

УДК 579.22

ИДЕНТИФИКАЦИЯ NO-СИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У ЛАКТОБАЦИЛЛ МЕТОДАМИ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОКРАШИВАНИЯ

Д.Р. Яруллина, О.Н. Ильинская, Н.И. Силкин, Д.Г. Зверев, А.В. Аганов

Аннотация

Изучена способность бактерий рода *Lactobacillus* синтезировать оксид азота (NO). Методом ЭПР-спектроскопии и флуоресцентного окрашивания показано, что изучаемые микроорганизмы обладают NO-синтазной активностью. Установлено, что у данных бактерий отсутствует активность фермента нитритредуктаза. Впервые установлено, что бактерии *L. plantarum* № 8P-A3 не образуют NO в процессе денитрификации, однако обладают, подобно клеткам млекопитающих, NO-синтазным механизмом образования оксида азота из L-аргинина. Предполагается, что NO-синтаза лактобацилл связана с цитоплазматической мембраной. Подчеркнуто значение исследований регуляторной роли NO у бактерий-симбионтов.

Введение

Оксид азота (NO) обладает широким спектром биологического действия. 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, состояние памяти и др. Наряду с регуляторными функциями NO также присущи цитотоксические, цитостатические и многие другие свойства. Синтез оксида азота в организме человека и животных осуществляется в результате окисления аминокислоты L-аргинина с помощью семейства ферментов, определяемых как NO-синтазы (NOS). Идентифицировано три изоформы этого фермента – нейрональная (NOS-I, или nNOS), индуцибельная (NOS-II, или iNOS) и эндотелиальная (NOS-III, или eNOS). Функционально выделяют конститутивные и индуцибельные NO-синтазы. nNOS и eNOS постоянно присутствуют в клетках и относятся к конститутивным NOS, вторая изоформа NO-синтазы синтезируется в ответ на определенное внешнее воздействие на клетку и является индуцибельной. После экспрессии iNOS образует в 100–1000 раз большие, чем конститутивные NO-синтазы, количества оксида азота [1].

До последнего времени взаимодействие оксида азота и бактерий рассматривалось исключительно с точки зрения антимикробного действия продуцируемого макрофагами NO, основанного прежде всего на подавлении процессов клеточного деления и энергетического обмена через ингибирование синтеза ДНК и белков электронно-транспортной цепи [2]. Сегодня точно известно, что некоторые бактерии, подобно клеткам эукариот, способны синтезировать оксид

азота при участии фермента NO-синтаза. Ферментативная реакция окисления L-аргинина до L-цитруллина и NO у этих бактерий не имеет ничего общего с традиционным для прокариот NO-продуцирующим процессом – денитрификацией [3]. Бактериальные NO-синтазы, функционально гомологичные NOS млекопитающих, впервые были обнаружены и изучены у микроорганизмов рода *Nocardia* [4, 5]. Позднее в геномах таких бактерий, как *Bacillus subtilis* [6], *Staphylococcus aureus* [7], *Deinococcus radiodurans* [8], *B. halodurans* [9], были обнаружены гены, кодирующие протеины, гомологичные оксигеназному домену NOS млекопитающих. Это отчасти подтвердило полученные ранее данные об NO-синтазной активности клеточных экстрактов бактерий [4, 10].

У *Lactobacillus plantarum* и *L. fermentum* предполагается наличие NO-синтазы [11, 12]. Об активности NO-синтазы судят по включению ^{15}N из аргинина в общий состав окисленных форм азота (TON: total oxidised nitrogen) [12]. Однако у бактерий обнаружен метаболический путь, в ходе которого из L-аргинина с помощью фермента L-аргининдеиминаза образуется NH_4^+ , который затем окисляется до TON в процессе нитрификации [13]. Кроме того, NO является интермедиатом денитрификации [3]. Поэтому выводы о наличии у *L. plantarum* и *L. fermentum* NO-синтазы, основанные на данных по включению ^{15}N в состав TON, а также полученные без учета нитратредукции, должны быть подтверждены другими методами. Интенсивное использование лактобацилл в производстве пробиотических препаратов, а также известная регуляторная роль оксида азота стимулируют развитие этих методов и открывают новые перспективы для изучения способности этих промышленно важных микроорганизмов синтезировать NO.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилась регистрация NO-синтазной активности у представителей рода *Lactobacillus* методами ЭПР-спектроскопии и флуоресцентного окрашивания.

1. Материалы и методы исследования

В работе использовали бактерии *L. plantarum* № 8P-A3 препарата «Лактобактерин сухой», произведенного ФГУП «Пермское НПО «Биомед», коллекционный штамм *L. fermentum* AL1, любезно предоставленный Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 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-Perpton – 10, глюкоза – 20, аммоний лимоннокислый – 2, натрий уксуснокислый – 5, цистеин HCl – 0.4, твин 80 – 1, K_2HPO_4 – 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.04, сорбиновая кислота – 0.4. Суспензию инкубировали в колбах объемом 100 мл, содержащих 25 мл среды, в течение 24 ч при 37°C, после чего высевали колонии на агаризованной среде МРС. В качестве посевного материала использовали отдельные колонии бактерий.

Для определения способности к денитрификации культуры лактобацилл выращивали 7 суток при 37°C на среде МРС с добавлением 1% KNO_3 (в/о), раз-

литой в пробирки высоким столбиком. Нитриты обнаруживали в культуральной жидкости спектрофотометрически с помощью реактива Грисса. Концентрацию нитритного азота в пробах определяли по калибровочной кривой. Калибровочные растворы готовили из рабочего раствора NaNO_2 100 мг/л путем последовательных разведений в концентрациях 0–100 мкг/л. Измеряли оптическую плотность при $\lambda = 543$ нм на спектрофотометре СФ-26 [14]. Газообразные продукты денитрификации обнаруживали по накоплению газа в поплавке. Нитраты определяли пробой с дифениламином и концентрированной серной кислотой [15].

Для ЭПР-исследования *L. plantarum* № 8P-A3 выращивали на глюкозо-пептонной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 5, пептон – 10, NaCl – 5. Для подготовки ЭПР-образцов 30 мл культуры на стадии стационарного роста осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин. Клетки трижды отмывали от среды 50 мМ *трис*-HCl-буфером, pH 7.2, и концентрировали до 0.1 мл центрифугированием.

На способность формировать с оксидом азота, продуцируемым *L. plantarum* № 8P-A3, комплексы, детектируемые методом ЭПР, исследовали аскорбиновую кислоту (AA), дающую с NO характерный сигнал ЭПР с *g*-фактором около 2.02 [16] и комплекс диэтилдитиокарбамата (DETC) с Fe^{2+} ($\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$) с характерной линией при $g = 2.035$ [17]. Для изучения способности железосерных центров белков лактобацилл образовывать с оксидом азота нитрозильные комплексы проведено ЭПР-исследование проб, не содержащих экзогенных ловушек NO [18].

Опытный вариант для NO-синтазы содержал L-аргинин и NADPH в конечных концентрациях 20 мМ. Опытный вариант для нитритредуктазы содержал KNO_3 в конечной концентрации 20 мМ. Контрольный вариант отличался отсутствием бактерий. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 0.5–1 ч, после чего регистрировали спектры ЭПР на спектрометре Bruker ESP-300 (Германия) при температуре жидкого азота, микроволновой мощности 50 мВт, амплитуде модуляции 1 Гс. Для регистрации NO в процессе денитрификации реакционную смесь выдерживали в анаэробных условиях в атмосфере углекислого газа.

Для нахождения количества образовавшегося нитрозильного комплекса $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ в исследуемых образцах определяли зависимость интегральной интенсивности сигнала модельного комплекса бис(N,N-диэтилдитиокарбамата)меди (II) ($\text{Cu}^{2+}(\text{DETC})_2$) от его концентрации. На первом этапе работы осуществляли синтез $\text{Cu}^{2+}(\text{DETC})_2$. Для этого к водному раствору 0.05 моля $\text{Et}_4\text{NCS}_2\text{Na}$ в 100 мл воды добавляли по каплям при перемешивании 25 мл слегка подкисленного раствора 0.025 моля CuSO_4 . Выпавший черный осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. После перекристаллизации из CCl_4 выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали CCl_4 и высушивали. Для получения калибровочной зависимости относительной интегральной интенсивности линий ЭПР от содержания меди (II) готовили серию растворов различной концентрации $\text{Cu}^{2+}(\text{DETC})_2$ в толуоле. Использовали перегнаный толуол, который высушивался и хранился над молекулярными ситами 4Å. Базовый раствор готовили путем продолжительного растворения точной навески

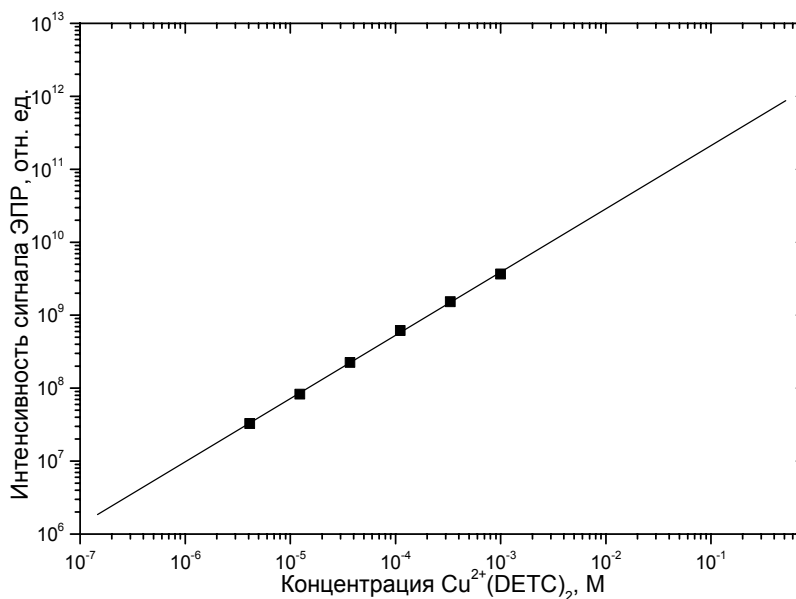


Рис. 1. Зависимость интегральной интенсивности сигнала комплекса $\text{Cu}^{2+}(\text{DETC})_2$ от его концентрации

кристаллов $\text{Cu}^{2+}(\text{DETC})_2$ в фиксированном объеме толуола в плотно закупоренной посуде. Остальные растворы получали из базового последовательным разбавлением и использовали в свежеприготовленном состоянии. Концентрации $\text{Cu}^{2+}(\text{DETC})_2$ в калибровочной серии изменялись от 10^{-3} моль/л до 10^{-6} моль/л. Все полученные растворы замораживались при температуре жидкого азота для получения спектров ЭПР. Зависимость интегральной интенсивности линии с $g = 2.005$ от концентрации использовали для расчета концентрации комплекса $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$ (рис. 1).

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, 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 100 мкг/мл соответственно. Бактерии ресуспендировали в Hanks' буфере с добавлением флуоресцентных красителей и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. В контрольном варианте исследуемые микроорганизмы инкубировали в буфере, не содержащем красителей. По истечении срока инкубации клетки отмывали от красителей буфером и микроскопировали под флуоресцентным микроскопом Leica DMIRE2 (Германия).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы "Microsoft Excel".

2. Результаты и обсуждение

Основная задача нашей работы была связана с определением методом ЭПР оксида азота у лактобацилл. Этому предшествовал подбор подходящей химической ловушки, которая связывает NO, образуя стабильные парамагнитные нитрозильные комплексы, детектируемые методом ЭПР. Использование в качестве спиновой ловушки NO аскорбиновой кислоты не приводило к формированию ЭПР-определяемого сигнала нитрозильного комплекса Fe^{2+} -AA-NO с $g = 2.02$. В спектре ЭПР пробы, не содержащей экзогенных ловушек NO, сигнала от комплекса NO с железосерными центрами белков с $g = 2.03$ также не обнаружили. При инкубации клеток *L. plantarum* № 8P-A3 с 30 мМ DETC наблюдался характерный для моонитрозильного комплекса $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}$ -NO ЭПР-сигнал в виде триплета с четко различимой сверхтонкой структурой и с положением центральной линии при $g = 2.035$ (рис. 2).

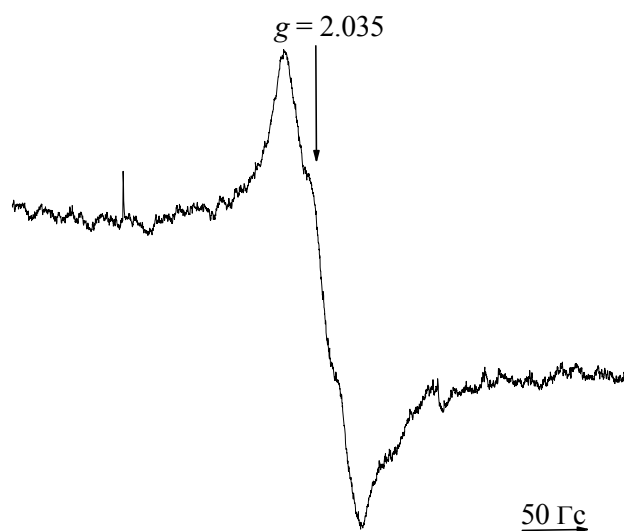


Рис. 2. Спектр ЭПР клеток *L. plantarum* № 8P-A3, зарегистрированный с использованием комплекса $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ в качестве спиновой ловушки NO. Запись проводили при -196°C , частоте микроволнового излучения 9,4 ГГц, микроволновой мощности 50 мВт и амплитуде модуляции 1 Гс

Таким образом, среди исследованных спиновых ловушек NO (аскорбиновая кислота, $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$, железосерные центры белков лактобацилл) в качестве наиболее подходящей для улавливания оксида азота бактериального происхождения отобран комплекс $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$. Недостатком данного комплекса в качестве спиновой ловушки является его низкая растворимость в воде [19]. Тем не менее, использование в настоящем исследовании водорастворимого аналога DETC N-метил-D-глюкаминдителиокарбамата (MGD) представляется нецелесообразным, поскольку комплекс $\text{Fe}^{2+}(\text{MGD})_2$ не обладает специфичностью в отношении NO. Кроме того, комплекс $(\text{DETC})_2\text{-Fe}^{2+}$ -NO значительно более стабильный, чем $(\text{MGD})_2\text{-Fe}^{2+}$ -NO [17].

Основным источником оксида азота в мире прокариот долгое время считали денитрификацию. В этом процессе NO образуется при восстановлении нитрита ферментом нитритредуктазой (NIR), а затем восстанавливается до N_2O . Избежать токсического эффекта активных форм азота, образующихся из NO, например, пероксинитрита, бактериям-денитрификаторам позволяет тонко регулируемая последовательная работа ферментов нитрит- и NO-редуктаз, благодаря которой концентрация NO в клетках поддерживается на постоянном наномолярном уровне [20]. Для того чтобы исключить возможность нитритредуктазного происхождения регистрируемого методом ЭПР оксида азота, *L. plantarum* № 8P-A3, *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52 исследовали на способность к денитрификации. После 7 дней инкубации в культуральной жидкости *L. plantarum* № 8P-A3 нитриты обнаружены в следовых количествах порядка 6–7 мкг/л, *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52 не восстанавливали добавленные в среду культивирования нитраты до нитритов. Накопление газа в поплавке не происходило ни в одной из проб, что свидетельствует об отсутствии образования газообразных продуктов денитрификации, а именно N_2O и N_2 . Отметим, что NO, как интермедиат денитрификации, в данной смеси газов накапливаться не может вследствие высокой токсичности. Таким образом, при изучении способности к денитрификации было установлено, что *L. plantarum* № 8P-A3, *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52 не способны вести полный процесс денитрификации. Среди исследованных штаммов бактерий только *L. plantarum* № 8P-A3 проявлял способность восстанавливать нитраты до нитритов. Это согласуется с данными литературы о наличии у лактобацилл нитратредуктазы [13].

Наличие оксида азота в *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52 было показано методом флуоресцентного окрашивания и микроскопии, в основе которого лежит использование специальных NO-чувствительных соединений (флуорофоров), способных взаимодействовать с NO с образованием флуоресцирующего комплекса. Данный метод сочетает высокую чувствительность порядка 2–5 нМ, специфичность и простоту реализации. Наряду с этим он позволяет непосредственно визуализировать оксид азота в местах его образования, оценить пространственные и временные аспекты синтеза и распределения NO [21]. Используемый в настоящем исследовании индикатор NO диацетат 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA), разработанный группой Nagano, способен проникать в клетку (пассивная диффузия через клеточную мембрану), где он под действием внутриклеточных эстераз деацетируется и переходит в непроницаемую для клеточных мембран форму 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM). DAF-FM не флуоресцирует, пока не прореагирует с NO в присутствии кислорода с образованием триазофлуоресцеина (DAF-2T) с максимумами возбуждения флуоресценции и излучения около 495 нм и около 515 нм соответственно [22]. Таким образом, DAF-FM DA не позволяет визуализировать внеклеточный NO.

Для экспериментов, направленных на изучение пространственного распределения NO, используется флуоресцентный индикатор NO нового поколения 1,2-диаминоантрахинон (DAA). Темно-фиолетовый DAA не имеет автофлуоресценции. Его взаимодействие с NO ведет к образованию водонерастворимого

и флуоресцирующего красным 1H-антра-[1,2d]-[1,2,3]-триазоль-6,11-диона (ATD), который может быть легко визуализирован под флуоресцентным микроскопом с использованием родаминового фильтра ($\lambda > 580$ нм) [23].

Окрашивание флуоресцентными индикаторами NO DAF-FM DA и DAA клеток *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52, результаты которого представлены на рис. 3, свидетельствует о том, что в исследуемых бактериях присутствует оксид азота. Следует отметить, что при одинаковой плотности клеток и одинаковых концентрациях флуорофоров клетки *L. fermentum* AL1 окрашены слабее, чем *L. plantarum* № 52, следовательно, содержание NO в них ниже по сравнению с *L. plantarum* № 52. Последнее означает, что из двух исследованных методом флуоресцентного окрашивания штаммов лактобацилл NO-синтазная активность сильнее выражена у *L. plantarum* № 52.

Наличие флуоресцентных сигналов в случае использования обоих красителей свидетельствует о том, что и DAF-FM DA, и DAA пригодны для визуализации оксида азота бактерий. Для *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52 наблюдали сходное пространственное распределение NO. Однако следует подчеркнуть, что для двух используемых индикаторов NO наблюдаемая при микроскопии препаратов лактобацилл картина отличалась. На рис. 3, а видно, что у некоторых клеток, обработанных DAA, под микроскопом флуоресцирует только примембранная область. Оставшаяся часть клеток аналогично клеткам, окрашенным DAF-FM DA, флуоресцирует полностью (рис. 3). По-видимому, бактерии, находящиеся на разных этапах клеточного цикла, различаются по внутриклеточному распределению оксида азота.

Наличие флуоресцентного сигнала в примембранной области клеток исследуемых лактобацилл позволяет предположить, что NO-синтаза у них связана с мембраной. Известно, что в активном состоянии все изоформы NOS представляют собой димеры, образованные двумя идентичными субъединицами. Субъединицы состоят из двух доменов: N-терминального каталитического оксигеназного домена, связывающего протопорфирин IX (гем), тетрагидробиоптерин (H₄B) и субстрат L-аргинин, и C-терминального электрон-поставляющего редуктазного домена. Редуктазный домен осуществляет перенос электронов от восстановительного субстрата – никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) по цепи электронов, включающей флавинадениндинуклеотид и флавинмононуклеотид (FAD и FMN), на оксигеназный домен [1]. Выделенная из *Nocardia* sp. и очищенная бактериальная NO-синтаза также проявляла потребность в NADPH, FAD и FMN [5]. Однако в NOS-подобных белках *S. aureus*, *D. radiodurans* и некоторых других бактерий C-терминальный редуктазный домен, отвечающий за связывание NO-синтазы с FMN, FAD и NADPH и поставляющий электроны на N-терминальный оксигеназный домен, в котором происходит каталитическая реакция NADPH- и O₂-зависимого окисления L-аргинина до цитруллина и NO, отсутствует [24, 25]. Поскольку прокариотические клетки не содержат цитозольных мембранных структур, транспорт электронов осуществляется в них на цитоплазматической мембране. Можно предположить, что именно это обуславливает примембранное положение зависимой от восстановленных кофакторов NO-синтазы в исследуемых клетках *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52.

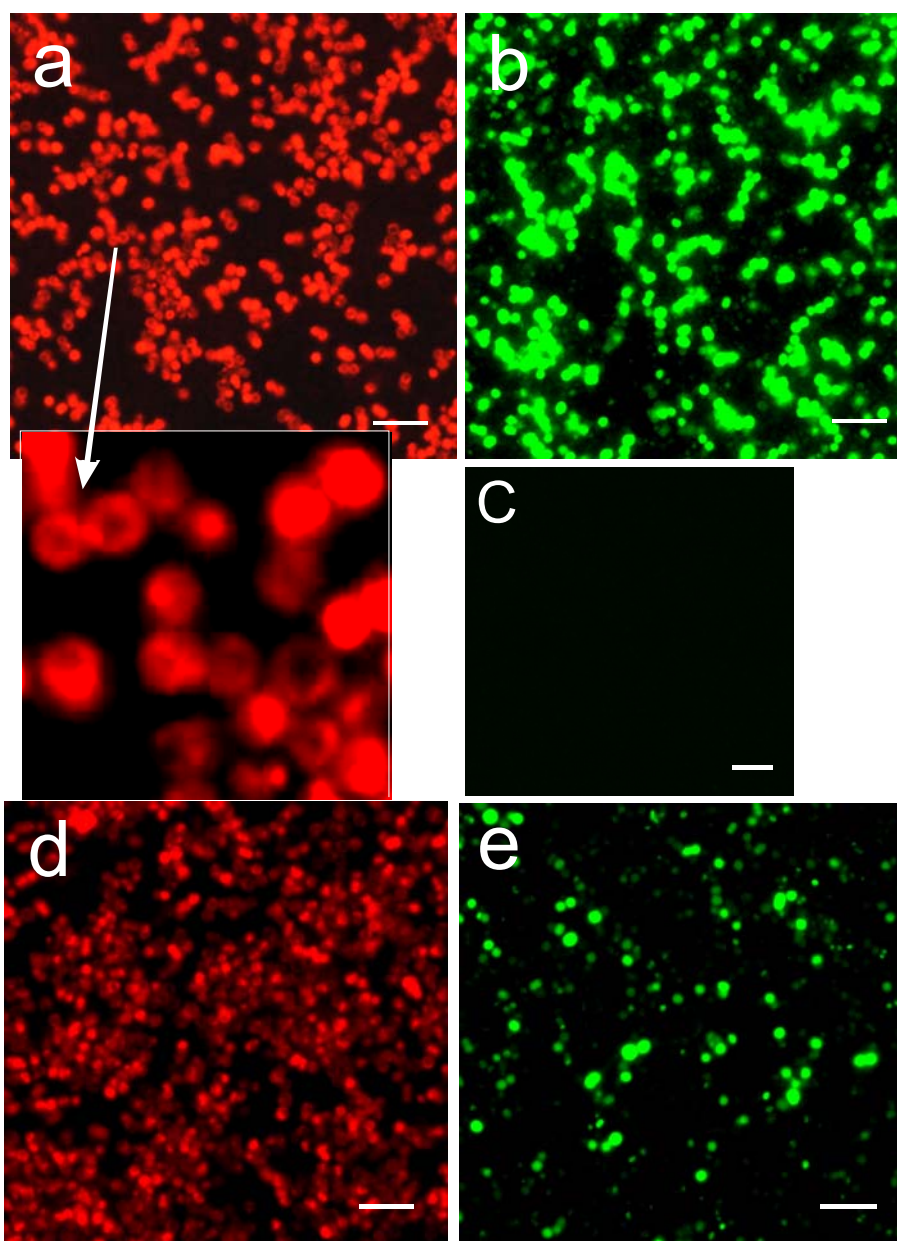


Рис. 3. Визуализация оксида азота в культуре *Lactobacillus plantarum* № 52 (a, b) и *Lactobacillus fermentum* AL1 (d, e) флуоресцентным окрашиванием: a, d – окраска клеток, содержащих NO, 1,2-диаминоантрахиноном (DAA), b, e – окраска клеток, содержащих NO, диацетильным производным 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеина (DAF-FM DA), c – отрицательный контроль. Масштабная линейка – 5 мкм

С другой стороны, в мире прокариот оксид азота может также образовываться в ходе денитрификации. Точная пространственная локализация ферментов денитрификации у грамположительных бактерий, к которым относятся лактобациллы, не известна, хотя для грамотрицательных микроорганизмов установлено, что процесс диссимиляционной нитратредукции протекает на цито-

плазматической мембране [26]. В ходе изучения способности к денитрификации было продемонстрировано отсутствие способности к денитрификации у *L. fermentum* AL1 и *L. plantarum* № 52. Только *L. plantarum* № 8P-A3 восстанавливал нитраты до нитритов. Чтобы исключить возможность образования оксида азота у этого штамма в процессе нитратредукции, проведена ЭПР-спектроскопия проб, инкубируемых анаэробно и содержащих 20 мМ KNO_3 . При определении оксида азота в пробах на активность нитритредуктазы регистрировали сигнал от комплекса $(\text{DETС})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$. Однако увеличение времени инкубации проб приводило к снижению концентрации парамагнитных комплексов, а удаление из реакционной смеси бактерий не влияло на концентрацию NO в пробах (рис. 4, б). Полученные данные свидетельствуют о небиологическом происхождении обнаруженного в этом случае оксида азота. Известно, что NO может образовываться химическим путем из нитритов в кислой среде [27]. Именно этот процесс, вероятно, объясняет присутствие неферментативно образованного NO в пробах на активность нитритредуктазы.

Таким образом, при исследовании способности *L. plantarum* № 8P-A3 к денитрификации было установлено, что данные микроорганизмы способны вести лишь первый этап диссимиляционной нитратредукции. В условиях, благоприятных для денитрификации (дефицит кислорода и наличие нитратов в среде культивирования), оксид азота не образуется биологическим путем, что свидетельствует об отсутствии активности фермента нитритредуктаза.

Проведенная ЭПР-спектроскопия проб на активность NO-синтазы в присутствии кислорода и L-аргинина показала, что бактерии *L. plantarum* № 8P-A3 обладают NO-синтазной активностью. В суспензии лактобацилл регистрировали интенсивный ЭПР сигнал комплекса $(\text{DETС})_2\text{-Fe}^{2+}\text{-NO}$, свидетельствующий о присутствии в реакционной смеси оксида азота. Концентрация NO повышалась с течением времени инкубации от 30 до 60 мин. с 37.2 мМ до 95.8 мМ (рис. 4, а), что характерно для ферментативных реакций и подтверждает биологическое происхождение регистрируемого NO.

Следует отметить, что в пробах, не содержащих бактерий, также обнаружили оксид азота, однако количество образованного NO в данном случае значительно меньше по сравнению с опытным вариантом на активность NO-синтазы (рис. 4, а). Образование NO неэнзиматическим путем вероятно можно объяснить известным фактом его синтеза из L-аргинина и H_2O_2 [28]. Физиология лактобацилл действительно предполагает их устойчивость к значительным количествам H_2O_2 [29].

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что бактерии рода *Lactobacillus* не образуют NO в процессе денитрификации, однако обладают, подобно клеткам млекопитающих, NO-синтазным механизмом образования оксида азота из L-аргинина. NO-синтазный механизм образования NO микроорганизмами данной группы был подтвержден методами ЭПР и окрашивания NO-чувствительными флуоресцентными красителями. Результаты окрашивания DAA указывают на то, что NO-синтаза лактобацилл связана с мембраной.

Биологические функции прокариотической NO-синтазы в целом остаются неизвестными. Поскольку NO является плейотропным регулятором клеточных

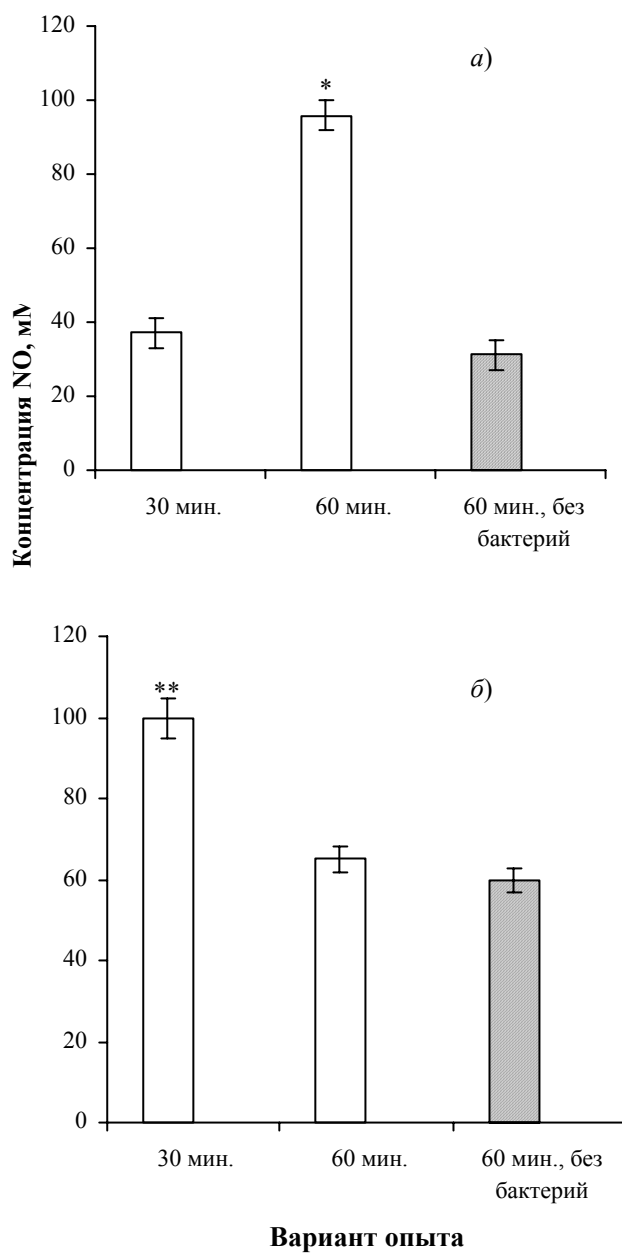


Рис. 4. Содержание NO (среднее \pm стандартное отклонение) в пробах лактобацилл, инкубируемых: а) аэробно с L-аргинином (20 мМ) в присутствии (светлые столбцы) и в отсутствие (заштрихованный столбец) бактерий; б) анаэробно с KNO₃ (20 мМ) в присутствии (светлые столбцы) и в отсутствие (заштрихованный столбец) бактерий. Одной звездочкой отмечено то, что достоверно отличается от вариантов с 30-минутной инкубацией и инкубацией без бактерий ($p \leq 0.05$); двумя звездочками отмечено то, что достоверно отличается от вариантов с 60-минутной инкубацией ($p \leq 0.05$)

функций млекопитающих, предполагают, что оксид азота, синтезируемый патогенными микроорганизмами, играет критическую патофизиологическую роль во время инфекционного процесса [10]. Помимо этого, NOS *S. aureus* приписывают роль стрессорного белка, синтезируемого бактериями в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды [30]. Обнаружено, что гомолог NOS в *Streptomyces turgidiscabies*, *S. scabies* и *S. acidiscabies* участвует в нитровании дипептидного фитотоксина, определяющего патогенность данных микроорганизмов по отношению к растениям, что свидетельствует об участии бактериальной NOS в биосинтезе вторичных метаболитов [31]. Только для нокардиального фермента показана регуляторная роль, аналогичная NOS эукариот и связанная в основном с активированием оксидом азота фермента гуанилатциклазы [32].

Благодаря своему стерилизующему и консервирующему действию, основанному на подкислении среды, бактерии рода *Lactobacillus* находят широкое применение в сельском и домашнем хозяйстве, а также в молочной промышленности. Технологическая и коммерческая значимость микроорганизмов этой группы связана также с их использованием в производстве пробиотических препаратов. Предпосылкой к этому послужили антагонистические свойства лактобацилл по отношению к патогенным микроорганизмам в кишечнике и урогенитальном тракте, где они входят в состав естественной микрофлоры [33]. В связи с известной биологической активностью бактерий рода *Lactobacillus*, обуславливающей их широкое использование в производстве продуктов питания и промышленно важных пробиотических препаратов, представляются перспективными дальнейшие исследования регуляторной функции оксида азота у микроорганизмов этой группы.

Авторы выражают благодарность К. Бойерляйну (Институт фармакологии Университета г. Гиссен, Германия) за постановку и обсуждение экспериментов с флуоресценцией и кандидату химических наук, доценту В.Г. Штырлину (НИЛ координационных соединений, кафедра неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова КГУ) за приготовление концентрационной серии $\text{Cu}^{2+}(\text{DETC})_2$.

Работа выполнена в рамках программы «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.1005 и Госконтракта «Центр коллективного пользования КГУ» 02.451.11.7019.

Summary

D.R. Yarullina, O.N. Ilinskaya, N.I. Silkin, D.G. Zverev. NO-synthase activity of lactobacilli confirmed by EPR spectroscopy and fluorescent imaging.

Due to its pivotal biological activities nitric oxide (NO) is a molecule of high interest. Although NO biosynthesis through denitrification has been well studied in microorganisms, the formation of NO from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS) has rarely been investigated. The functional importance of *Lactobacillus* species in the mammalian intestine highlights the need for detailed studies of the occurrence of NO synthesis in this bacteria.

Three strains of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* were investigated for nitric oxide production. NO-synthase activity was detected by NO-specific fluorescent probes 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA) and 1,2-diaminoanthraquinone (DAA) and confirmed by electron paramagnetic resonance (EPR). None of the strains of *L. fermentum* and *L. plantarum* examined had denitrifying nitrite reductase activity under anaerobic conditions. The possibility of nonenzymatic NO generation was also demonstrated. We propose, that NOS is a membrane-associated enzyme. Overall, the results strongly support, that *Lactobacillus* produce NO through nitric oxide synthase system.

Литература

1. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function, inhibition // *Biochem. J.* – 2001. – V. 357. – P. 593–615.
2. Ступакова М.В., Лобышева И.И., Микоян В.Д., Ванин А.Ф., Васильева С.В. Роль ионов железа в индукции оксидом азота SOS-ответа в клетках *Escherichia coli* // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65, Вып. 6. – С. 810–816.
3. Cutruzzola F. Bacterial nitric oxide synthesis // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1411. – P. 231–249.
4. Chen Y., Rosazza J.P.N. A bacterial nitric oxide synthase from a *Nocardia* species // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – V. 203, No 2. – P. 1251–1258.
5. Chen Y., Rosazza J.P.N. Purification and characterization of nitric oxide synthase (NOSNoc) from a *Nocardia* species // *J. Bacteriol.* – 1995. – V. 177, No 17. – P. 5122–5128.
6. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S. et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* // *Nature.* – 1997. – V. 390. – P. 249–256.
7. Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y. et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Lancet.* – 2001. – V. 357. – P. 1225–1240.
8. White O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Hickey E.K., Peterson J.D., Dodson R.L., Haft D.H., Gwinn M.L., Nelson W.C., Richardson D.L. et al. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1 // *Science.* – 1999. – V. 286. – P. 1571–1577.
9. Takami H., Nakasone K., Takaki Y., Maeno G., Sasaki R., Masui N., Fuji F., Hiramata C., Nakamura Y., Ogasawara N., Kuhara S., Hirikoshi K. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis* // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – P. 4317–4331.
10. Choi W.S., Chang M.S., Han J.W., Hong S.Y., Lee H.W. Identification of nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – V. 237. – P. 554–558.
11. Adawi D., Kasravi F.B., Molin G., Jeppsson B. Effect of *Lactobacillus* supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat // *Hepatology.* – 1997. – V. 25, No 3. – P. 642–647.
12. Morita H., Yoshikawa H., Sakata R., Nagata Y., Tanaka H. Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum* // *J. Bacteriol.* – 1997. – V. 179, No 24. – P. 7812–7815.
13. Xu J., Verstraete W. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V. 56. – P. 504–507.
14. Герхардт Ф. (ред.) Методы общей бактериологии. – М.: Мир, 1984. – 472 с.

15. Сайманова Р.А., Захарова Н.Г. Выделение чистых культур бактерий и их идентификация. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1980. – 24 с.
16. Kuropteva Z.V., Kudryavtsev M.E. Ferrous-ascorbate complexes as carriers of nitric oxide // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1997. – V. 16, No 1. – P. 91–96.
17. Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Serezhenkov V.A., Stukan R.A., Vanin A.F. Complexes of Fe²⁺ with diethyldithiocarbamate or N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate as traps of nitric oxide in animal tissues: comparative investigations // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – V. 1336, No 2. – P. 225–234.
18. Жумабаева Т.Т., Байдер Л.М., Володина Л.А., Куроптева З.В. Исследование методом ЭПР взаимодействия клеток *E. coli* с аскорбиновой кислотой и нитритом натрия // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2001. – Т. 37, № 6. – С. 742–746.
19. Zhang D., Xiong J., Hu J., Li Y., Zhao B. Improved method to detect nitric oxide in biological systems // *Appl. Magn. Reson.* – 2001. – V. 20. – P. 345–356.
20. Goretski J., Zafiriou O.C., Holloche T.C. Steady-state nitric oxide concentrations during denitrification // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V. 265. – P. 11535–11538.
21. von Bohlen und Halbach O. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes // *Nitric oxide.* – 2003. – V. 9. – P. 217–228.
22. Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins // *Anal. Chem.* – 1998. – V. 70. – P. 2446–2453.
23. Heiduschka P., Thanos S. NO production during neuronal cell death can be directly assessed by a chemical reaction *in vivo* // *Neuroreport.* – 1998. – V. 9. – P. 4051–4057.
24. Bird L.E., Ren J., Zhang J., Foxwell N., Hawkins A.R., Charles I.G., Stammers D.K. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus* // *Structure.* – 2002. – V. 10. – P. 1687–1696.
25. Adak S., Bilwes A.M., Panda K., Hosfield D., Aulak K.S., McDonald J.F., Tainer J.A., Getzoff E.D., Crane B.R., Stuehr D.J. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans* // *PNAS.* – 2002. – V. 99, No 1. – P. 107–112.
26. Ye R.W., Averill B.A., Tiedje J.M. Denitrification: production and consumption of nitric oxide // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1994. – V. 60, No 4. – P. 1053–1058.
27. Weitzberg E., Lundberg J.O.N. Nonenzymatic nitric oxide production in humans // *Nitric Oxide.* – 1998. – V. 2, No 1. – P. 1–7.
28. Nagase S., Takemura K., Ueda A., Hirayama A., Aoyagi K., Kondoh M., Koyama A. A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. – V. 233, No 1. – P. 150–153.
29. Lee J., Hwang K.T., Heo M.S., Lee J.H., Park K.Y. Resistance of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099 from Kimchi to oxidative stress // *J. Med. Food.* – 2005. – V. 8, No 3. – P. 299–304.
30. Hong I.-S., Kim Y.K., Choi W.S., Seo D.W., Yoon J.W., Han J.-W., Lee H.Y., Lee H.W. Purification and characterization of nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus* // *FEMS Microbiology Letters.* – 2003. – V. 222. – P. 177–182.
31. Kers J.A., Wach M.J., Krasnoff S.B., Widom J., Cameron K.D., Bukhalid R.A., Gibson D.M., Crane B.R., Loria R. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase // *Nature.* – 2004. – V. 429. – P. 79–82.
32. Son J.K., Rosazza J.P.N. Cyclic guanosine-3',5'-monophosphate and biopteridine biosynthesis in *Nocardia sp.* // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182, No 13. – P. 3644–3648.

33. *Orrhage K., Nord C.E.* Bifidobacteria and lactobacilli in human health // *Drugs Exp. Clin. Res.* – 2000. – V. 26, No 3. – P. 95–111.

Поступила в редакцию
20.01.06

Яруллина Дина Рашидовна – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *yadinka@mail.ru*

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *Olga.Ilinskaya@ksu.ru*

Силкин Николай Иванович – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры электроники и радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

E-mail: *Nikolai.Silkin@ksu.ru*

Зверев Дмитрий Германович – электроник кафедры электроники и радиоспектроскопии Казанского государственного университета.

E-mail: *dzverev@mail.ru*

Аганов Альберт Варганович – доктор химических наук, профессор, декан физического факультета, заведующий кафедрой общей физики Казанского государственного университета.

E-mail: *Albert.Aganov@ksu.ru*