

УДК 579.083.13

А. Б. Маргулис, О. В. Сиадат, Е. В. Никитина,
А. И. Колпаков, О. Н. Ильинская

ГОМОСЕРИНЛАКТОН КАК РЕГУЛЯТОР ИНДУЦИБЕЛЬНЫХ И КОНСТИТУТИВНЫХ ФЕРМЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ключевые слова: гомосеринлактон, гидролитические ферменты прокариот.

*Показано, что гомосеринлактон, химический аналог плотностно-зависимых видоспецифических регуляторов, не являющийся генотоксикантом, увеличивает активность индуцибельной β -галактозидазы *Escherichia coli*, не влияя на уровень ее биосинтеза. Химический агент коммуникации микроорганизмов гомосеринлактон не оказывает существенного влияния на активность гидролитических ферментов прокариот.*

Keywords: homoserine lactone, hydrolytic enzymes of prokaryotes.

*It is shown that homoserine lactone, nongenotoxic chemical analogue of density-dependent species-specific regulator, increases the activity of inducible β -galactosidase of *Escherichia coli*, without affecting the level of its biosynthesis. Chemical agent of communication of microorganisms homoserine lactone has not significant effect on the activity of hydrolytic enzymes prokaryotes.*

Введение

Серьёзной проблемой клинической практики является широкое распространение устойчивых форм микроорганизмов, снижающее эффективность применения антибактериальных препаратов. Особенную трудность представляет повышенная лекарственная устойчивость бактерий в биоплёнках. Для синтеза факторов вирулентности, антибиотиков и формирования биоплёнок бактерии часто используют реакции кворум-сенсинга. Поэтому изучение механизмов таких реакций открывает новые возможности для предупреждения и лечения болезней, вызванных микробными агентами, а также позволяет по-иному взглянуть на сложный комплекс межвидовых бактериальных взаимодействий в природных местах обитания микроорганизмов [1,2]. Известно, что низкомолекулярные химические вещества, относящиеся к классу ацильных производных лактона гомосерина, выступают в роли диффундирующих химических факторов коммуникации и используются в межвидовых взаимодействиях в качестве сигнальных агентов, индуцирующих экспрессию ряда генов [3]. Местом действия сигнальных молекул, обеспечивающих межвидовую коммуникацию прокариот, по-видимому, являются клеточные ферменты. Поскольку практически все реакции в клетке катализируются ферментами, регуляция метаболизма сводится к регуляции интенсивности ферментативных реакций.

Ранее нами было показано, что гомосеринлактон не обладает токсическими эффектами в диапазоне концентраций от 10 до 1000 мкг/мл. В тесте Эймса с использованием мутантного штамма *Salmonella typhimurium* TA 100 мутагенной активности выявлено не было. В тесте на повреждение ДНК гомосеринлактон не проявил ни токсического, ни генотоксического (прямого ДНК-повреждающего) действия. Фактор индукции SOS-

ответа для гомосеринлактона в концентрациях от 10 до 100 мкг/мл были значительно ниже порогового значения, что также указывает на отсутствие генотоксических свойств этого препарата [5]. Кроме того, нами установлено, что гомосеринлактон участвует в индукции перехода некоторых штаммов микроорганизмов (*B. subtilis* Spo0E) в некультивируемое состояние [6]. Однако механизмы действия плотностно-зависимого регулятора гомосеринлактона как индуктора гипометаболического состояния пока остаются неизвестными. Можно предполагать, что при общем снижении интенсивности метаболизма и подавлении экспрессии многих генов, имеет место активация некоторых конститутивных гидролитических ферментов, важных для перехода клетки к новому физиологическому состоянию. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилась оценка возможности гомосеринлактона изменять активность и биосинтез гидролитических ферментов прокариот на примере β -галактозидазы, регулируемой SOS-опероном, и щелочной фосфатазы *Escherichia coli* PQ 37, секретируемой протеазы *B. subtilis* JB20-36, а также РНКазы *B. intermedius* для определения скорости ферментативной реакции разложения РНК в присутствии гомосеринлактона.

1. Материалы и методы исследования

В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *E. coli* PQ 37 с генотипом *Sfi A::mud (Ap lac) cts, lac A U169, mal⁺, uvr A, gal Y, pho C, rfa* (Институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск) и *Bacillus subtilis* JB20-36 с генотипом *pCM4* (Институт молекулярной биологии, Москва). В качестве сигнальной молекулы кворум-эффекта для бактериальных систем применяли неацилированный гомосеринлактон (Aldrich, Германия) в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкг/мл.

Разведения исследуемого вещества готовили в стерильной дистиллированной воде.

Для определения активности щелочной фосфатазы культуру бактерий *E. coli PQ 37* выращивали в течение 18 часов при температуре 37°C вместе с гомосеринлактоном. Гомосеринлактон также добавляли непосредственно в реакционную смесь без предварительной инкубации. По конститутивному уровню экспрессии щелочной фосфатазы определяли влияние исследуемого соединения на выживаемость клеток [7]. Негативным контролем служила активность щелочной фосфатазы в культуре бактерий, выросших в течение 18 часов без добавления исследуемого вещества, отражающая базовый уровень активности фермента. За единицу активности фермента принимали его количество, вызвавшее увеличение его оптической плотности при длине волны 630 нм на 1 единицу за 1 час.

Определение активности β -галактозидазы у штамма *E. coli PQ 37* в присутствии гомосеринлактона вели по методике *Quillardet* с соавторами [7]. Негативным контролем служила активность β -галактозидазы в культуре бактерий, выросших в течение 12 часов без добавления исследуемого вещества, отражающая базовый уровень активности фермента. Индуцибельный уровень регистрировали в этой же культуре спустя 3 часа после добавления митомидина С. За единицу активности фермента принимали его количество, вызвавшее увеличение его оптической плотности при длине волны 630 нм на 1 единицу за 1 час.

Протеолитическую активность определяли, используя в качестве субстрата казеин. Казеин в концентрации 2% растворяли в 0,1 М Tris-HCl буфере, pH 9,0. В первом опытно-модельном варианте длительность инкубации с исследуемым веществом составляла 18 часов, во втором – 3 часа. Делали смыв культуры *Bacillus subtilis JB20-36* со скошенного агара дистиллированной водой. Затем культуру центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин [8]. 1 мл супернатанта инкубировали 5 мин на водяной бане при 37°C. То же самое проделывали с 1 мл казеина. Затем казеин приливали к супернатанту и тщательно перемешивали. Смесь из 1 мл казеина и 1 мл супернатанта инкубировали 15 мин при 37°C, затем добавляли 2 мл 5%-ной ТХУ, перемешивали и инкубировали при той же температуре еще 20 мин. Смесь пропускали через плотный фильтр. Отбирали 1 мл фильтрата и добавляли к нему 5 мл 6% Na₂CO₃ и 1 мл 0,6н реактива Фолина. Смесь ставили на 20-30 мин в темноту для полного проявления окраски, а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 630 нм на спектрофотометре СФ-34. Параллельно ставили контроль на субстрат следующим образом: смешивали 1 мл супернатанта и 2 мл 5%-ной ТХУ и инкубировали 20 мин при 37°C, после чего добавляли 1 мл 2%-ного казеина и выдерживали еще 15 мин при той же температуре. Смесь фильтровали. С фильтратом поступали как описано выше. За единицу активности фермента принимали его

количество, вызвавшее увеличение его оптической плотности при длине волны 630 нм на 1 ед. за 1 час.

Определение скорости ферментативной реакции с РНКазой проводили на автоматическом спектрометре λ -35. Реакцию проводили в кварцевых кюветах, куда помещали 1.98 мл раствора РНК в буфере (50 мкг/мл), затем добавляли в опытную фермент (0,01 нг/мл) и вещество в исследуемой концентрации в количестве 20 мкл. Затем измеряли светопоглощение реакционной смеси по сравнению с контрольным раствором при длине волны 260 нм. Скорость ферментативной реакции оценивали по тангенсу угла наклона прямолинейного восходящего участка кривой зависимости светопоглощения от времени и выражали в увеличении поглощения за 1 мин на 1 мг белка.

Статистический анализ проводили с использованием стандартных математических методов в компьютерной программе "Microsoft-Excel".

2. Результаты исследования

Известно, что β -галактозидаза штамма *E. coli PQ 37* находится под промотором SOS-оперона и синтезируется в ответ на сигнал, представляющий собой появление одноцепочечной и частично фрагментированной ДНК вследствие действия сильных ДНК-повреждающих агентов [7]. В нашу задачу входило выяснить, может ли гомосеринлактон как сигнальная молекула, вызывающая активацию многих оперонов, включить гены SOS-оперона. Было установлено, что гомосеринлактон, добавленный непосредственно в реакционную смесь, вызывал изменение активности фермента, увеличивая ее в среднем в 5 раз, то есть являлся эффектором белка β -галактозидазы. При этом уровень экспрессии генов SOS-оперона при совместном добавлении гомосеринлактона и митомидина С оставался фоновым, то есть гомосеринлактон блокировал их экспрессию. Увеличение времени инкубации (рисунок 1) должно было бы привести к увеличению биосинтеза β -галактозидазы, если гомосеринлактон является индуктором SOS-оперона.

Однако это не было зарегистрировано, что подтверждается данными SOS-хроматеста об отсутствии индукции SOS-ответа гомосеринлактоном [5]. Отсюда следует, что гомосеринлактон вызывает блокирование экспрессии генов SOS-оперона, но при этом оказывает активирующее влияние непосредственно на активность фермента β -галактозидазы.

Нами была оценена способность гомосеринлактона оказывать влияние на активность щелочной фосфатазы *E. coli PQ 37*, протеазы *B. subtilis JB20-36*, а также РНКазы *B. intermedius*. Эксперименты с щелочной фосфатазой показали, что гомосеринлактон в концентрации 10 мкг/мл не влияет на активность данного фермента, а в концентрации 50 мкг/мл увеличивает ее приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем.

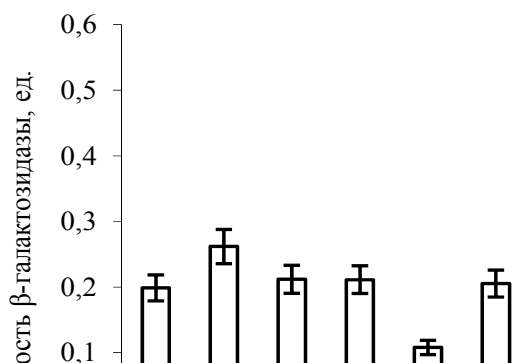


Рис. 1 - Влияние гомосеринлактона на активность β -галактозидазы «+» – инкубация культуры с добавлением митомцина С в течение трех часов

Концентрационно-зависимое повышение активности щелочной фосфатазы при добавлении гомосеринлактона непосредственно в реакционную смесь позволяет судить об исследуемом веществе как о модуляторе фермент-субстратного взаимодействия. При оценке действия гомосеринлактона на биосинтез щелочной фосфатазы время инкубации было увеличено до 18 часов (рис. 2). При обработке клеток гомосеринлактоном в течение 18 часов в концентрации 50 мкг/мл активность щелочной фосфатазы примерно в 3 раза превысила контрольную. Следовательно, гомосеринлактон активирует биосинтез щелочной фосфатазы – конститутивного фермента бактерий.

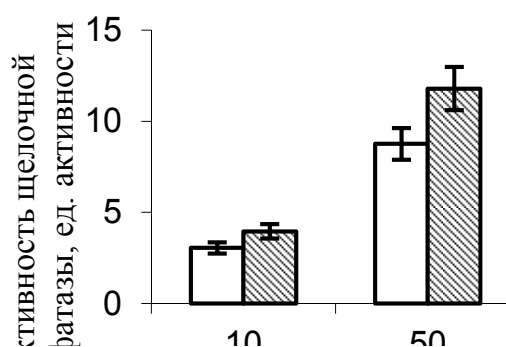


Рис. 2 - Влияние гомосеринлактона на активность щелочной фосфатазы *E. coli* PQ 37

Зависимость активности протеаз от концентрации гомосеринлактона, входившего в состав инкубационной смеси (H_2O , клетки, гомосеринлактон), у *B. subtilis* представлена на рис. 3.

В малых концентрациях (5-10 мкг/мл) гомосеринлактон увеличивал активность протеазы *B. subtilis* в среднем в 2.47 раза. Установлено, что базовый уровень активности протеазы составляет 0.02 единицы, что говорит, вероятно, о низкой интенсивности биосинтеза или секреции данного фермента.

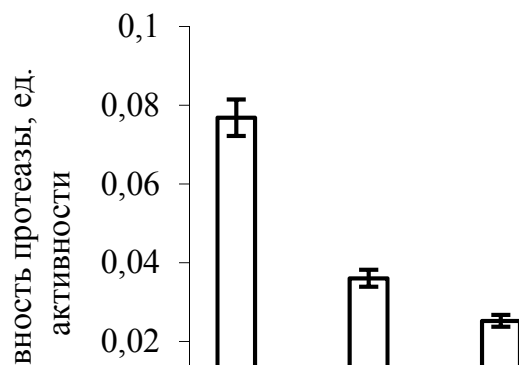


Рис. 3 - Влияние гомосеринлактона на активность протеазы *B. subtilis* JB20-36

Если культуры, находящиеся в конце логарифмической фазы роста, инкубировали 3 часа в присутствии гомосеринлактона, активность протеазы возрастала незначительно. Увеличение времени инкубации с гомосеринлактоном до 18 часов, в течение которых гомосеринлактон постоянно присутствовал в среде, вызывало возрастание активности протеазы; при этом индуцирующая способность гомосеринлактона проявлялась в концентрациях до 10 мкг/мл. Более высокие концентрации снижали активность фермента. Если бы гомосеринлактон усиливал секрецию протеаз, вероятно, с увеличением концентрации активность фермента в среде возрастала бы. Однако этого не наблюдалось (рис. 3). Сравнение динамики ферментативной активности РНКазы *B. intermedius* показало, что для необработанного фермента величина активности, определенная по тангенсу угла наклона прямого участка восходящей кривой зависимости светопоглощения от времени, составила 0,25 единицы (рис. 4).

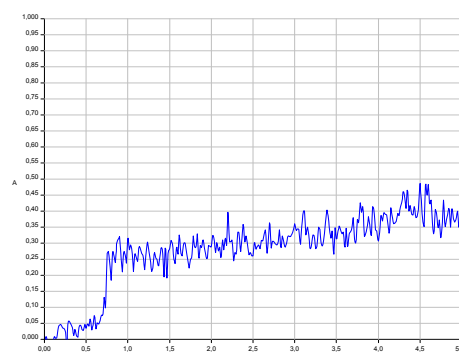


Рис. 4 - Регистрация поглощения продуктов гидролиза дрожжевой РНК биназой в течение 5 минут

При воздействии различных концентраций гомосеринлактона значения активности РНКазы не менялись, что позволяет сделать вывод об отсутствии влияния гомосеринлактона на активность РНКазы в исследуемых концентрациях (10 и 50 мкг/мл). Для удаления высокомолекулярных продуктов гидролиза РНК производили осаждение дрожжевой РНК равным по отношению к реакционной смеси объемом 0.02M

MgCl₂ в 96% этаноле [9], однако изменения количества низкомолекулярных нуклеотидов по сравнению с рисунком 4 не наблюдалось. При длине волны 280 нм (длина волны, соответствующая светопоглощению нуклеотидов) интенсивность светопоглощения не отличалась от контрольных значений в независимости от концентрации гомосеринлактона и времени инкубации.

3. Обсуждение результатов

Таким образом, можно сделать вывод, что плотно-зависимый регулятор гомосеринлактон оказывает влияние на активность некоторых ферментов прокариот (β-галактозидазы, щелочная фосфатаза, протеазы), однако практически не влияет на активность РНКазы. Показано также, что гомосеринлактон активирует биосинтез щелочной фосфатазы – конститутивного фермента бактерий. Пролонгированное действие индуктора, приводящее к возрастанию активности фермента, свидетельствует о влиянии гомосеринлактона на процесс биосинтеза протеаз. Добавление гомосеринлактона непосредственно в реакционную смесь не привело к изменению активности протеаз, что означает отсутствие эффекторных свойств гомосеринлактона по отношению к данному ферменту. Индукция биосинтеза протеолитических ферментов бактерий, показанная нами при действии гомосеринлактона в течение 18 часов при концентрациях 5-10 мкг/мл, позволяет предположить, что эта сигнальная молекула может индуцировать протеолиз белков клеток хозяина при инфекционных заболеваниях.

Недавние исследования *in vitro* показали, что ацилированные лактоны гомосерина могут самостоятельно выступать в качестве факторов вирулентности посредством модификации продукции цитокининов эукариотическими клетками, а также стимуляции расширения кровеносных сосудов. Имеются данные о влиянии гомосеринлактона на сердечно-сосудистые функции крыс. Особое внимание уделяется способности N-(3-оксодеканойл)-L-лактона гомосерина, сигнальной молекулы, продуцируемой *Pseudomonas aeruginosa*, вызывать брадикардию. Более того, модификация длины ацильного радикала приводит к снижению активности, а при удалении гомосеринового лактонного кольца такого не наблюдается. Эти сведения подтверждают гипотезу, что некоторые сердечно-сосудистые осложнения бактериальных инфекций могут быть модулированы влиянием

сигнальных молекул систем "quorum-sensing" на клетки хозяина [10].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК 14.740.11.1040).

Литература

1. Грузина, В.Д. Коммуникативные сигналы бактерий / В.Д. Грузина // Антибиотики и химиотерапия.- 2003.- №48 (10).- С. 32-39.
2. Завильгельский, Г.Б. "Quorum sensing", или как бактерии "разговаривают" друг с другом / Г.Б. Завильгельский, И.В. Манухов // Молекулярная биология.- 2001.- Т.35.- N 2.- С. 268-277.
3. Fuqua, W.C. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators / W.C. Fuqua, S.C. Winans, E.P. Greenberg // J. Bacteriol.- 1994.- V. 176.- P. 269-275.
4. Лещинская, И.Б. Нуклеазы бактерий / И.Б. Лещинская, В.П. Варламов, Б.М. Куриненко // Казань: КГУ.- 1991. - 317 с.
5. Маргулис, А.Б. Генотоксические эффекты микробного сигнального агента – гомосеринлактона / А.Б. Маргулис, О.В. Бушманова, И.В. Ожиганова, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Ученые записки Казанского государственного университета.- Т.148.- Серия Естественные науки.- Кн.2.- 2006.-С.83-89.
6. Маргулис, А.Б. Индукция гипометаболических форм у неспорообразующих грамположительных бактерий / А.Б. Маргулис, О.Н. Ильинская, А.И. Колпаков, К. Муфер // Ученые записки Казанского государственного университета.- Т.147.- Серия Естественные науки.- Кн.2.- 2005.- С.108-114.
7. Quillardet, P. SOS-chromotest, a direct assay of a SOS-function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity / P. Quillardet, O. Huisman, R. D Ari, M. Hofnung // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1982.- V. 79.- P. 5971-5975.
8. Маргулис, А.Б. Влияние хлорпроизводных 2(5H)-фуранона на жизнеспособность бактериальных клеток / А.Б.Маргулис, А.Р.Курбангалиева, Н.В.Белоногова, Л.З.Латыпова, В.Я.Пономарев, Э.Н.Хакимуллина, Е.Ю.Тризна, М.И.Богачев, А.Р.Каюмов // Вестник Казанского технологического университета.- 2012.- Т. 15, №15.- С. 220-224.
9. Колпаков, А.И. Оптимизация метода определения активности РНКазы с использованием высокополимерной РНК / А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Клиническая лабораторная диагностика.- 1999.- N 5.- С.14-16.
10. Gardiner, S.M. Haemodynamic effects of the bacterial quorum sensing signal molecule, N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone, in conscious, normal and endotoxaemic rats / S.M. Gardiner, S.R. Chhabra, C. Harty, P. Williams, D.I. Pritchard, B.W. Bycroft, T. Bennett // Br. J. Pharmacol.- 2001.- N 133(7).- P. 1047-54.

© А. Б. Маргулис - канд. биол. наук, доц. каф. микробиологии КФУ, anna.margulis@ksu.ru; О. В. Сидад - науч. сотр. отделения молекулярной генетики Института биологии университета имени Альберта Людвиг, г. Фрайбург, Olga.Siadat@gmail.com; Е. В. Никитина - канд. биол. наук, доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, ev-nikitina@inbox.ru; А. И. Колпаков - канд. биол. наук, ст. науч. сотр., зав. лаб. НИЛ ББФ КФУ, alexei.kolpakov@ksu.ru; О. Н. Ильинская – д-р биол. наук, зав. каф. микробиологии КФУ, olga.ilinskaya@ksu.ru.