

ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} НА АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СИСТЕМ IN VITRO И IN VIVO

В работе приведены данные исследования влияния катионов K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} на активность биолюминесцентной реакции in vitro и in vivo с определением соотношений между регистрируемыми эффектами. Полученные результаты, выполненные на примере ферментной системы генерации свечения и несущих ее природных и рекомбинантных микроорганизмов, расширяют представления об эффектах данных ионов на живые системы, реализующиеся не только через изменение осмолярности среды, но и через прямое воздействие с белковыми ферментами.

Биолюминесценция – ферментативный процесс, катализируемый особой группой бактериальных ферментов – люцифераз (щелочных FMN-зависимых монооксигеназ E.C.1.14.14.3), сопровождающийся потреблением кислорода и излучением света [1]. На фоне небольших межвидовых различий все бактериальные люциферазы имеют сходное строение и представляют собой белковые α/β -гетеродимеры (продукты расположенных рядом генов luxAB) с молекулярной массой 76 ± 4 kDa, не содержащие металлов или простетических групп [2]. При этом химизм катализируемой ими реакции в наиболее общем виде может быть представлен как окисление восстановленного флавинмононуклеотида ($FMNH_2$) до FMN с одновременным окислением длинноцепочечного алифатического альдегида ($RCHO$) с 8-14 атомами углерода до соответствующей жирной кислоты ($RCOOH$) и излучением кванта света с длиной волны 495 нм [3].

Необходимым условием для обеспечения стабильности световой эмиссии является непрерывное возобновление пула названных субстратов, что обеспечивается двумя сопряженными с люциферазой вспомогательными ферментными системами. Первая из них представлена NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазами (E.C.1.6.99.-), осуществляющих восстановление FMN в $FMNH_2$ за счет энергии двух молекул NAD(P)H [4]. В свою очередь вторая ферментная система, представляющая собой кодируемый генами luxCD-E мультиферментный комплекс восстановления длинноцепочечных жирных кислот [5], осуществляет регенерацию последних в соответствующие альдегиды с затратой в каждом цикле по одной молекуле АТФ и NAD(P)H.

Подобная тесная интегрированность биолюминесцентной системы с энергетическими потоками бактериальной клетки объясняет высокую чувствительность свечения к воздействию на

них химическим поллютантам, что нашло свое применение в технологии люминесцентного тестирования биотоксичности различных сред [6]. Другой возможностью влияния некоторых химических веществ на интенсивность биолюминесценции является их прямое взаимодействие с системой генерации свечения, показанное для камфоры [7], а также органических растворителей – ацетона и диметилсульфоксида [8].

Возможность воздействия на уровень биолюминесценции установлена и для некоторых «нормальных» компонентов среды обитания, например солей K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} [9, 10]. При этом механизм их действия обычно связывается с влиянием на процессы трансмембранного переноса катионов и обусловленного этим изменением энергетического статуса бактериальной клетки [11]. В то же время данные о прямом взаимодействии катионов названных щелочных и щелочноземельных металлов с ферментной системой генерации свечения в доступной нам литературе отсутствуют, что контрастирует с представлениями об их важной роли в модуляции (активации или ингибировании) активности разнообразных ферментов.

В этой связи целью настоящей работы явилось исследование влияния катионов K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} на активность биолюминесцентной реакции in vitro и in vivo с определением соотношений между регистрируемыми эффектами.

Для воспроизведения люминесцентной реакции in vitro использовали «Комплект реактивов для биолюминесцентного анализа» (Институт биофизики СО РАН, Красноярск), включающий смесь лиофильно высушенных ферментов – люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, изолированных из рекомбинантного штамма Escherichia coli с клонированными luxAB генами морской светящейся бактерии Photobacterium leiognathi и в последующем очищенных методами ионообменной и аффинной хроматографии. В качестве суб-

стратов для реакции свечения использовали миристиновый (C_{14}) альдегид (Merck, ФРГ), флавиномононуклеотид (Sigma, США) и восстановленный никотинамиддинуклеотид. В состав реакционной смеси входили 10 мкл раствора ферментов, 50 мкл 0,1% раствора миристинового альдегида, 1 мл 0,02 М фосфатного буфера, 10 мкл NADH в концентрации 10^{-4} М; реакцию свечения инициировали внесением 50 мкл 2,4% раствора FMN. Регистрацию свечения производили в кинетическом режиме в течение 30 минут на биолюминометре БЛМ-8802 М (СКТБ «Наука», Красноярск).

Для воспроизведения биолюминесцентной реакции в клеточной системе использовали рекомбинантный штамм *E.coli* K12 TG1 с клонированными luxCDABE генами *P.leiognathi* 54D10, выпускаемый в МГУ им. М.В. Ломоносова под коммерческим названием «Эколюм-9» [12], а также природный изолят морской люминесцирующей бактерии вида *P.phosphoreum*, производимый Институтом биофизики СО РАН под коммерческим названием «Микробиосенсор В-17 677f» [13]. Используемые препараты представляли собой лиофилизированную биомассу данных микроорганизмов с исходным содержанием бактериальных клеток около 10^9 КОЕ/мл. Перед проведением экспериментов их регидратировали добавлением холодной дистиллированной воды (при использовании *E.coli*) или 1,5% раствора NaCl (при использовании *P.phosphoreum*) и выдерживали в течение 30 минут при $+22-24^{\circ}\text{C}$ для стабилизации биолюминесценции. При проведении экспериментов взвесь бактерий в объеме 0,1 мл вносили в 0,9 мл растворов исследуемых солей, предварительно разлитых в кюветы для биохемилюминометра. В качестве контроля использовали дистиллированную воду (для *E.coli*) или 3% раствор NaCl (для *P.phosphoreum*). Приготовленные смеси выдерживали при $+22^{\circ}-24^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут, после чего измеряли уровень свечения, вычитая значения фона. Результаты измерения выражали величинами биолюминесцентного индекса по формуле $I = (I_o/I_k)$, где I_o – интенсивность свечения бактерий в опытной кювете, I_k – интенсивность люминесценции бактерий в контрольной кювете.

При изучении влияния отдельных катионов на интенсивность биолюминесценции *in vitro* и *in vivo* использовали соли NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 категории ч.д.а. Указанные вещества растворяли в дистиллированной воде до концентраций 0,01;

0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 и 1,0 М; в некоторых случаях для уточнения зависимостей уровня биолюминесценции от количественного содержания используемой соли готовили дополнительные разведения.

Все эксперименты выполнены в трех-шести повторностях. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с использованием компьютерной программы «SPSS». Для оценки вклада изменения активности ферментной системы генерации свечения в определение уровня биолюминесценции целых бактериальных клеток использовали процедуру дисперсионного анализа.

Полученные результаты позволили констатировать, что основным эффектом воздействия хлоридов K^+ и Na^+ на ферментную систему генерации свечения являлось развивающееся во времени (рис. 1а, б) и дозозависимое (рис. 2а) подавление интенсивности биолюминесценции до уровня 5% от исходного при использовании 1 М растворов данных солей. При этом различия в эффектах K^+ и Na^+ отсутствовали, что свидетельствует в пользу их неспецифического эффекта на параметры ферментативной реакции, предположительно определяемого изменением ионной силы раствора.

На этом фоне кинетика биолюминесценции ферментной системы в присутствии хлоридов Mg^{2+} и Ca^{2+} имела принципиально иной характер, уже не описываемый простыми линейными зависимостями. При этом использование первой из названных солей, первоначально также вызывающей подавление биолюминесценции (рис. 1в), начиная с 5-ой минуты, вело к восстановлению интенсивности свечения в широком диапазоне концентраций с относительным максимумом при 0,025 М. С другой стороны, для Ca^{2+} сходный эффект мог быть продемонстрирован только при 0,01 М, а все более высокие концентрации данного катиона вызывали быстрое и интенсивное подавление свечения (рис. 1г). Окончательным же результатом выявленных эффектов стала характерная зависимость активности ферментной системы от концентрации катионов (рис. 2а), заключающаяся в относительном росте уровня биолюминесценции при использовании низких концентраций Mg^{2+} и, в значительно меньшей степени Ca^{2+} , увеличение которых вело к интенсивному подавлению свечения, по своей

Таблица 1. Вклад изменения активности ферментной системы генерации свечения под воздействием различных катионов в определение итогового уровня

Исследованные катионы	E.coli «Эколюм-9»	P.phosphoreum «Микробиосенсор В-17 677f»
K ⁺	37,24% (3,95+33,29)	2,67% (0,12+2,55)
Na ⁺	57,73% (11,01+46,72)	24,06% (2,02+22,04)
Ca ²⁺	52,88% (13,43+39,45)	2,02% (0,86+1,16)
Mg ²⁺	39,36% (0,35+39,11)	14,44% (3,55+10,89)

Примечание: * – по результатам дисперсионного анализа: суммарный вклад в%, определенный как (прямое влияние + совместное воздействие с соответствующим катионом).

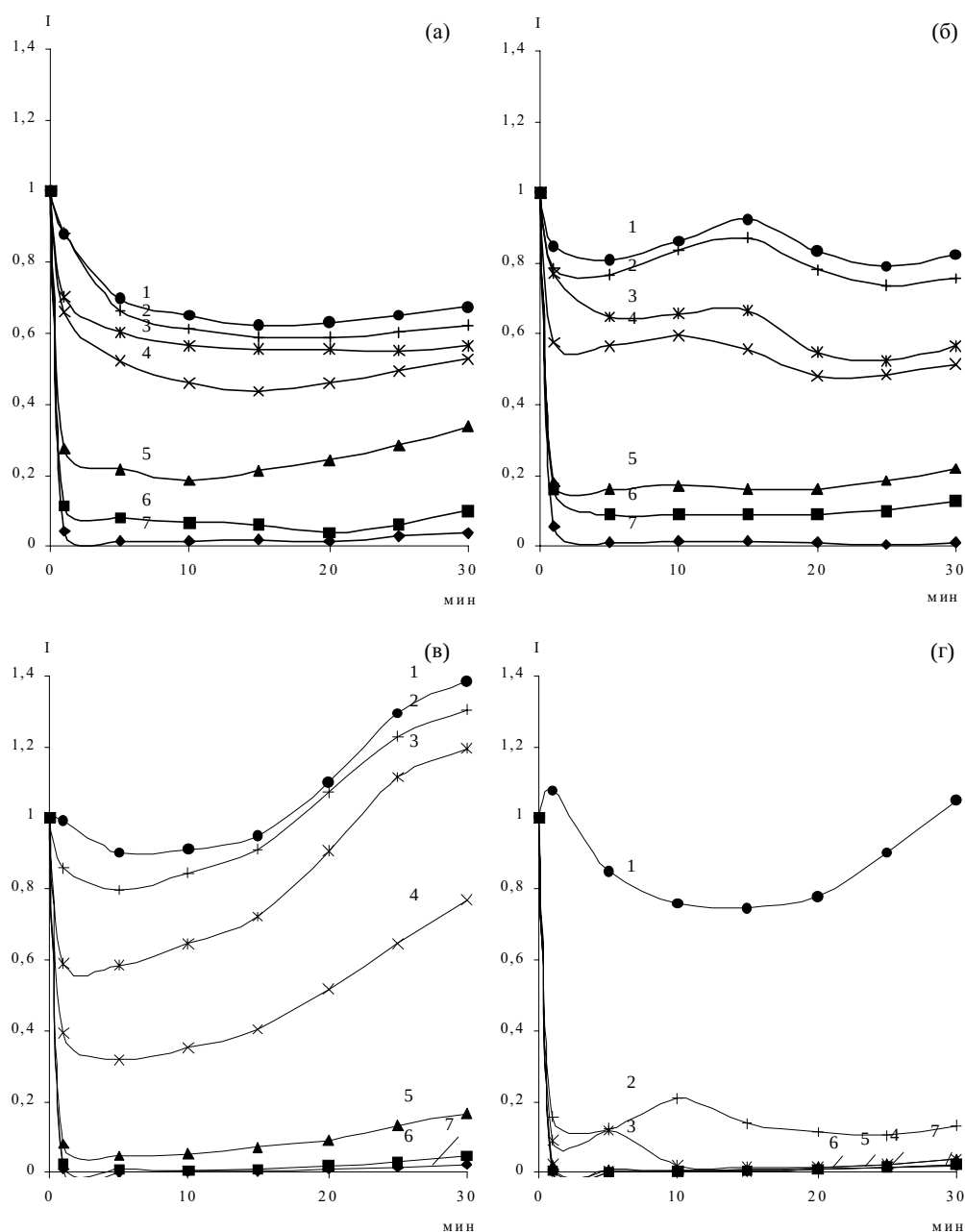


Рисунок 1. Кинетика люминесценции под влиянием хлоридов K⁺ (а), Na⁺ (б), Mg²⁺ (в) и Ca²⁺ (г) в концентрациях 0,01 М (1 – ●), 0,025 М (2 – +), 0,05 М (3 – *), 0,1 М (4 – x), 0,25 М (5 – ▲), 0,5 М (6 – ■), 1 М (7 – ◆).

По оси абсцисс: время, мин, по оси ординат: относительная интенсивность свечения, I

выраженности превышающему эффекты аналогичных концентраций K^+ и Na^+ .

В этом контексте эффекты ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} на ферментную систему генерации свечения должны рассматриваться как более специфичные, определяемые прямым взаимодействием катионов данных щелочноземельных металлов с молекулами фермента. При этом полученные результаты в значительной степени соответствуют представлениям об ионах Mg^{2+} как типичном активаторе для многих ферментов, действующих на фосфорилированные субстраты. Еще одним весомым свидетельством в пользу выдвинутого предположения является обнаружение при рентгенструктурном исследовании бактериальной люциферазы [2] трех прочно связанных с ней ионов Mg^{2+} , не входящих в состав ее активного центра. С другой стороны, полученные данные подтверждают факт возможной конкуренции между различными щелочноземельными металлами, в частности, феномен подавления ионами Ca^{2+} активности многих ферментов, активируемых Mg^{2+} или Zn^{2+} .

Исследование характера влияния тех же катионов на уровень свечения целых бактериальных клеток *E.coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P.leiognathi* позволило констатировать определенные сходства с их эффектами в бесклеточной ферментной системе. Так ступенчатое повышение концентраций K^+ , Na^+ , Mg^{2+} или

Ca^{2+} первоначально результировалось в увеличении уровня свечения (рис. 26). При этом выявленные эффекты демонстрировали прямую взаимосвязь между величиной оптимальной концентрации катиона и достигаемой при ней интенсивности свечения, будучи наибольшим в присутствии хлорида K^+ (оптимальная концентрация 0,14 М; относительная интенсивность свечения $I=2,64$) и наименьшим в присутствии хлорида Ca^{2+} (0,05 М; $I=1,25$). После же достижения максимума биолюминесценции дальнейшее насыщение среды катионами вело к ее прогрессирующей ингибиции, характеризующейся уровнем свечения не более 5% от исходного при концентрации 1 М.

В другой клеточной системе, представленной бактериями вида *P.phosphoreum*, сочетание эффектов активации и ингибиции свечения также было продемонстрировано, что, однако, сопровождалось значительными особенностями реагирования, предположительно определяемыми экологическими особенностями данного морского (умеренно галофильного) микроорганизма. При этом наибольшее стимулирующее воздействие на уровень биолюминесценции зафиксировано при использовании ионов Na^+ , увеличение концентрации которого от 0 до 0,5 М вело к пропорциональному росту интенсивности свечения. На этом фоне особенностью стимулирующего эффекта хлоридов Ca^{2+} и Mg^{2+} , максимумы которого регистрирова-

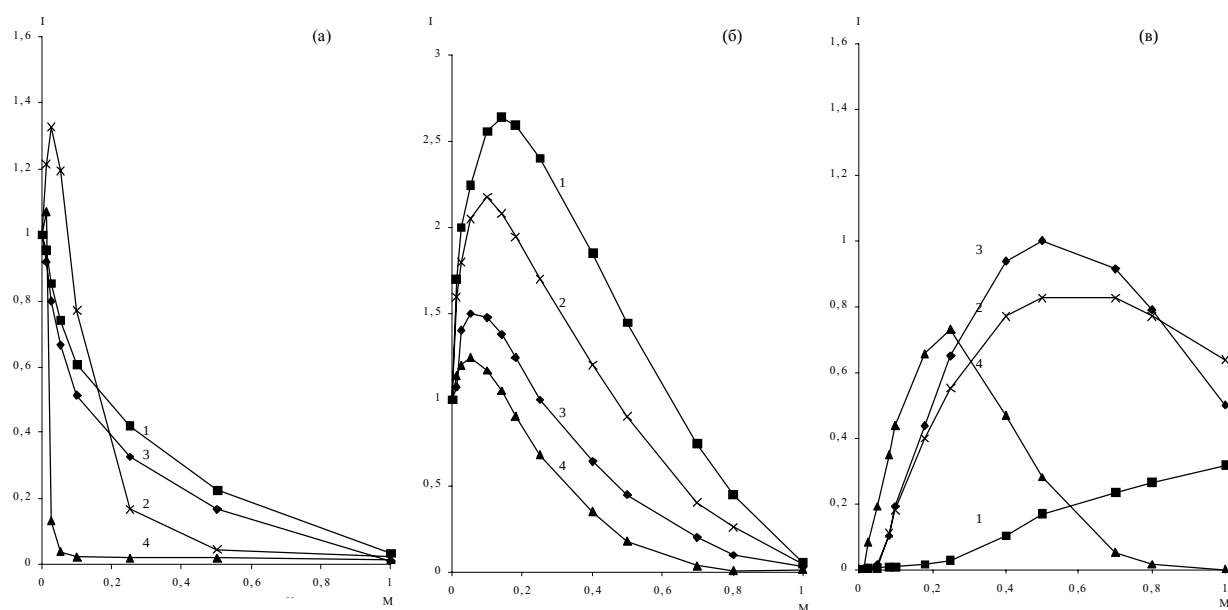


Рисунок 2. Влияние различных концентраций хлоридов K^+ (1), Mg^{2+} (2), Na^+ (3) и Ca^{2+} (4) на биолюминесценцию ферментной системы генерации свечения (а), а также целых клеток *E.coli* «Эколюм-9» (б) и *P.phosphoreum* «Микробиосенсор В-17 677f» (в) после 30 мин контакта.

По оси абсцисс: концентрация солей, М; по оси ординат: относительная интенсивность свечения, I

лись при молярных концентрациях 0,25 М и 0,6 М, явилось обеспечение свечения на уровне только 75-80% от контрольных значений. После же достижения оптимума биолюминесценции дальнейшее увеличение присутствия названных катионов вновь сменялось его ингибированием, наиболее выраженной в присутствии хлоридов Ca^{2+} и в значительно меньшей степени в присутствии Na^+ и Mg^{2+} . В свою очередь особенностью эффекта хлорида K^+ явилась линейная, но наименее выраженная тенденция к росту уровня свечения *P.phosphoreum*, даже при наибольшей использованной концентрации данной соли 1,0 М достигающего только 31,6% от контрольных значений (рис. 2в).

Таким образом, полученные результаты не позволяют свести эффекты ионов K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} на биолюминесценцию целых бактериальных клеток только к воздействию на ферментную систему генерации свечения. При этом в перечень механизмов их влияния *in vivo* следует включить их влияние на осмолярность среды [14], модулирующую интенсивность свечения через изменение уровня эндогенного альдегида [15] – одного из субстратов люминесцентной реакции. Другой механизм может определяться эффектом использованных катионов на энергетику наружной цитоплазматической мембраны [11, 16], через модификацию интенсивности клеточного дыхания и изменение уровня внутриклеточного NADH [9] также способную оказывать влияние на интенсивность биолюминесценции.

В то же время определенный параллелизм эффектов ионов K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} в клеточных и бесклеточных системах явился основанием для постановки вопроса о значимости их прямого воздействия на ферментную систему генерации свечения в определении итогового уровня биолюминесценции бактерий.

Проведенный с этой целью дисперсионный анализ позволил констатировать высокую значимость подобного воздействия для рекомбинантного штамма *E.coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P.leiognathi* (табл. 1).

При этом сила влияния K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} на уровень свечения клеток данного микроорганизма через изменение активности его ферментной системы варьировала в диапазоне 37,24-57,73%, преимущественно реализуясь как совместное воздействие с соответствующим катионом. Что же

касается значения эффектов, связанных исключительно с изменением активности ферментной системы, то они были максимальны (13,43%) в присутствии ионов Ca^{2+} , являющегося мощным ингибитором свечения как бесклеточных экстрактов, так и целых бактериальных клеток.

На этом фоне значимость обсуждаемых факторов в определении уровня биолюминесценции природного изолята *P.phosphoreum* была существенно ниже (2,02-24,06%), будучи наибольшей для Na^+ , что согласуется с представлениями о важной роли данного иона в экологии морских микроорганизмов рода *Photobacterium* [9, 15]. В свою очередь слабые, но достоверные эффекты, связанные исключительно с изменением активности ферментной системы, могли быть показаны для ионов Mg^{2+} (сила влияния 3,55%), способных устанавливать прямое взаимодействие с бактериальной люциферазой [2] и за счет этого стабилизировать параметры биолюминесцентной реакции (см. выше).

Обсуждая причины различной интенсивности влияния ионов K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} на уровень биолюминесценции двух исследованных микроорганизмов, определяемый прямым воздействием на их ферментные системы генерации свечения, следует указать, что использованный рекомбинантный штамм *E.coli* K12 несет в себе искусственно интродуцированную биолюминесцентную систему, не имеющую устоявшихся связей с энергетическими потоками в клетке и за счет этого в значительной степени попадающую под влияние иных факторов, в том числе поступающих из внешней среды катионов. С другой стороны, эндогенная люминесцентная система природного изолята *P.phosphoreum* характеризуется значительно большей интегрированностью в метаболические пути бактериальной клетки, что снижает ее зависимость от факторов среды обитания.

В общебиологическом же плане полученные результаты, выполненные на примере ферментной системы генерации свечения и несущих ее природных и рекомбинантных микроорганизмов, расширяют представления об эффектах ионов K^+ , Na^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} на живые системы, реализующихся не только через изменение осмолярности среды или воздействие на энергетические процессы в клеточных мембранах, но и через прямое взаимодействие с белковыми ферментами.

Список использованной литературы:

1. Wilson T., Hastings J.W. Bioluminescence // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 1998. Vol. 14. P.197-230.
2. Fisher A.J., Thompson T.B., Thoden J.B. et al. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. No. 36. P.21956-21968
3. Lin L.Y.-C., Sulea T., Szittner R. et al. Modeling of the bacterial luciferase-flavin mononucleotide complex combining flexible docking with structure-activity data // *Protein Science*. 2001. Vol. 10. P.1563-1571
4. Мажуль М.М., Данилов В.С. Исследование свойств NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы из морских люминесцентных бактерий *Vibrio fischeri* // *Биохимия*. – 1994. – Т.59. – №10. – С.1608-1614
5. Wall L., Meighen E.A. Subunit structure of the fatty-acid reductase complex from *Photobacterium phosphoreum* // *Biochemistry*. 1986. Vol. 25. P.4315-4321
6. Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants // *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. Vol. 6. No 3. P. 206-212.
7. Danilov, V. S., Baranova, N. A., Ismailov, A. D., Egorov, N. S. The effect of camphor on bacterial bioluminescence // *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1982. Vol. 14. No 2. 125-129
8. Sokolova I. V., Kalacheva G. S., Tyulkova N. A. Analysis of the ratio of quantum yield and fatty acid formation of *photobacterium leiognathi* // *Vestnik moskovskogo universiteta. Khimia*. 2000. Vol. 41. No 6. P. 118-120.
9. Витухновская Л.А., Исмаилов А.Д. Влияние ионов Na^+ , K^+ на люминесцентную активность интактных клеток *Vibrio harveyi* при различных pH // *Микробиология*. 2001. Т. 70. №4. С. 525-530.
10. Бояндин А.Н., Попова Л.Ю. Зависимое от минеральных солей ингибирование свечения люминесцентного микроорганизма *Escherichia coli* Z905 // *Биофизика*. 2001. Т. 26. №2. С. 251-255.
11. Fujiwara-Nagata E., Kogure K., Kita-Tsukamoto K., Wada M., Eguchi M. Characteristics of Na^+ -dependent respiratory chain in *Vibrio anguillarum*, a fish pathogen, in comparison with other marine Vibrios // *FEMS Microbiol. Ecology*. 2003. Vol. 44. No. 2. P. 225-230.
12. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошкин Г.Е., Соловьева Л.Н., Карташев Ф.В., Завительский Г.Б. Сенсорные биоломинесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // *Вестник московского университета. Биология*. 2002. №3. С. 20-24.
13. Каталог культур светящихся бактерий / Под ред. Э.К. Родичевой. Новосибирск: Наука, СО РАН, 1997. 125с.
14. Stabb E.V., Butler M.S., Adin D.M. Correlation between osmolarity and luminescence of symbiotic *Vibrio fischeri* strain ES114 // *Bacteriology*. 2004. Vol. 186. No. 9. P. 2906-2908.
15. Watanabe H., Humio I., Hastings W.J. Effects of aldehyde and internal ions on bioluminescence expression of *Photobacterium phosphoreum* // *Arch. Microbiol.* 1991. Vol. 156. P. 1-4.
16. Kashket E.R. Effects of K^+ and Na^+ on the proton motive force of respiring *Escherichia coli* at alkaline pH // *Bacteriol.* 1985. Vol. 163. No. 2. P. 423-429.