

## ОСОБЕННОСТИ РЕАГИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ С РАЗЛИЧНЫМИ LUX-ОПЕРОНАМИ В ФАГОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЕ

Установлена зависимость биолюминесцентного отклика различных рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* в фагоцитарной системе от природы клонированных в них *lux*-оперонов. Показано, что использование конструкций на основе генетического материала морской люминесцирующей бактерии *Photobacterium leiognathi* при взаимодействии с нейтрофилами периферической крови человека позволяет достичь прямой пропорциональности между интенсивностью свечения и выраженностью развивающегося в этих условиях киллингового эффекта.

Реализация бактерицидного потенциала фагоцитов с развитием киллингового эффекта в отношении микробных клеток-мишеней является одним из завершающих, но наиболее важных этапов фагоцитоза [1], для оценки эффективности которого предложен достаточно большой спектр лабораторных технологий, представленных микроскопическим, микробиологическим, радиоизотопным, цитофлюориметрическим и др. методами [2, 3]. Среди них одним из наиболее экспрессных, в том числе позволяющих проводить оценку результатов исследования в режиме реального времени, является разрабатываемый в настоящее время биолюминесцентный метод оценки фагоцитоза [4], основанный на использовании в качестве фагоцитируемых объектов рекомбинантных микроорганизмов вида *Escherichia coli* с клонированными в них генами (*lux*-оперонами) природных люминесцирующих бактерий. При этом уровень свечения, количественно оцениваемый с использованием специальных приборов – биолюминометров, выступает в качестве результативного параметра, по изменению уровня которого рассчитываются относительные показатели киллингового эффекта. В этой связи важнейшим требованием к используемым объектам фагоцитоза становится существование прямой пропорциональности между показателями жизнеспособности микроорганизмов и уровнем их биолюминесценции. Сказанное определяет необходимость учета природы используемого генетического материала, так как рекомбинантные микроорганизмы, созданные на основе одного и того же реципиентного штамма *E. coli*, но содержащие *lux*-опероны

различных люминесцирующих бактерий, в ответ на воздействие некоторых биологических факторов могут демонстрировать неидентичный, а иногда и противоположный характер изменения уровня свечения [5].

В этой связи целью настоящей работы явилось изучение биолюминесцентного отклика ряда рекомбинантных штаммов *E. coli* с клонированными *lux*-оперонами морских (*Photobacterium leiognathi*) и почвенных (*Photorhabdus luminescence*) микроорганизмов при контакте с фагоцитами, а также анализ соответствий между изменением интенсивности свечения и выраженностью формируемого в этих условиях киллингового эффекта.

При проведении исследований использовались рекомбинантный штамм *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. leiognathi* 54D10, выпускаемый МГУ им. М.В. Ломоносова под названием «Эколюм-9» [6]; тот же реципиент, но несущий *lux*-оперон *P. luminescence* Zm1 и известный как «Эколюм-8», а также разработанный в Институте биофизики СО РАН рекомбинантный штамм *E. coli* Z905 (*hsdR<sup>+</sup> hsdM<sup>+</sup> gal<sup>-</sup> met<sup>-</sup> recA<sup>-</sup> tet<sup>r</sup>*) с многокопийной плазмидой *pPHL7*, созданной на основе вектора *pUC18* и *lux*-оперона *P. leiognathi* [7]. Названные микроорганизмы восстанавливали из лиофилизированного состояния добавлением холодной дистиллированной воды и выдерживали в течение 30 минут при 4° С для реактивации биолюминесценции. Непосредственно перед проведением исследований названные микроорганизмы опсонизировали в условиях, исключающих развитие бактерицидного эффекта и оказывающих минимальное воздействие на базовый уровень их биолюми-

несценции [8]. Для этого бактериальную суспензию смешивали в равных объемах с коммерческим препаратом нормального иммуноглобулина человека так, чтобы его конечная концентрация составляла 6-10 мг/мл, а конечная концентрация бактерий равнялась  $5 \times 10^8$ /мл. Полученную смесь выдерживали при 37° С в течение 10 мин.

Для получения фагоцитов цельную кровь в количестве 2-4 мл забирали из локтевой вены в пластиковую пробирку, содержащую гепарин (50 Ед/мл), после чего выдерживали в течение 2 часов при 4° С для разделения эритроцитов (нижняя фаза) и обогащенной лейкоцитами плазмы (верхняя фаза). Содержимое верхней фазы наслаивали на двойной градиент фиколл-верографина с плотностями 1,077 г/мл и 1,092 г/мл, после чего центрифугировали в течение 45 мин. при 1500 об/мин [9]. Нейтрофилы собирали с нижней интерфазы, отмывали холодным физиологическим раствором и ресуспендировали в среде 199 до концентрации  $5 \times 10^6$ /мл.

Фагоцитарную систему формировали путем смешивания 0,1 мл опсонизированных люминесцирующих бактерий и 0,9 мл суспензии фагоцитов, так что достигаемое соотношение «бактерии:фагоциты» составляло 10:1. Полученную смесь инкубировали в течение 60 минут при 37° С в термостатируемой измерительной ячейке двухканального биолюминометра [10,11], выпущенного СКТБ «Наука» (Красноярск) под названием «8802М2К». Интенсивность свечения в пробе осуществляли в непрерывном режиме, после чего итоговый расчет показателей активности фагоцитоза проводили по формуле:  $\frac{\Sigma \text{имп}K - \Sigma \text{имп}O}{\Sigma \text{имп}K} \times 100\%$ , где  $\Sigma \text{имп}K$  – сумма импульсов, испускаемых в контроле (без фагоцитов),  $\Sigma \text{имп}O$  – сумма импульсов, испускаемых фагоцитарной системой в опыте.

Одновременно проводили изучение киллингового эффекта фагоцитов в отношении используемых бактериальных клеток-мишеней с использованием микробиологического метода [2, 3], для чего на 0, 10, 30 и 60 мин. из фагоцитарной системы отбирали пробы по 10 мкл, которые смешивали с 10 мкл 0,2% сапонина. После лизиса фагоцитов осуще-

ствляли высев жизнеспособных бактерий на ВСП-агар (Bio-Merieux, Франция) с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл (селективный маркер для всех использованных рекомбинантных штаммов *E. coli*). Учет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили после дополнительной 18-24 часовой инкубации при 37° С.

Параллельно методом хемилюминесцентного анализа [12] оценивалась степень активации (респираторного взрыва) фагоцитов с использованием люминола (*Sigma*, США). В последнем случае объектом исследования являлись полученные авторами настоящей статьи нелюминесцирующие варианты *E. coli* (lux-).

При проведении исследований с использованием рекомбинантного штамма *E. coli* «Эколюм-9» с клонированными *luxCDABE* генами *P. leiognathi* (рисунок 1а) было установлено, что непосредственно после введения в фагоцитарную систему они демонстрировали развивающуюся к 45-75 секунде кратковременную стимуляцию уровня свечения до уровня  $129,9 \pm 8,5\%$  от исходного. При этом природа данного явления может объясняться возрастанием в составе бактериальных клеток-мишеней продуктов перекисного окисления липидов, возникающих как результат начинающегося в это же время «окислительного взрыва» фагоцитов и представляющих собой потенциальные субстраты для бактериальной люциферазы [13]. Дальнейшие же события заключались в прогрессирующем снижении уровня биолюминесценции до уровня  $47,1 \pm 6,5\%$  от исходного, что происходило на фоне пропорционального снижения количества жизнеспособных микроорганизмов при высевах на плотные питательные среды (коэффициент корреляции  $r = 0,96$ ;  $t = 7,11$ ;  $P < 0,001$ ). Таким образом, развивающееся в динамике эксперимента поглощение и внутриклеточный киллинг использованных рекомбинантных микроорганизмов своим следствием имели дезорганизацию клонированных в них систем генерации свечения с соответствующим изменением (снижением) измеряемого результирующего параметра.

С другой стороны, генно-инженерная конструкция на основе того же реципиент-

ного штамма *E. coli*, но с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescence* (Эколюм-8) в тех же условиях демонстрировала развивающуюся во времени стимуляцию уровня свечения, выходящего на «плато» к 180-200 секунде и достигающего 268,1±18,0% от его исходного уровня (рисунок 16). Однако параллельная оценка киллингового эффекта, проводимая с использованием бактериологического метода, свидетельствовала о происходящем снижении количества жизнеспособных (колониеобразующих) клеток-мишеней, по своей выраженности достоверно не отличающемся от такового при использовании «Эколюм-9». При этом отражением противоположного характера изменения величин биолюминесценции и киллинга стали отрицательные значения связывающего их коэффициента корреляции ( $r = -0,92$ ;  $t = 6,99$ ;  $P < 0,001$ ).

Обсуждая полученные парадоксальные результаты, следует указать, что отсутствие гашения биолюминесценции *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescence* при гибели самой бактериальной клетки отмечалось нами и ранее, в частности при развитии бактерицидного эффекта в присутствии сыворотки крови [5]. При этом возможной причиной подобной ситуации является отличная от прочих люминесцирующих микроорганизмов чрезвычайно высокая прочность нековалентных связей между ферментами, обеспечивающими свечение *P. luminescence*, разрушающихся только после жесткой обработки 5М мочевиной [14]. Условием же для возникновения подобных аномально стабильных мультиферментных систем могут являться экологические особенности *P. luminescence*, на определенном этапе своей циркуляции в симбиотически-паразитарной системе «бактерия – нематода – насекомое» призванных обеспечивать свечение тела личинки насекомого, что предполагает тесную степень контакта с его гуморальными и клеточными механизмами противoinфекционной резистентности [15]. Соответственно даже при освобождении ферментных систем из тела бактериальной клетки при ее гибели, но с сохранением их структурно-функциональной целостности и в условиях возобновляемого притока продуктов перекис-

ного окисления липидов, определяемого активностью кислородзависимых систем фагоцитов, интенсивность биолюминесценции может сохраняться и даже нарастать.

При проведении исследований с использованием в качестве объекта для фагоцитоза третьего из изученных рекомбинантных штаммов *E. coli Z905*, созданного на основе иноного реципиента, но вновь несущего генетическую конструкцию с *lux*-опероном морского люминесцирующего микроорганизма вида *P. leiognathi*, сделанное предположение о зависимости биолюминесцентного отклика в фагоцитарной системе от природы клонированной ферментной системы генерации свечения получило свое подтверждение. Так в первые 50-65 секунд после введения в фагоцитарную систему данный рекомбинантный штамм демонстрировал рост интенсивности свечения, в данном случае несколько превышающий уровень аналогичной реакции у «Эколюм-9» и достигающий 161,9±1,2% от исходного. Дальнейшие же события, происходящие на фоне регистрируемого бактериологическим методом падения количества жизнеспособных бактериальных клеток, вновь заключались в синхронном снижении интенсивности биолюминесценции до 46,5±4,8% от исходного (коэффициент корреляции между названными параметрами  $r = 0,93$ ;  $t = 7,03$ ;  $P < 0,001$ ).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют существование зависимости биолюминесцентного отклика рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* при их введении в фагоцитарную систему от природы клонированных *lux*-оперонов. При этом, несмотря на априорную предпочтительность использования в составе таких генно-инженерных конструкций *luxCDABE* генов почвенного люминесцирующего микроорганизма *P. luminescence*, кодирующих ферментную систему с температурным оптимумом 35-37° С, для заявленных целей более предпочтительным оказывается использование генетического материала морской люминесцирующей бактерии *Photobacterium leiognathi*, что позволяет достичь прямой зависимости результативного параметра (интенсивности свечения) от выраженности развивающегося в этих условиях киллингового эффекта.

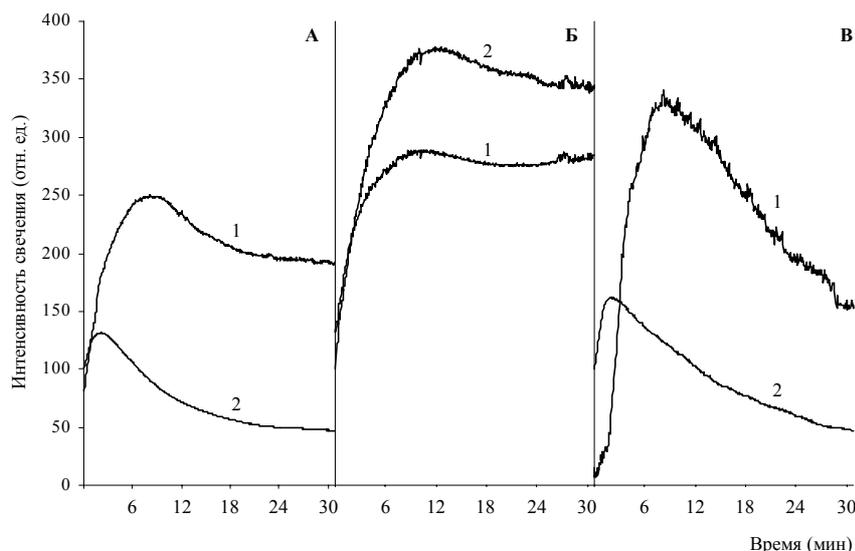


Рисунок 1. Кинетика хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови человека (1) и биолюминесценции рекомбинантных штаммов *E. coli* (2) с клонированными *lux*-операонами *P. leiognathi* 54D10 (а); *P. luminescence* Zm1 (б) и *P. leiognathi* (в) при их взаимодействии в фагоцитарной системе.

Сказанное также свидетельствует в пользу необходимости использования в технологии биолюминесцентного метода оценки фагоцитоза не абстрактных генно-инженерных

микроорганизмов, в наиболее общем виде обозначаемых как *lux+* [3], но, напротив, рекомбинантных штаммов с жестко контролируемыми по происхождению *lux*-операонами.

#### Список использованной литературы:

1. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 2000. – 608 с.
2. Рудик Д.В., Тихомирова Е.Н. Методы изучения процесса фагоцитоза и функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток. – Саратов: СГУ, 2006. – 112 с.
3. Хаитов Р.М., Пенегин Б.В. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса // Иммунология. – 1995. – №3. – С. 3-8.
4. Ширишев С.В., Куклина Е.М., Заморина С.А., Никитина Н.М., Некрасова И.В. Способ определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови человека по степени гашения биолюминесценции // Патент РФ на изобретение №2292553, опубл. 27.01.2007, Бюлл. №3.
5. Дерябин Д.Г., Поляков Е.Г. Влияние сыворотки крови человека на уровень свечения природных и рекомбинантных люминесцирующих бактерий // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2004. – №9. – С. 311-315.
6. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е. и др. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе *lux*-операонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник МГУ. Сер.16. Биология. – 2002. – №3. – С. 20-24.
7. Илларионов Б.А., Протопопова М.В. Клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi* в плазмидном векторе pUC18 // Генетика. – 1985. – №6. – С. 10-13.
8. Дерябин Д.Г., Грудинин Д.А., Каримов И.Ф. Обоснование оптимального режима опсонизации рекомбинантных люминесцирующих бактерий // Вестник ОГУ. – 2006. – №12. – С. 6-10.
9. Хейфец Л.Б., Абалакина В.А. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности фиколл-верографин // Лаб. дело. – 1973. – №10. – С. 579-581.
10. Дерябин Д.Г., Никиян А.Н., Каримов И.Ф., Грудинин Д.А. Кюветное определение для биоchemiluminoметра // Патент РФ на полезную модель №64373 опубл. 27.06.2007, Бюлл. №18.
11. Дерябин Д.Г., Никиян А.Н., Каримов И.Ф., Грудинин Д.А. Устройство для измерения хемилюминесценции и биолюминесценции // Патент РФ на полезную модель №49998, опубл. 10.12.2005, Бюлл. №34.
12. Albrecht D., Jungi T.W. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes // J.Leucocyte Biol. – 1993. – V.54. – N4. – P. 300-306.
13. Исмаилов А.Д., Берия Л.В., Данилов В.С. Ферментативный и неферментативный процессы перекисного окисления липидов в бесклеточном экстракте *Vibrio harveyi* // Микробиология. – 1994. – Т. 63. – №3. – С. 466-472
14. Forst S., Nealon K. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. // Microbiol. rev. – 1996. – V.60 – N1. – P. 21-43.
15. Silva C.P., Waterfield N.R., Daborn P.J. et al. Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta* // Cell. Microbiol. – 2002. – V.4. – N6. – P. 329-339.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-96906-р\_офи.