antibiotics.* **10**, 674.
8. Neog N., Phukan U., Puzari M., Sharma M., Chetia P. (2021) *Klebsiella oxytoca* and emerging nosocomial infections. *Curr. Microbiol.* **78**, 1115–1123.
9. Yang J., Long H., Hu Y., Feng Y., McNally A., Zong Z. (2022) *Klebsiella oxytoca* complex: update on taxonomy, antimicrobial resistance, and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* **35**, e0000621.
10. Han Y., Jia Z., Shi J., Wang W., He K. (2022) The active lung microbiota landscape of COVID-19 patients through the metatranscriptome data analysis. *Bioimpacts.* **12**, 139–146.
11. Maebed A.Z.M., Gaber Y., Bakeer W., Dishisha T. (2021) Microbial etiologies of ventilator-associated pneumonia (VAP) in intensive care unit of Beni-Suef University's Hospital. *Beni Suef Univ. J. Basic. Appl. Sci.* **10**, 41.
12. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J., Horan T.C., Sievert D.M., Pollock D.A., Fridkin S.K., National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities (2008) NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 996–1011.
13. Choi M., Tennant S.M., Simon R., Cross A.S. (2019) Progress towards the development of *Klebsiella* vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* **18**, 681–691.
14. Lau W.Y.V., Taylor P.K., Brinkman F.S.L., Lee A.H.Y. (2023) Pathogen-associated gene discovery workflows for novel antivirulence therapeutic development *EBioMedicine.* **88**, 104429.
15. Sarowska J., Futoma-Koloch B., Jama-Kmiecik A., Frej-Madrzak M., Ksiazczyk M., Bugla-Ploskonska G., Choroszy-Krol I. (2019) Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut. Pathog.* **11**, 10.
16. Mol O., Oudega B. (1996) Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 25–52.
17. Jin X., Marshall J.S. (2020) Mechanics of biofilms formed of bacteria with fimbriae appendages. *PLoS One.* **15**, e0243280.
18. Waksman G., Hultgren S.J. (2009) Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 765–774.
19. Hornick D.B., Allen B.L., Horn M.A., Clegg S. (1991) Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1795–1800.
20. Ghasemian A., Mobarez A.M., Peerayeh S.N., Bezmin Abadi A.T. (2018) The association of surface adhesin genes and the biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *New Microbes New Infect.* **27**, 36–39.
21. Podschun R., Heinenken P., Sonntag H.G. (1987) Haemagglutinins and adherence properties to HeLa and intestine 407 cells of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg A.* **263**, 585–593.
22. Würker M., Beuth J., Ko H.L., Przondo-Mordarska A., Pulverer G. (1990) Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. *Zentralbl. Bakteriol.* **274**, 239–245.
23. Chan W.T., Verma C.S., Lane D.P., Gan S.K. (2013) A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Biosci. Rep.* **33**, e00086.
24. Duguid J.P. (1959) Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J. Gen. Microbiol.* **21**, 271–286.

25. Datsenko K.A., Wanner B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6640–6645.
26. Doublet B., Douard G., Targant H., Meunier D., Madec J.Y., Cloeckaert A. (2008) Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *J. Microbiol. Meth.* **75**, 359–361.
27. Aberg A., Shingler V., Balsalobre C. (2006) (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Mol. Microbiol.* **60**, 1520–1533.
28. Ali R., El-Boubbou K., Boudjelal M. (2021) An easy, fast and inexpensive method of preparing a biological specimen for scanning electron microscopy (SEM). *MethodsX*. **8**, 101521.
29. Giliazeva A.G., Shagimardanova E.I., Shigapova L.H., Pudova D.S., Sharipova M.R., Mardanova A.M. (2019) Draft genome sequence and analysis of *Klebsiella oxytoca* strain NK-1 isolated from ureteral stent. *Data Brief*. **24**, 103853.
30. Khetrapal V., Mehershahi K., Rafee S., Chen S., Lim C.L., Chen S.L. (2015) A set of powerful negative selection systems for unmodified *Enterobacteriaceae*. *Nucl. Acids Res.* **43**, e83.
31. Wagner M. (1964) Eine Methode für den direkten Nachweis von Desoxyribonukleasen nach Elektrophorese in Agar. *J. Chromatogr.* **14**, 107–108.
32. Hornick D.B., Allen B.L., Horn M.A., Clegg S. (1992) Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect. Immun.* **60**, 1577–1588.
33. Jagnow J., Clegg S. (2003) *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology (Reading)*. **149**, 2397–2405.
34. Bulard E., Fontaine-Aupart M.P., Dubost H., Zheng W., Bellon-Fontaine M.N., Herry J.M., Bourguignon B. (2012) Competition of bovine serum albumin adsorption and bacterial adhesion onto surface-grafted ODT: *in situ* study by vibrational SFG and fluorescence confocal microscopy. *Langmuir*. **28**, 17001–17010.
35. Schwan W.R. (2011) Regulation of *fim* genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J. Clin. Infect. Dis.* **1**, 17–25.
36. Venkitapathi S., Wijesundara Y.H., Cornelius S.A., Herbert F.C., Gassensmith J.J., Zimmermann P.E., De Nisco N.J. (2022) Conserved FimK truncation coincides with increased expression of type 3 fimbriae and cultured bladder epithelial cell association in *Klebsiella quasipneumoniae*. *J. Bacteriol.* **204**, e0017222.
37. Aravind L., Anantharaman V., Balaji S., Babu M.M., Iyer L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 231–262.
38. Huang Y.J., Liao H.W., Wu C.C., Peng H.L. (2009) MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Res. Microbiol.* **160**, 71–79.
39. Schroll C., Barken K.B., Krogfelt K.A., Struve C. (2010) Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* **10**, 179.
40. Murphy C.N., Mortensen M.S., Krogfelt K.A., Clegg S. (2013) Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Immun.* **81**, 3009–3017.
41. Cho T.H.S., Wang J., Raivio T.L. (2022) NlpE is an OmpA-associated outer membrane sensor of the Cpx envelope stress response. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi: 10.1101/2022.10.18.512811
42. Hunke S., Keller R., Müller V.S. (2012) Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 12–22.
43. Müller C.M., Aberg A., Strasevičiene J., Emody L., Uhlin B.E., Balsalobre C. (2009) Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog.* **5**, e1000303.
44. Zhang H., Susanto T.T., Wan Y., Chen S.L. (2016) Comprehensive mutagenesis of the *fimS* promoter regulatory switch reveals novel regulation of type 1 pili in uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, 4182–4187.
45. Snyder J.A., Haugen B.J., Lockatell C.V., Maroncle N., Hagan E.C., Johnson D.E., Welch R.A., Mobley H.L. (2005) Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **73**, 7588–7596.
46. Wu C.C., Huang Y.J., Fung C.P., Peng H.L. (2010) Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. *Microbiology (Reading)*. **156**(Pt 7), 1983–1992.
47. Zhou K., Lokate M., Deurenberg R.H., Arends J., Lo-Ten Foe J., Grundmann H., Rossen J.W., Friedrich A.W. (2015) Characterization of a CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak strain assigned to a novel sequence type (1427). *Front. Microbiol.* **6**, 1250.
48. Stahlhut S.G., Struve C., Krogfelt K.A., Reisner A. (2012) Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 350–359.
49. Fire A.Z. (2007) Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* **14**, 1998–2012.
50. Wei L., Qiao H., Sit B., Yin K., Yang G., Ma R., Ma J., Yang C., Yao J., Ma Y., Xiao J., Liu X., Zhang Y., Waldor M.K., Wang Q. (2019) A bacterial pathogen senses host mannose to coordinate virulence. *iScience*. **20**, 310–323.

Inactivation of Type 3 Fimbriae Increases Adhesion of *Klebsiella oxytoca* to Lung Epithelial Cells

A. G. Giliyazeva^{1, *}, A. M. Mardanova¹

¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

**e-mail: adeliyagilyazeva@gmail.com*

Klebsiella oxytoca is a causative agent of various community-acquired and nosocomial infections in humans, including urinary tract infections, nosocomial pneumonia, antibiotic-associated diarrhea, etc. However, the virulence factors of this species have not been sufficiently studied. In this study, we characterized the adhesive potential of the urological isolate *K. oxytoca* NK-1 using different substrates. Our findings indicate that this strain effectively adheres to epithelial cell lines, glycosylated and non-glycosylated proteins and polystyrene. Furthermore, it induces yeast agglutination, indicating the presence of type 1 and type 3 fimbriae — organelles that facilitate the adhesion of enterobacteria to a diverse range of substrates. Both type 1 and type 3 fimbrial operons were identified in the strain's genome, with the latter presented in two copies. Mutants with inactivated genes encoding these fimbriae were constructed. It has been shown that the inactivation of type 1 fimbrial genes does not affect bacterial adhesion, while the inactivation of type 3 fimbrial genes increases the adhesion of *K. oxytoca* NK-1 to lung epithelial cells (line H1299), with mannose serving as an additional inducer of the increased adhesion. At the same time, the adhesion of this mutant to other substrates is not affected. These findings lead us to the conclusion that the adhesive apparatus of *K. oxytoca* is multifactorial. Additionally, they suggest the possibility of compensatory expression or overexpression of genes encoding alternative adhesins in the absence of types 1 and/or 3 fimbriae.

Keywords: *Klebsiella oxytoca*, adhesion, type 1 and type 3 fimbriae, adhesin, inactivation of genes and operons, mannose, compensatory expression, hyperadhesive phenotype