

УДК 579.22

РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ NO И АФК В ОТВЕТЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ НА СИГНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ БАКТЕРИЙ – ГОМОСЕРИНЛАКТОН И ГЕКСИЛРЕЗОРЦИН

А.Б. Маргулис, Д.Р. Яруллина, А.И. Колтаков, О.Н. Ильинская

Аннотация

Бактерии рода *Lactobacillus*, обладающие способностью синтезировать оксид азота (NO) неденитрификационным путем, не индуцируют его синтез в присутствии ауторегуляторных молекул: плотностно-зависимого специфического регулятора гомосеринлактона и неспецифического – гексилрезорцина. Прямыми методами регистрации с использованием флуоресцентных красителей показано, что, в отличие от NO-синтазной активности, содержание активных форм кислорода в клетках лактобацилл при действии исследуемых сигнальных молекул возрастает, причем воздействие гексилрезорцина более выражено по сравнению с действием гомосеринлактона.

Ключевые слова: NO-синтазная активность, АФК, флуоресцентная микроскопия, гомосеринлактон, гексилрезорцин.

Введение

Устойчивость микроорганизмов к стрессовым воздействиям связана с формированием клеточного ответа, в котором участвуют внеклеточные метаболиты популяционного и межпопуляционного действия. Микроорганизмы обладают особой системой регуляции роста и развития, включающей определенные биохимические механизмы, связанные с накоплением и физиологической активностью ауторегуляторных молекул в растущей популяции [1, 2]. Стрессовые условия могут приводить к диссоциации популяции на субпопуляции, различающиеся функционально и морфологически. Этот процесс отчасти зависит от концентрационного уровня и активности различных ауторегуляторных молекул, относящихся у ряда микроорганизмов к алкилрезорцинам [3, 4], а у некоторых – к классу ацильных производных лактона гомосерина. Последние выступают в роли специфических внеклеточных факторов коммуникации – плотностных ауторегуляторов – и используются во внутривидовых взаимодействиях в качестве сигнальных агентов [5, 6]. Алкилрезорцины функционируют как неспецифические естественные модификаторы, изменяющие структуру белковых макромолекул, что приводит к ингибированию каталитической активности ферментов [7, 8].

Стресс у эукариот связан с включением сигнальных путей, в которых участвуют активные формы кислорода (АФК) и оксид азота (NO), обладающие широким спектром биологического действия, включая цитотоксические и цитопротекторные свойства [9]. Более того, являясь одним из мессенджеров, NO участвует в регуляции систем внутри- и межклеточной сигнализации. Он играет

важную роль в реализации таких функций, как нейротрансмиссия, вазодилатация, регуляция тонуса гладких мышц, снижение агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы и др. [9]. Возможен ли аналогичный механизм ответа на стрессовые условия, индуцированные плотностно-зависимыми эффекторами, для прокариот, остается не выясненным.

Ранее нами было установлено наличие у лактобацилл отличного от денитрификационного механизма образования оксида азота (NO) из L-аргинина, при этом NO-синтазный механизм образования NO микроорганизмами данной группы был подтвержден прямыми методами ЭПР и окрашивания NO-чувствительными флуоресцентными красителями [10]. Участвует ли NO-синтаза лактобацилл в ответе на стрессоры, в качестве которых мы выбрали неспецифический индуктор гипометаболического состояния бактерий – гексилрезорцин – и гомосеринлактон, специфический индуктор эффектов кворума, и если да, то как реализуется механизм ответа? Разрешение поставленных вопросов явилось целью настоящей работы.

Необходимо отметить, что использование лактобацилл в производстве пробиотических препаратов интенсивно растет. Микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, не патогенны, не токсичны, содержатся в достаточном количестве, сохраняют жизнеспособность при прохождении через желудочно-кишечный тракт и при хранении [11], однако для уточнения свойств и возможных физиологических изменений микроорганизмов, входящих в состав пробиотиков, необходимы разработка и использование моделей *in vitro* и *in vivo* [12]. Моделирование стресса с учетом потенциальной регуляторной роли оксида азота открывает новые возможности для улучшения целевых функций этих промышленно важных микроорганизмов.

В связи с вышеизложенным мы провели прямую флуоресцентную регистрацию NO-синтазной активности и определение содержания внутриклеточных активных форм кислорода, как показателя перехода клеток в некультивируемое состояние, у представителей рода *Lactobacillus* при действии сигнальных ауторегуляторных молекул – гомосеринлактона и гексилрезорцина.

1. Постановка задачи

В работе использовали бактерии *L. plantarum* № 8P-A3 препарата «Лактобактерин сухой», произведенного ФГУП «Пермское НПО «Биомед», коллекционный штамм *L. fermentum* AL1, любезно предоставленный ИБФМ РАН им. Г.К. Скрябина, и коммерческий штамм *L. plantarum* № 52, полученный из Санкт-Петербургского НИИ сельскохозяйственной микробиологии РАСХН. Содержимое одного флакона препарата «Лактобактерин сухой» растворяли в 25 мл среды МРС с pH 6.2–6.6, содержащей следующие компоненты (г/л дистиллированной воды): дрожжевой экстракт – 5, мясной экстракт – 10, Vasto-Pepton – 10, глюкоза – 20, аммоний лимоннокислый – 2, натрий уксуснокислый – 5, цистеин HCl – 0.4, твин 80 – 1, K₂HPO₄ – 2, MgSO₄ · 7H₂O – 0.2, MnSO₄ · H₂O – 0.04, сорбиновая кислота – 0.4. Суспензию инкубировали в колбах объемом 100 мл, содержащих 25 мл среды, в течение 24 ч при 37 °С, после чего высевали колонии на агаризованной среде МРС. В качестве посевного материала использовали отдельные колонии бактерий.

В качестве микробных сигнальных молекул использовали 4*n*-гексилрезорцин (Sigma, М.м. = 196) и неацелированный гомосеринлактон (Aldrich, М.м. = 182) – общий структурный элемент плотностно-зависимых регуляторов физиологического состояния бактерий – в концентрациях 50 мкг/мл.

Для экспериментов по определению NO с помощью флуоресцентных красителей культуры *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52, выращенные на среде ВНИ (Brain Heart Infusion) (Sigma) до стационарной фазы роста (10^7 кл/мл), отмывали от среды Hanks' буфером с кальцием и магнием (PAA Laboratories GmbH) и концентрировали центрифугированием. NO определяли с помощью NO-чувствительных флуоресцентных красителей: позволяющего визуализировать только внутриклеточный NO диацетильного производного 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA) (Molecular Probes) и детектирующего весь оксид азота пробы 1,2-диаминоантрахинона (DAA) (Molecular Probes) в концентрациях 10 мкМ и 10 мкг/мл соответственно. Внутриклеточные АФК окрашивали с помощью Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (Molecular Probes). Основным действующим агентом реактива является диацетильное производное 5,6-карбокسي-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (карбокسي- H_2DCFDA), которое использовали в концентрации 25 мкМ.

Бактерии ресуспендировали в Hanks' буфере с добавлением флуоресцентных красителей и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч в случае DAF-FM DA и DAA и 30 мин в случае карбокسي- H_2DCFDA . В вариантах с сигнальными молекулами добавляли гексилрезорцин и гомосеринлактон в концентрации 50 мкг/мл и окрашивали по той же методике. В контрольном варианте исследуемые микроорганизмы инкубировали в буфере, не содержащем красителей. По истечении срока инкубации клетки отмывали от красителей буфером, готовили препараты и микроскопировали под флуоресцентным микроскопом Leica DM 6000B (Германия), оборудованным набором соответствующих фильтров. В экспериментах по изучению синтеза NO использовали флуоресцентный инвертированный микроскоп Leica DMIRE2 (Германия) (объективы 10×, 20×, 40×; Leica, Германия). Полученные изображения флуоресцентного сигнала анализировали с помощью компьютерной программы Leica FW4000.

2. Результаты и их обсуждение

Известно, что бактерии рода *Lactobacillus* не образуют NO в процессе денитрификации, однако обладают, подобно клеткам млекопитающих, NO-синтазным механизмом образования оксида азота из L-аргинина [10]. Наличие оксида азота в штаммах *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52 было показано нами ранее методом флуоресцентного окрашивания и микроскопии, в основе которого лежит использование специальных NO-чувствительных соединений (флуорофоров), способных взаимодействовать с NO с образованием флуоресцирующего комплекса [10].

Мы установили, что при действии гексилрезорцина и гомосеринлактона в нетоксичной концентрации 50 мкг/мл активность NO-синтазы у обоих исследуемых штаммов лактобацилл достоверно не изменялась. При одинаковой плотности клеток (на стационарной фазе роста) и одинаковых концентрациях флуорофоров клетки *L. fermentum* AL1 окрашены слабее, чем *L. plantarum*

№ 52, следовательно, содержание NO, а значит и NO-синтазная активность, в них ниже по сравнению с *L. plantarum* № 52, что подтверждает данные, полученные ранее [10]. Тем не менее для обоих штаммов лактобацилл сигнальные молекулы не вызывали индукции активности NO-синтазы.

Результаты окрашивания флуоресцентными индикаторами NO DAF-FM DA (для определения содержания общего оксида азота) и DAA (для определения внутриклеточного NO клеток *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52) свидетельствуют о том, что в исследуемых бактериях определенно присутствует оксид азота, однако его количество практически одинаково в вариантах с обработкой клеток сигнальными молекулами и без нее. Отсутствует также различие в интенсивности окрашивания общего и внутриклеточного NO, что свидетельствует о внутриклеточной локализации оксида азота и, возможно, отсутствии межклеточных функций в бактериальной популяции (рис. 1, 2).

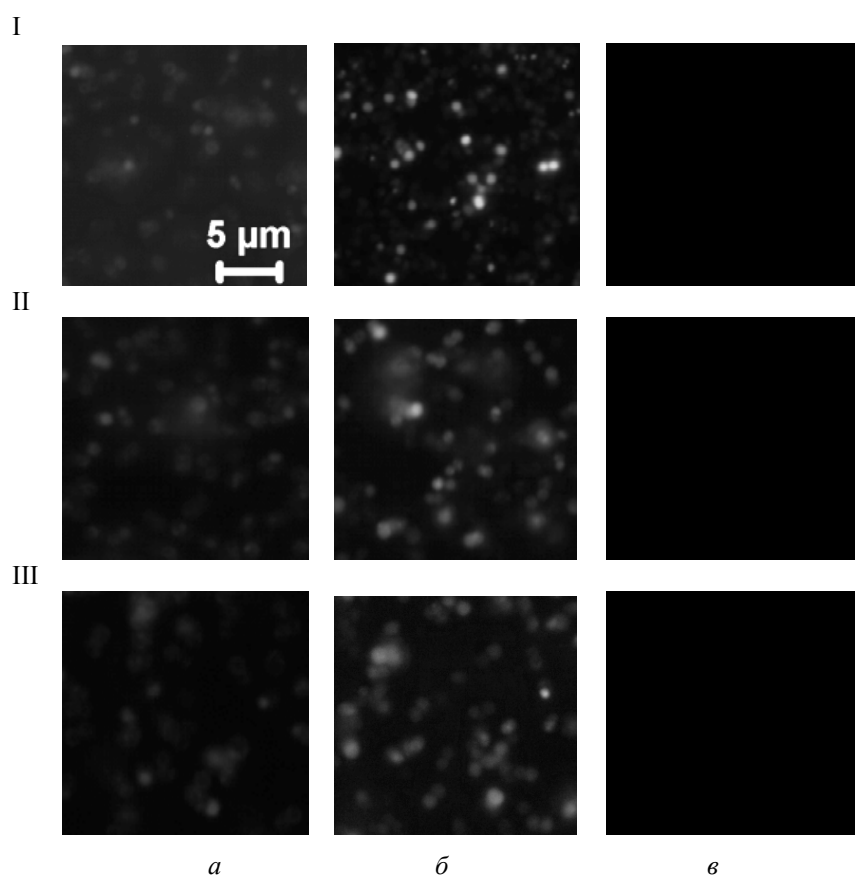


Рис. 1. Визуализация оксида азота в культуре *Lactobacillus fermentum* AL1 (I – без обработки, II – обработанной гексилрезорцином (50 мкг/мл), III – обработанной гомосеринлактоном (50 мкг/мл)) при флуоресцентном окрашивании: а – окраска 1,2-диаминоантрахиноном (DAA), б – окраска диацетильным производным 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA), в – без окрашивания)

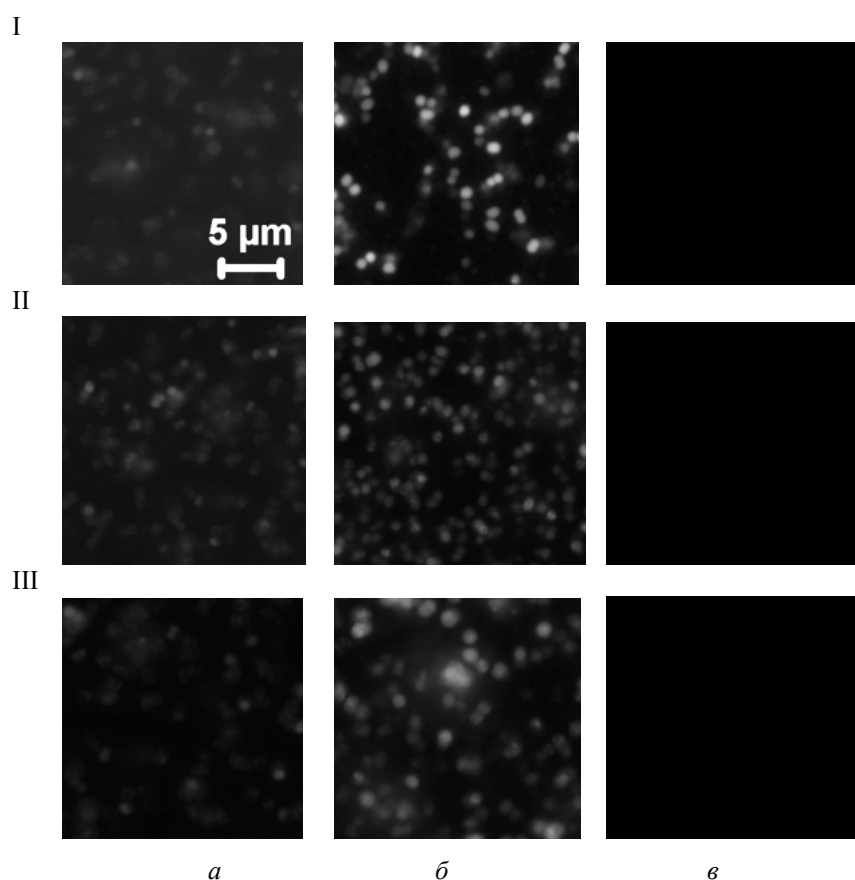


Рис. 2. Визуализация оксида азота в культуре *Lactobacillus fermentum* № 52 (I – без обработки, II – обработанной гексилрезорцином (50 мкг/мл), III – обработанной гомосеринлактоном (50 мкг/мл)) при флуоресцентном окрашивании: а – окраска 1,2-диаминоантрахиноном (DAA), б – окраска диацетильным производным 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA), в – без окрашивания

В то же время АФК, способствующие, как известно, образованию некультивируемых форм в бактериальных популяциях [13], количественно возрастают при обработке клеток обоих исследуемых штаммов лактобацилл гексилрезорцином – индуктором гипометаболических процессов у бактерий (рис. 3). Наблюдали также и увеличение содержания АФК в клетках лактобацилл, обработанных гомосеринлактоном, хотя и меньшее, чем в варианте с гексилрезорцином (рис. 3).

У животных АФК индуцируют апоптоз, а низшие эукариоты – дрожжи – погибают при воздействии пероксида водорода даже в низких концентрациях, что связано с истощением внутриклеточного фонда нейтрализующего АФК агента – глутатиона [14]. Вероятно, что переход клеток любого эволюционного уровня в иное физиологическое состояние происходит с участием АФК. Это предположение хорошо согласуется с уже известным фактом перехода ряда бактерий в гипометаболическое состояние при действии гексилрезорцина [1, 4, 15].

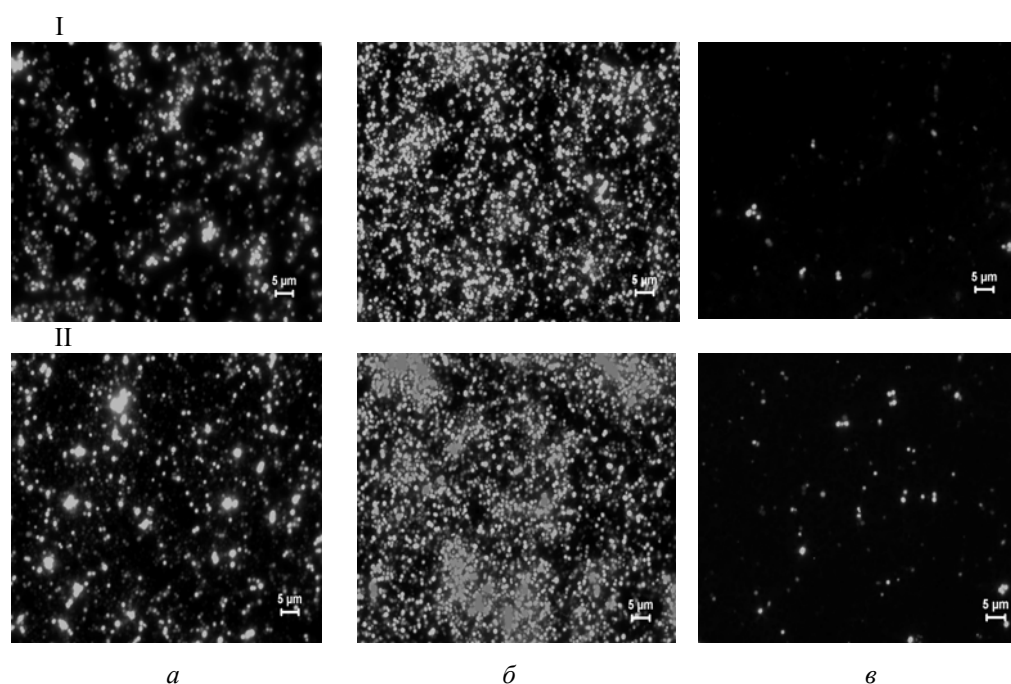


Рис. 3. Визуализация АФК флуоресцентным окрашиванием карбокси- H_2DCFDA в культурах *Lactobacillus fermentum* AL1 (I) и *Lactobacillus fermentum* № 52 (II): *a* – при действии гомосеринлактона (50 мкг/мл), *б* – при действии гексилрезорцина (50 мкг/мл), *в* – без добавления веществ

Более того, известно, что и гомосеринлактон в концентрации 50 мкг/мл способствует переходу неспорных бацилл, в частности Sp00E-мутантов, в гипометаболическое состояние [16]. Таким образом, одной из причин такого перехода может являться индукция внутриклеточных АФК на начальных этапах воздействия исследуемых сигнальных молекул на микробные клетки.

Мы предполагаем, что молекула оксида азота играет в данном случае регуляторную роль переключателя в триггерном механизме перехода клетки в гипометаболическое состояние и не образуется в значительных количествах, как это происходит при токсическом стрессе. Взаимодействие NO с АФК, например с радикальным анионом (O_2^-) супероксида, приводит к образованию сильного окислителя, очень реакционного и токсичного свободнорадикального соединения пероксинитрита (ONOO^-), который, подобно другим биологическим окислителям, наносит серьезный вред бактериальным клеткам [17]. Это означает, что переход в гипометаболическое состояние микроорганизмов, способных к ферментативному синтезу оксида азота, в частности исследуемых штаммов лактобацилл, может повлечь за собой каскад необратимых изменений, в том числе генетических повреждений. Эту возможность определенно необходимо учитывать при проведении процедур пробуждения и реверсии гипометаболических форм в активное вегетативное состояние.

Вероятно, чтобы избежать собственной гибели при взаимодействии больших количеств NO с АФК, клетка значимо не повышает синтез оксида азота при действии регуляторных молекул, а сдерживает его на уровне спонтанного

фона. Такая регуляция значительно снижает риск возникновения токсичных свободнорадикальных соединений и, соответственно, обеспечивает переход клетки в состояние покоя с минимальными нежелательными последствиями.

Авторы выражают благодарность К. Бойерляйну (Институт фармакологии Университета г. Гиссен, Германия) за постановку и обсуждение экспериментов с флуоресценцией.

Работа выполнена в рамках программы «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.1005 и госконтракта «ФЦКП КГУ» 02.451.11.7019.

Summary

A.B. Margulis, D.R. Yarullina, A.I. Kolpakov, O.N. Ilinskaya. The Role of Endocellular NO and ROS in Response of Lactobacilli to Signal Molecules of Bacteria – Homoserine Lactone and Hexylresorcinol.

Lactobacilli possessing the ability to synthesise oxyd of nitrogen (NO) by nondenitrification way do not induce its synthesis under the action of autoregulatoric molecules – a quorum-dependent specific regulator homoserine lactone and nonspecific hexylresorcinol. By direct methods of registration with the use of fluorescent dyes it is shown that, unlike NO synthase activity, the maintenance of active forms of oxygen in Lactobacilli increases under action of investigated signal molecules and the effect of hexylresorcinol is more expressed in comparison with homoserine lactone.

Key words: NO synthase activity, ROS, fluorescent microscopy, homoserine lactone, hexylresorcinol.

Литература

1. Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Бабусенко Е.С., Козлова А.Н., Дужа М.В., Митюшина Л.А., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм в автолизующихся суспензиях микроорганизмов // Микробиол. – 1997. – Т. 66, № 1. – С. 42–49.
2. Mamson M.D., Armitage J.D., Hoch J.A., Macnab R.M. Bacterial locomotion and signal transduction // J. Bacteriol. – 1998. – V. 180, No 5. – P. 1009–1022.
3. Осипов Г.А., Эль-Регистан Г.И., Светличный В.А., Козлова А.Н., Дуда В.И., Капрельяню А.С., Помазанов В.В. О химической природе ауторегуляторного фактора d *Pseudomonas carboxydoflava* // Микробиол. – 1985. – Т. 54, № 2. – С. 186–190.
4. Мулюкин А.Л., Демкина Е.В., Козлова А.Н., Соина В.С., Эль-Регистан Г.И. Синтез аутоиндукторов анабиоза у неспорообразующих бактерий как механизм регуляции их активности в почве и подпочвенных осадочных породах // Микробиол. – 2001. – Т. 70, № 5. – С. 620–628.
5. Salmond G.P.C., Bycroft B.W., Stewart G.S.A.B., Williams P. The bacterial “enigma”: cracking the code of cell-cell communication // Mol. Microbiol. – 1995. – V. 16, No 4. – P. 615–624.
6. Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176, No 2. – P. 269–275.
7. Вострокнутова Г.Н., Капрельяню А.С., Светличный В.А., Эль-Регистан Г.И., Шевцов В.В., Островский Д.Н. Мембраноактивные свойства препарата из культураль-

- ной жидкости бактерий, обладающего ауторегуляторным действием // Прикл. микробиол. и биохимия. – 1983. – Т. 19, Вып. 4. – С. 547–551.
8. *Ненашев Е.А., Придачина Н.Н., Эль-Регистан Г.И., Золотарева И.Н., Батраков С.Г.* Действие ауторегуляторов анабиоза некоторых микроорганизмов на дыхание митохондрий печени крысы // Биохимия. – 1994. – Т. 59, Вып. 1. – С. 1511–1515.
 9. *Fuller R., Gibson G.R.* Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health // Clin. Microbiol. Infect. – 1998. – V. 4. – P. 477–480.
 10. *Яруллина Д.Р., Силкин Н.И., Зверев Д.Г., Аганов А.В.* Идентификация NO-синтазной активности у лактобацилл методами ЭПР-спектроскопии и флуоресцентного окрасивания // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2006. – Т. 148, кн. 1. – С. 57–70.
 11. *Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.* Nitric oxide synthases: structure, function, inhibition // Biochem. J. – 2001. – V. 357. – P. 593–615.
 12. *Dominguez-Bello M.G., Blaser M.J.* Do you have a probiotic in your future? // Microbes Infect. – 2008. – V. 10, No 9. – P. 1072–1076.
 13. *Hochman A.* Programmed cell death in prokaryotes // Crit. Rev. Microbiol. – 1997. – V. 23, No 3. – P. 207–214.
 14. *Madeo F., Fröhlich E., Ligr M., Grey M., Sgrist S.J., Wolf D.H., Fröhlich K.-U.* Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast // J. Cell Biol. – 1999. – V. 145, No 4. – P. 757–767.
 15. *Маргулис А.Б., Бушманова О.В., Ожиганова И.В., Колпаков А.И., Ильинская О.Н.* Адаптивный ответ стафилококков на действие микробных факторов индукции анабиоза // Вестн. ТО РЭА. – Казань, 2004. – № 1. – С. 41–44.
 16. *Маргулис А.Б., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Муффер К.* Индукция гипометаболических форм у неспорообразующих грамположительных бактерий // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2005. – Т. 147, кн. 2. – С. 108–114.
 17. *Сосунов А.А.* Оксид азота как межклеточный посредник // Соросовский образов. журн. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 27–34.

Поступила в редакцию
15.05.08

Маргулис Анна Борисовна – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Anna.Margulis@ksu.ru

Яруллина Дина Рашидовна – кандидат биологических наук, ассистент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: yadinka@mail.ru

Колпаков Алексей Иванович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий НИЛ биосинтеза и биоинженерии ферментов Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Alexei.Kolpakov@ksu.ru

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru