

ВЛИЯНИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ НА ВОСПРИЯТИЕ ГОМОСЕРИНЛАКТОНОВ В ТЕСТЕ ИНДУКЦИИ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ *ESCHERICHIA COLI luxR⁺ luxI⁻luxCDABE*

На модели репортерного люминесцирующего штамма *E. coli* JLD271, *pAL103; luxR⁺luxI⁻luxCDABE* исследовано влияние алкилоксибензолов (АОБ) – индукторов перехода в гипометаболическое состояние, на способность бактерий к восприятию гомосеринлактонов (ГСЛ) – медиаторов их плотностно-зависимой коммуникации. Установлено, что при совместном внесении АОБ не изменяют чувствительности бактерий к ГСЛ, в то время как использование режима предварительной обработки бактерий АОБ концентрационно-зависимо снижает интенсивность последующего люминесцентного отклика при индукции ГСЛ. Показана зависимость репрессии биolumинесценции от длины алкильного радикала и связанной с этим гидрофобности молекул АОБ, определяющих выраженность их ингибирующего эффекта на клеточный метаболизм.

Ключевые слова: quorum sensing, гомосеринлактоны, алкилоксибензолы, *lux*-гены, биolumинесценция.

Современный взгляд на микробные сообщества предполагает их существование в качестве сложных сетевых структур, использующих для межклеточной коммуникации специализированные малые молекулы [1]. Одним из примеров является плотностно-зависимая коммуникация, получившая название «чувство кворума» (англ. – quorum sensing) и более чем у 450 видов грамотрицательных бактерий опосредованная системами образования и восприятия гомосеринлактонов (ГСЛ) [2]. В частности, в так называемых *luxR/luxI* системах синтезируемые под контролем гена *luxI* ГСЛ диффундируют через клеточную мембрану, аккумулируются по мере увеличения плотности бактериальной популяции, после чего взаимодействуют с кодируемым геном *luxR* рецепторным белком. Итоговым следствием этих событий является димеризация комплекса «рецепторный белок – ГСЛ» и его связывание с промоторами целевых генов с последующим запуском транскрипции ферментных систем биolumинесценции, образованием факторов вирулентности и формированием биопленок [3].

В связи с тем, что описанный механизм используется многими зоопатогенными и фитопатогенными бактериями, разработка эффективных систем управления «чувством кворума» в настоящее время рассматривается в качестве нового метода контроля инфекционных состояний [4]. При этом в качестве потенциальных путей ингибирования «чувства кворума» предполагается подавление синтеза ГСЛ, дегра-

дация медиаторных молекул специфическими ферментами (лактоназами), ингибирование связывания ГСЛ с соответствующими рецепторными белками, а также подавление активности целевых генов [5].

Если ГСЛ «оценивают» минимальную плотность клеточной популяции, достаточную для активации экспрессии генов стационарной фазы, то другие малые молекулы контролируют максимально возможную для данных условий численность клеток в пролиферирующей культуре. У значительного количества микробных видов этот тип ауторегуляторов представлен изомерами и гомологами алкилоксибензолов (АОБ) [6], механизм действия которых обусловлен способностью к физико-химическим взаимодействиям и комплексообразованию с функциональными биополимерами и мембранными структурами [7]. В результате при достижении порогового концентрационного уровня, коррелирующего с увеличением численности клеток в развивающейся культуре, АОБ индуцируют остановку клеточного деления и переход в стационарную фазу роста, а при дальнейшем повышении концентрации – образование гипометаболических и покоящихся форм [8].

Сказанное позволяет утверждать, что исследование взаимодействия двух названных ауторегуляторных молекул имеет как собственное научное значение, так и важные прикладные аспекты, определяемые перспективой использования естественных механизмов

межклеточной коммуникации для контроля и управления «чувством кворума» бактериальных патогенов. В этой связи целью настоящей работы стало исследование влияния АОБ на способность микроорганизмов к восприятию ГСЛ, реализованное на модели генноинженерного люминесцирующего штамма *Escherichia coli* с генами биолуминесценции, клонированными под контролем гена *luxR*.

Материалы и методы

При проведении исследований использованы химически синтезированные аналоги ауторегуляторных факторов бактерий со степенью очистки 99%. В качестве индуктора «чувства кворума» использован N-гексаноил-L-гомосеринлактон (C_6 -ГСЛ) производства «Саутман Chemical Company» (США). В качестве аналогов малых регуляторных молекул, модифицирующих восприятие ГСЛ, использованы три гомолога АОБ, различающиеся длиной гидрофобного углеводородного (алкильного) радикала: метил-оксибензол (C_1 -АОБ; «Sigma», США), гексил-оксибензол (C_6 -АОБ; «Sigma», США) и додецил-оксибензол (C_{12} -АОБ; «Enamine», Украина). Структурные химические формулы данных молекул приведены на рисунке 1.

В качестве объекта воздействия использован штамм *Escherichia coli* JLD271, *pAL103*; *luxR*+*luxI* *luxCDABE*; *TetR**p15A*, ранее разработанный А. Lindsay и В.М. Ahmer [9]. Его особенностью являлось наличие плазмиды *pAL103*, в составе которой кассета генов биолуминесценции *luxCDABE* клонирована под

контролем гена *luxR*, воспринимающего C_6 -оксо-ГСЛ и C_6 -ГСЛ. При этом в отсутствие гена *luxI*, ответственного за синтез собственного аутоиндуктора, биолуминесценция подобной конструкции возможна только в присутствии экзогенно вносимого ГСЛ. Кроме того, для повышения чувствительности данной репортерной системы она клонирована в хозяйском штамме *E. coli* JLD271 с мутацией в гене *sdiA*, продукт которого также распознает ГСЛ и мог бы конкурировать с *luxR* за его связывание. В качестве контрольного использован нелюминесцирующий штамм *E. coli pAL 104*; *luxI*::*luxCDABE* (*luxR*⁻).

Перед проведением исследований *E. coli* выращивали в течение 16–18 часов при 37 °С в LB-бульоне («Sigma», США) в присутствии 12 мкг/мл антибиотика доксицилина, являющегося селективным фактором плазмиды *pAL103*. Непосредственно перед постановкой эксперимента культуру разводили той же свежей питательной средой и дополнительно подращивали в течение 3–5 часов до достижения оптической плотности 0,5 ед. при 450 нм. Проверку чувствительности системы проводили путем ее индукции C_6 -ГСЛ в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-6} М. Исследование влияния АОБ на способность модельных микроорганизмов к восприятию ГСЛ проводили в двух вариантах постановки эксперимента. В первом из них в ячейки 96-луночного планшета из непрозрачного пластика («Thermo», США) одномоментно вносили по 100 мкл бактериальной культуры, C_6 -ГСЛ в концентрации 10^{-4} М, а также C_1 -АОБ, C_6 -АОБ или C_{12} -АОБ в концентрациях 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} М. В контрольных вариантах ГСЛ или АОБ заменяли равными объемами растворителя. Второй вариант предполагал предварительную часовую инкубацию бактериальной культуры с АОБ в указанных выше концентрациях, после чего в реакционную смесь вносили разрешающую дозу C_6 -ГСЛ. После этого планшеты помещали в термостатируемый измерительный блок биолуминометра LM 01T («Immunotech», Чехия), с использованием которого в течение 60 минут проводили динамическую регистрацию интенсивности развивающегося свечения опытных и контрольных образцов, осуществляя оценку и архивирование полученных данных с использованием штатного программного обеспечения KILIA. Степень

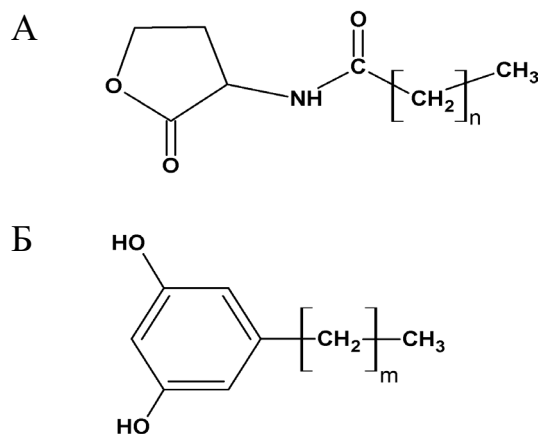


Рисунок 1. Структурные формулы ГСЛ (А) и АОБ (Б), где $n = 4$; $m = 0, 5$ или 11

индукции биолюминесценции (I) определяли как отношение интенсивности свечения исследуемого образца на n-ой и 0-ой минутах исследования, соотнося полученные величины с аналогичными значениями в контроле.

Результаты и обсуждение

Исследование кинетики биолюминесцентного отклика *E. coli* JLD271, *pAL103*; *luxR*⁺ *luxI*_{-luxCDABE}; *TetR* *p15A* в присутствии различных концентраций C_6 -ГСЛ позволило констатировать дозозависимый характер индукции свечения после 5–10-минутного инкубационного периода, прогрессивно возрастающего к максимумам на 50–60-й минутах контакта (рисунок 2А). Характеризующие амплитуду подобного ответа значения биолюминесцентного индекса (I) при использовании C_6 -ГСЛ в концентрациях 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} М составили 12, 46 и 197 отн. ед. соответственно. При этом достижение выраженного люминесцентного отклика в присутствии максимальной тестируемой концентрации ауторегулятора явилось основанием ее использования при последующей оценке эффектов АОБ на способность модельного микроорганизма к восприятию C_6 -ГСЛ.

В первой серии экспериментов было изучено одновременное сочетанное воздействие смесей C_6 -ГСЛ с C_1 -АОБ, C_6 -АОБ и C_{12} -АОБ, каждый из которых был тестируван в концентрациях 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} и 10^{-6} М. При этом проведенные измерения и вычисления не выявили существенных различий динамики развития свече-

ния и достигаемых кратностей его индукции (рисунок 2Б), что свидетельствовало об отсутствии прямой конкуренции между АОБ и ГСЛ за связывание с воспринимающим белком *luxR*.

При проведении второй серии экспериментов, предполагающей предварительное воздействие АОБ на модельный организм, напротив, было зафиксировано подавление интенсивности последующего биолюминесцентного отклика как реакции на индукцию C_6 -ГСЛ. В частности, в случае использования данных молекул в эквимольных концентрациях эффекты АОБ заключались в более медленной динамике прироста свечения (рисунок 2В), а у двух из них также и в значимом снижении величин I к 60-й минуте контакта. Так предварительная обработка бактериальных клеток C_6 -АОБ и C_{12} -АОБ в концентрации 10^{-4} М снижала уровень последующей индукции до 68,1% и 71,4% от контрольных значений соответственно (таблица). В свою очередь увеличение действующих концентраций C_6 -АОБ и C_{12} -АОБ до 10^{-3} М полностью отменяло развитие биолюминесценции, а их снижение до 10^{-5} М делало различия в опыте и контроле незначимыми. На этом фоне наиболее короткоцепочечный гомолог C_1 -АОБ в использованной системе показывал себя как биологически инертное соединение.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности частичной интерференции между АОБ и ГСЛ при развитии направляемого гомосеринлактонами «чувства

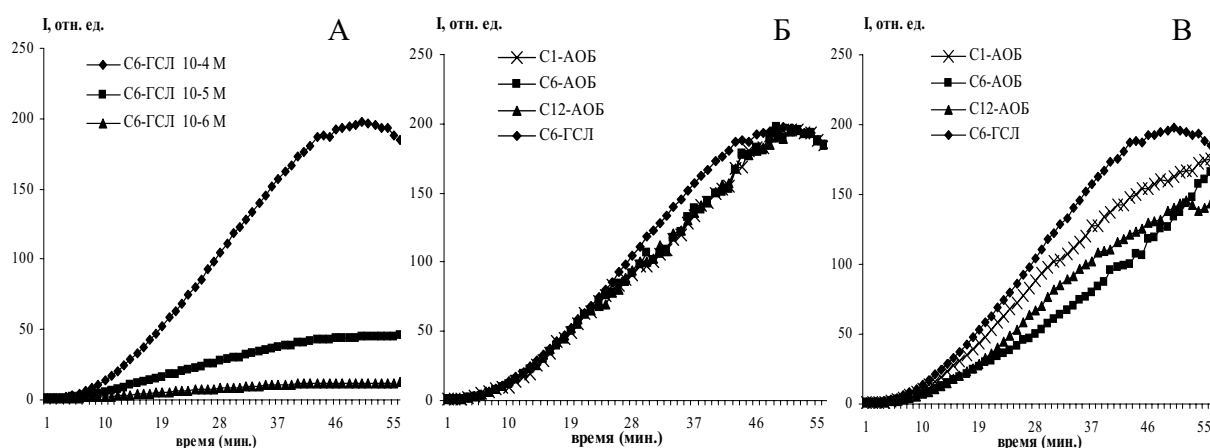


Рисунок 2. Динамика биолюминесценции *E. coli* JLD271, *pAL103*; *luxR*⁺ *luxI*_{-luxCDABE}; *TetR* *p15A* в присутствии различных концентраций C_6 -ГСЛ (А), а также комбинаций C_6 -ГСЛ с АОБ в концентрациях 10^{-4} М при одновременном (Б) и последовательном (В) воздействии (пояснения в тексте)

Таблица 1. Относительные значения биолюминесценции (в процентах от соответствующего контроля), зафиксированные при индукции *E. coli* JLD271, pAL103; *luxR*+*luxI*_*luxCDABE*; *TetR p15A* с использованием *C*₆-ГСЛ после предварительной 60-минутной инкубации в контакте с АОБ

Концентрации АОБ	<i>C</i> ₁ -АОБ	<i>C</i> ₆ -АОБ	<i>C</i> ₁₂ -АОБ
10 ⁻³ М	110,4	0	0
10 ⁻⁴ М	82,7	68,1	71,4
10 ⁻⁵ М	100,0	101,2	88,7
10 ⁻⁶ М	78,9	99,5	103,5

кворума» у бактерий. При этом природа подобного эффекта не связана с прямой конкуренцией между названными ауторегуляторными молекулами, но опосредована системным воздействием алкилорксибензолов на клеточный метаболизм. Об этом свидетельствуют: 1) зависимость выраженности репрессии биолюминесценции от размера гидрофобного алкильного

радикала в молекуле АОБ, коррелирующего с выраженностью рост-ингибирующей активности данных соединений [10]; 2) важность предварительного контакта АОБ с бактериальными клетками, необходимого для формирования их устойчивых комплексов с функциональными биополимерами и мембранными структурами [7]. Тем не менее, выявленные эффекты представляются достаточно значимыми для характеристики механизмов межклеточной коммуникации в природных бактериальных сообществах, а также могут рассматриваться как один из шагов на пути разработки инновационных подходов к управлению коллективным поведением микроорганизмов с использованием химических аналогов малых ауторегуляторных молекул.

30.03.2012

**Исследования выполнены при финансовой поддержке
Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной
России» на 2009–2013 гг. (контракт № П327)**

Список литературы:

1. Гинцбург, А.Л. «Quorum sensing» или социальная жизнь бактерий / А.Л. Гинцбург, Т.С. Ильина, Ю.М. Романова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2003. – №5. – С. 86–93.
2. Грузина, В.Д. Коммуникативные сигналы бактерий / В.Д. Грузина // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48. – №10. – С. 32–39.
3. Хмель, И.А. Quorum sensing регуляция экспрессии генов – перспективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерий / И.А. Хмель, А.З. Метлицкая // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – №2. – С. 195–210.
4. Hentzer, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections / M. Hentzer, M. Givskov // J. Clin. Invest. – 2003. – V. 112. – P. 1300–1307.
5. Parsek, M.R. Acyl homoserine-lactone quorum sensing signal generation / M.R. Parsek, D.L. Val, B.L. Hanzelka, J.E. Cronan, Jr., E.P. Greenberg // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – V. 96. – P. 4360–4365.
6. Эль-Регистан, Г.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов / Г.И. Эль-Регистан [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – №4. – С. 446–456.
7. Мулюкин, А.Л. Видонеспецифичность действия низкомолекулярных ауторегуляторов – неацилированного лактона гомосерина и гексилрезорцина – на рост и развитие бактерий / А.Л. Мулюкин [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – №4. – С. 472–482.
8. Николаев, Ю.А. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов / Ю.А. Николаев, А.Л. Мулюкин, И.Ю. Степаненко, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – №4. – С. 489–496.
9. Lindsay, A. Effect of sdiA on Biosensors of N-Acylhomoserine Lactones / A. Lindsay and B. M. M. Ahmer // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187. – P. 5054–5058.
10. Николаев, Ю.А. Антимикробные свойства микробных липидов / Ю.А. Николаев [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. – №2. – С. 172–179.

Сведения об авторах:

Камаева Анара Аманжуловна, магистрант кафедры микробиологии
Толмачева Анна Александровна, студент кафедры микробиологии
Дерябин Дмитрий Геннадьевич, заведующий кафедрой микробиологии
Оренбургского государственного университета, доктор медицинских наук, профессор
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: dgderyabin@yandex.ru

UDC 57.052; 579.22**Kamaeva A.A., Tolmacheva A.A., Deryabin D.G.****ALKYLRESORCINOLS INFLUENCE ON HOMOSERINE LACTONES PERCEPTION IN THE LUMINESCENCE INDUCTION TEST OF THE *Escherichia coli luxR* + *luxI*_*luxCDABE***

On model of a reporter luminescent strain *E. coli* JLD271, pAL103; *luxR*+*luxI*_*luxCDABE* (A. Lindsay, B. M. Ahmer, 2005) we investigated influence of dormant state inducers – alkylresorcinols (AR) on bacterial perception of cell-density mediators – homoserine lactones (HSL). Reaction of bacteria to HSL didn't change by joint addition of AR, while use of preliminary processing mode by AR reduced the following luminescent induction by HSL in a concentration-dependent manner. Dependence of bioluminescence repression from AR molecules alkyl radical's length and hydrophobicity, also as suppression of a cellular metabolism are shown.

Key words: quorum sensing, homoserine lactones, alkylresorcinols, *lux*-genes, bioluminescence.