

## ВЛИЯНИЕ ТРОМБОЦИТАРНОГО КАТИОННОГО БЕЛКА НА БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* С КЛОНИРОВАННЫМ *LUX*-ОПЕРОНОМ *PHOTOBACTERIUM LEIOGNATHI*

Установлена высокая чувствительность биолюминесцентного отклика рекомбинантного штамма *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. leiognathi* 54D10 к воздействию тромбоцитарного катионного белка (ТКБ). Определенные для ТКБ величины IC50, соответствующие пятидесятипроцентной ингибиции интенсивности свечения от исходного уровня, составили в подобной системе 3,3-7,1 мкг/мл. Показано, что концентрационные зависимости подавления биолюминесценции в присутствии ТКБ примерно на порядок уступают развитию истинного бактерицидного эффекта в отношении использованных бактериальных клеток-мишеней. В качестве одной из возможных причин подобного явления названо прямое ингибирующее воздействие ТКБ на ферментную систему генерации свечения.

Важным фактором неспецифической иммунологической защиты представителей царства *Animalia*, начиная от беспозвоночных [1] и заканчивая млекопитающими и человеком [2], являются катионные антимикробные пептиды (КАМП). Последние представляют собой обширную группу неферментных белков с молекулярной массой от 2 до 10 kDa, за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностью микробной клетки способных оказывать на нее прямое бактерицидное действие [3]. В частности, подобные свойства демонстрирует тромбоцитарный катионный белок (ТКБ), освобождающийся из гранул тромбоцитов в процессе свертывания крови и ответственный за обеспечение стерильности образующегося сгустка [4].

Несмотря на достигнутый за последние десятилетия существенный прогресс в понимании патогенетического [5] и терапевтического значения КАМП [6], технологии их обнаружения и количественной оценки по-прежнему базируются на рутинных микробиологических подходах, заложенных А. Petterson еще в 20-30-е годы прошлого века. Так наиболее распространенным методом определения ТКБ остается анализ его бактерицидного эффекта в отношении эталонного штамма *Bacillus subtilis* ГИСК 010011 и других аэробных спорообразующих бактерий, в силу особенностей организации своих поверхностных структур проявляющих высокую чувствительность к действию данного вещества [7].

Перспектива изменения подобной ситуации возникла к концу XX века как результат клонирования генов люминесценции (*lux*-оперонов)

природных морских и почвенных микроорганизмов в широком круге патогенных и условно-патогенных бактерий [8, 9]. При этом сопряженность между количеством клеток, сохранивших свою жизнеспособность после воздействия бактерицидных агентов, и интенсивностью свечения реакционной смеси позволила разработать быстрые и чувствительные подходы к оценке антимикробного потенциала биологических жидкостей [10] и клеточных суспензий [11]. Применительно же к вопросу о биолюминесцентной детекции катионных антимикробных пептидов в качестве известного примера следует назвать предложенный Hilpert K. et Hancock R.E. [12] способ быстрого скрининга выхода короткоцепочечных КАМП при их искусственном синтезе на целлюлозном носителе с использованием в качестве индикаторного микроорганизма рекомбинантного люминесцирующего штамма *Pseudomonas aeruginosa* H1001 (*fliC:luxCDABE*).

Целью настоящей работы явилось развитие подобного подхода, а именно экспериментальное исследование влияния тромбоцитарного катионного белка человека на рекомбинантный штамм *Escherichia coli* с клонированным *lux*-опероном *Photobacterium leiognathi* с определением соответствия между параметрами биолюминесценции и долей бактериальных клеток, в отношении которых развивается бактерицидный эффект.

При выполнении работы использовался штамм *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. leiognathi* 54D10, выпускаемый МГУ им. М.В. Ломоносова под коммерчес-

ким названием «Эколом-9» [13] и демонстрирующей способность к конституитивному свечению без дополнительного внесения субстратов люминесцентной реакции. Перед проведением исследований данный микроорганизм восстанавливали из лиофилизированного состояния добавлением холодной дистиллированной воды и выдерживали в течение 30 минут при 4° С для реактивации биолюминесценции. Биомассу стандартизировали по оптической плотности при 540 нм на спектрофотометре «СФ-46» до значений 0,5, 0,25 и 0,125 ед.

В качестве бактерицидного начала использовали выделенный из тромбоцитов человека и хроматографически очищенный катионный белок с содержанием 70 мг/мл (по Лоури). Рабочие двукратные разведения ТКБ составляли от 0,0875 до 56 мкг/мл.

Реакционную систему формировали путем внесения 0,1 мл суспензии люминесцирующих бактерий в 0,9 мл раствора ТКБ; в качестве контроля использовали те же количества бактерий, вносимые в аналогичный объем растворителя. Полученные опытную и контрольную смеси инкубировали в течение 10 минут при 30° С в термостатируемой измерительной ячейке двухканального биолюминометра 8802М2К (СКТБ «Наука», Красноярск). Регистрацию интенсивности свечения осуществляли в непрерывном режиме, осуществляя расчет эффектов ТКБ на интенсивность бактериальной биолюминесценции по формуле:

$$\frac{\sum_{импК} - \sum_{импО}}{\sum_{импК}} \times 100\%$$

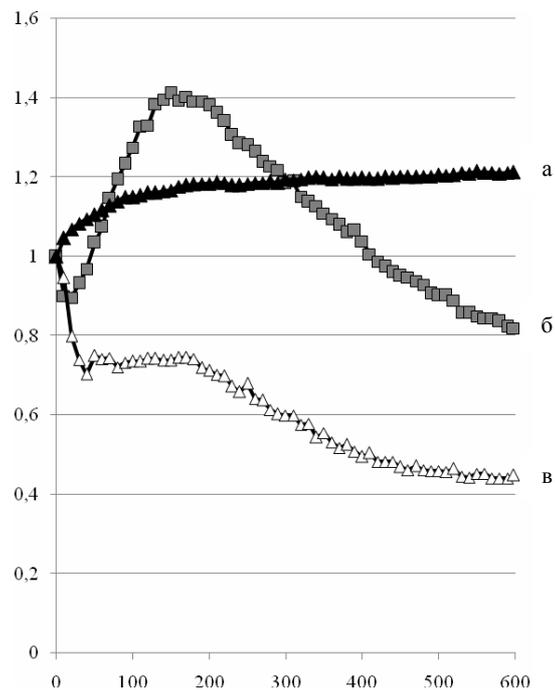
где УимпК – сумма импульсов, испускаемых в контроле на n-й секунде эксперимента, УимпО – сумма импульсов, испускаемых в опыте на n-й секунде эксперимента.

Для оценки бактерицидного эффекта ТКБ в отношении используемых клеток-мишеней из опытных и контрольных проб по истечении 10 минут контакта отбирали аликвоты по 10 мкл, которые высеивали на чашки с ВСР-агаром (Bio-Merieux, Франция) с добавлением ампициллина в конечной концентрации 200 мкг/мл (селективный маркер для использованного рекомбинантного штамма *E. coli*). Учет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили после дополнительной 18-24 часовой инкубации при 37° С.

Исследование влияния ТКБ в отношении бесклеточной ферментной системы генерации свечения проводили с использованием «Комплекта реактивов для биолюминесцентного анализа» (Институт биофизики СО РАН, Красноярск), представляющего собой смесь хроматографически очищенных и лиофильно высушенных ферментов – люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы морской люминесцирующей бактерии *Photobacterium leiognathi*. В качестве субстратов в реакционную смесь вносили миристиновый (C<sub>14</sub>) альдегид (Merck, Германия), флаavinмоноклеотид (Sigma, США) и восстановленный никотинамиддинуклеотид (AppliChem, Германия).

Все исследования выполнены не менее чем в трех повторностях, после чего обработаны рутинными методами статистического анализа с использованием программы «Statistica». Расчет величин IC50 и LD50 осуществлен с использованием специализированной программы «LD50 (ver. 0.2)» (НПП «Наука Плюс»).

На первом этапе проведения исследований установлен дозозависимый отклик биолюминес-

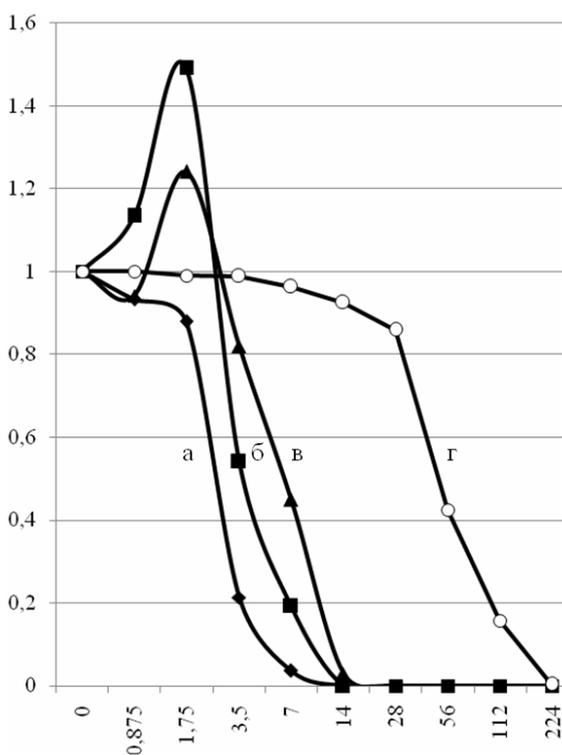


По оси абсцисс – время наблюдения, сек.; по оси ординат – интенсивность свечения, отн.ед.

Рисунок 1. Кинетика биолюминесценции рекомбинантного штамма *E. coli* с клонированным *lux*-опероном *P. leiognathi* при воздействии различных концентраций ТКБ: а - 0,1 мкг/мл; б - 3,5 мкг/мл; в - 7 мкг/мл.

ценции рекомбинантного штамма *E. coli* с клонированным *lux*-опероном *P. leiognathi* на воздействие ТКБ (рисунок 1). Так в диапазоне концентраций ТКБ от 0,0875 до 0,56 мкг/мл регистрировалось развивающееся во времени увеличение интенсивности свечения, к 10-й минуте контакта не превышающее 119-125% от контрольных значений. При увеличении воздействующих концентраций ТКБ до 0,7 мкг/мл кинетика биолюминесценции бактериальных клеток-мишеней становилась двухфазной: с первоначальным ростом на 140% к 160-й секунде контакта и последующим снижением до 80% от контрольных значений. Наконец эффект ТКБ в концентрациях от 5 мкг/мл и выше заключался только в прогрессирующем подавлении интенсивности свечения штамма *E. coli* с клонированным *lux*-опероном *P. leiognathi* вплоть до нулевых значений.

Причины подобного дозозависимого отклика могут объясняться механизмами действия



По оси абсцисс – концентрации ТКБ, мкг/мл; по оси ординат – значения резульативных параметров, %. Обозначения: а – при ОП=0,125 ед.; б - при ОП=0,25 ед.; в,г - при ОП=0,5 ед.

Рисунок 2. Расчет значений IC50 (а,б,в) и LD50 (г), характеризующих воздействие ТКБ на биолюминесценцию и жизнеспособность рекомбинантного штамма *E.coli* с клонированным *lux*-опероном *P.leiognathi*.

ТКБ и прочих КАМП на грамотрицательные бактерии, первоначально реализующиеся через связывание с их отрицательно заряженными наружными мембранами [3, 5]. При небольшой интенсивности воздействия это может вести к умеренному увеличению ее проницаемости и способно оказать на интенсивность свечения временное стимулирующее воздействие. Увеличение же действующих концентраций КАМП резульатируется в нарушении структуры наружной мембраны с проникновением катионных пептидов в периплазматическое пространство и далее в цитоплазму, где, связываясь с клеточными полианионами (такими, как ДНК и РНК), они и вызывают гибель бактериальной клетки.

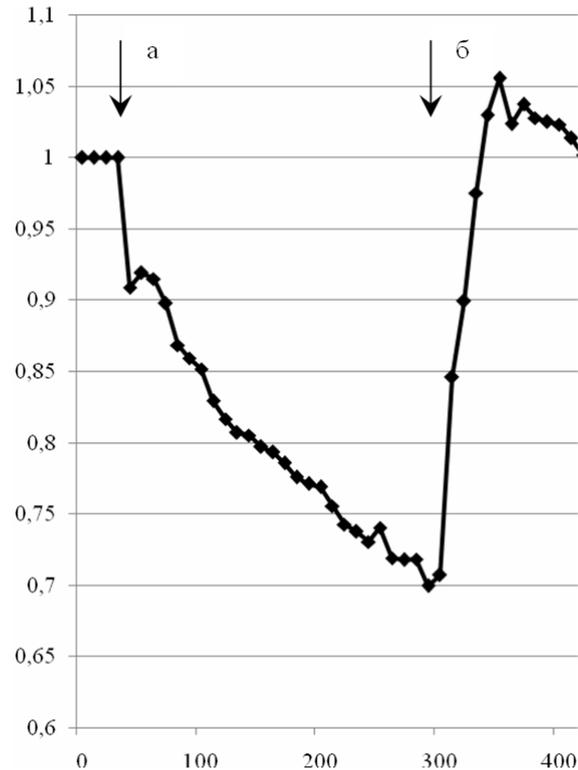
Расчет величин IC50, соответствующих пятидесятипроцентной ингибиции интенсивности биолюминесценции от исходного уровня (рисунок 2), позволил констатировать достаточно высокую чувствительность использованного резульативного параметра к воздействию ТКБ, характеризуемую несколькими микрограммами вещества в миллилитре. Одновременно полученные резульаты свидетельствовали о зависимости определяемых значений IC50 от количества присутствующих в реакционной смеси бактериальных клеток-мишеней, что может объясняться необходимостью необратимого связывания с каждой из них определенного количества ТКБ как условия для достижения требуемого эффекта. Так при использовании суспензии рекомбинантного штамма *E. coli* с клонированным *lux*-опероном *P. leiognathi* с оптической плотностью (OD) 0,125 ед. рассчитанные значения IC50 равнялись 3,3 мкг/мл, в то время как при увеличении OD до 0,25 значения IC50 составили 5,4 мкг/мл, а при OD = 0,5 ед. возрастали до IC50 = 7,1 мкг/мл.

Проведенное на следующем этапе работы исследование выраженности истинного бактерицидного эффекта ТКБ в отношении рекомбинантного штамма *E. coli* с клонированным *lux*-опероном *P. leiognathi* позволило зафиксировать типичную S-образную зависимость резульативного параметра от используемой концентрации действующего агента (рисунок 2). При этом в диапазоне концентраций ТКБ от 0 до 14 мкг/мл достоверное влияние на жизнеспособность бактериальных клеток-мишеней не выявлялось, а при превышении указанного поро-

га регистрировался прогрессирующий рост значений бактерицидности вплоть до 100% подавления роста при превышении концентрации ТКБ >224 мкг/мл. При этом рассчитанное на примере суспензии исследуемого штамма с OD = 0.5 ед. значение параметра LD50, соответствующего развитию бактерицидного эффекта в отношении половины присутствующих в пробе клеток-мишеней, составило 78,1 мкг/мл.

Таким образом, при соответствии общего характера зависимостей подавления биолюминесценции и развития бактерицидного эффекта от используемых концентраций ТКБ первый из использованных параметров демонстрировал выраженную опережающую динамику. В частности, определенные в одном и том же эксперименте значения IC50 уступали величинам LD50 более чем на порядок. Вероятной причиной этого может являться описанный выше комплексный механизм влияния ТКБ на жизнеспособность бактериальных клеток, где подавление их энергетики с закономерным снижением интенсивности биолюминесценции может возникать уже на начальных этапах данного процесса. Другой же вероятной причиной является прямое взаимодействие ТКБ с ферментной системой генерации свечения, условием для чего является допускающая возможность подобного контакта преимущественно мембранная локализация бактериальных люцифераз [14].

Для проверки последнего предположения на завершающем этапе работы нами было оценено влияние ТКБ на активность бесклеточной ферментной системы генерации свечения *P. leiognathi* (рисунок 3). При этом внесение ТКБ в концентрации 7 мкг/мл в реакционную смесь вело к подавлению интенсивности свечения на 30% от контрольных значений, что может объясняться его взаимодействием с ферментным комплексом «люцифераза - NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза» или одним из субстратов люминесцентной реакции. На этом фоне внесение с смесь дополнительных количеств (50 мкл) раствора ферментов полностью восстанавливало интенсивность свечения (рисунок 3), в то время как аналогичные манипуляции с субстратами – миристиновым альдегидом или флавиномононуклеотидом не сопровождалась подобным эффектом (на рисунке не показано). Соответственно приведенные данные подтверждают возможность подав-



По оси абсцисс – время наблюдения, сек.; по оси ординат – интенсивность свечения, отн. ед. Стрелками обозначены: а – момент внесения ТКБ; момент внесения дополнительных количеств биферментной системы «люцифераза - NADH:FMN-оксидоредуктаза».

Рисунок 3. Влияние ТКБ на активность ферментной системы генерации свечения *P. leiognathi*.

ления бактериальной биолюминесценции в том числе и как результата взаимодействия ТКБ с ферментной системой генерации свечения, вновь возникающего за счет электростатических взаимодействий и ведущего к опережающему по сравнению с бактерицидным эффектом подавлению биолюминесценции.

В целом полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности биолюминесцентной детекции тромбоцитарного катионного белка и, вероятно, других катионных антимикробных пептидов. В частности, подобное оказывается возможным с использованием в качестве тест-объекта рекомбинантного штамма *E. coli* с клонированным *lux*-опероном *P. leiognathi*, в настоящее время доступного для широкого круга исследователей под коммерческим названием «Эколюм-9». При этом подобный подход может быть реализован при быстром качественном скри-

нинге искусственно создаваемых в рамках «лингвистической» концепции катионных пептидов [15] или выявлении веществ с аналогичной активностью при хроматографическом, электрофоретическом или ином фракционировании.

С другой стороны, достаточно высокая чувствительность биосенсора «Эколюм-9» и к прочим присутствующим в сыворотке крови и иных биологических жидкостях человека и животных бактерицидным системам [10] не позволяет оце-

нивать получаемый с его использованием результат как «специфичный». Перспектива же достижения подобного результата представляется возможной через создание нового рекомбинантного люминесцирующего биосенсора на основе микроорганизмов вида *Bacillus subtilis*, традиционно используемых для обнаружения ТКБ в биологических жидкостях сложного компонентного состава [7]. Продолжению работ в этом направлении будут посвящены наши дальнейшие исследования.

**Список использованной литературы:**

1. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms // Nature. 2002, V.415, P.389-395
2. Ganz T., Lehrer R. I. Antimicrobial peptides of vertebrates // Curr. Opin. Immunol. 1998, N10, P.41-44
3. Hancock R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials // Lancet Infect. Dis. 2001, N1, P.156-164
4. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. Екатеринбург: УрО РАН, 2000
5. Voman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // Ann. Rev. Immunol. 1999, V.13, P.61-92
6. Hancock R.E. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications // Expert. Opin. Investig Drugs. 2000, V.9, P.1723-1729
7. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Система бета-лизина и ее роль в клинической и экспериментальной медицине. - Томск, ТГУ, 1977.
8. Forde C.B., Parton R., Coote J.G. Bioluminescence as a reporter of intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in murine phagocytes // Infect. Immun. 1998, V.66, № 7, P.3198-3207
9. Snewin V., Gares M.P., Gaora P., Hasan Z., Brown I., Young D. Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs // Infect. Immun. 1999, V.67, P. 4586-4593
10. Дерябин Д.Г., Поляков Е.Г. Определение бактерицидной активности сыворотки крови с использованием рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* // Клиническая лабораторная диагностика. 2005, №2, С.53-55
11. Дерябин Д.Г., Грудинин Д.А., Каримов И.Ф. Обоснование оптимального режима опсонизации рекомбинантных люминесцирующих бактерий // Вестник Оренбургского гос. ун-та. 2006, №12, С.6-10
12. Hilpert K., Hancock R.E. Use of luminescent bacteria for rapid screening and characterization of short cationic antimicrobial peptides synthesized on cellulose using peptide array technology // Nature Protocols. 2007, V.2, P.1652-1660
13. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ершников Г.Е. и др. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник МГУ. Сер.16. Биология. – 2002. – №3. – С.20-24.
14. Angell P., Langley D., Chamberlain A.H.L. Localisation of luciferase in luminous marine bacteria by gold immunocytochemical labelling // FEMS Microbiology Letters. 1989, V.65, № 1-2, P.177-181.
15. Loose C., Jensen K., Rigoutous I., Stephanopoulos G. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides // Nature. 2006, V.443, P.867-869

**Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта**

**РФФИ № 08-04-13726-офи\_ц «Разработка биолюминесцентной технологии количественного определения катионных антимикробных пептидов в биологических субстратах».**