

ПОЛИАМИНЫ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА КАДАВЕРИНА НА ФОНЕ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ*

А.В. Ахова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

А.М. Кылосова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
Пермский государственный национальный исследовательский университет*

А.В. Гончаренко, *Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН*

А.Г. Ткаченко, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
Пермский государственный национальный исследовательский университет*

М.С. Шумков, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН*

Снижение чувствительности клеток *E. coli* к антибиотикам может быть связано с обусловленным кадаверином ограничением проницаемости клеточной стенки. Синтез кадаверина при этом осуществляется лизиндекарбоксилазами CadA или LdcC. Данное исследование посвящено анализу регуляции синтеза кадаверина в условиях добавки антибиотиков.

Показано, что при внесении фторхинолонов возрастает экспрессия генов *ldcC* и *cadA*, что приводит к повышению активности кодируемых ими ферментов (преимущественно LdcC), обеспечивая в итоге накопление в клетках кадаверина. Полиамины путресцин и спермидин в этих условиях снижают экспрессию генов лизиндекарбоксилаз и уменьшают активность ферментов, но обеспечивают возрастание устойчивости бактериальных клеток к антибиотику за счет ослабления интенсивности антибиотик-индуцированного эндогенного окислительного стресса.

При внесении β -лактамов отмечено возрастание экспрессии *cadA*, экспрессия *ldcC* значительно снижается. Тем не менее лизиндекарбоксилазная активность в этих условиях возрастает (за счет CadA), что приводит к накоплению кадаверина. Экзогенные полиамины снижают экспрессию *cadA*, активность соответствующего фермента и не оказывают положительного воздействия на выживаемость бактериальных клеток.

Таким образом, четко установлены протекторные эффекты путресцина и спермидина в присутствии фторхинолонов и отсутствие таких эффектов в ответ на β -лактамы. Физиологическая роль кадаверина, синтезируемого в клетке в ответ на антибактериальные препараты, требует дальнейшего уточнения.

Ключевые слова: лизиндекарбоксилаза, *LdcC*, *CadA*, экспрессия, полиамины, путресцин, кадаверин, спермидин, антибиотики.

* Работа выполнена при финансовой поддержке фонда РФФИ и администрации Пермского края (проект №13-04-96002).

Введение. Широкое распространение устойчивых к антибиотикам микроорганизмов является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Среди неспецифических адаптивных механизмов, которые приводят к снижению чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам, следует отметить снижение проницаемости клеточной стенки. Оно может происходить, в частности, вследствие закупорки пориновых каналов мембраны полиаминами, в первую очередь, кадаверином. В клетках *E. coli* синтез кадаверина осуществляется лизиндекарбоксилазами CadA и/или LdcC.

Ранее мы показали, что сублетальное воздействие антибиотиков на культуру *E. coli* приводит к значительному повышению внутриклеточной концентрации полиаминов. В то же время экзогенная добавка этих соединений вызывает снижение чувствительности к антибактериальным препаратам [1]. Исходя из этого, мы сформулировали задачу исследовать влияние полиаминов на экспрессию генов и активность лизиндекарбоксилаз CadA и LdcC в условиях действия принципиально различающихся по механизму фторхинолоновых и β -лактамных антибиотиков. Основная идея работы заключается в раскрытии механизма повышения внутриклеточной концентрации кадаверина в ответ на действие антибиотиков как основы возрастания устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Материалы и методы. Для решения поставленной задачи были сконструированы штаммы *E. coli*, несущие репортерные генные слияния: SHT36 (*ldcC::lacZ*), SHT44 (*ldcC::lacZ, rpoS13::Tn10*), SHT45 (*cadA::lacZ*), SHT46 (*cadA::lacZ, Δ soxS*). Также были использованы готовые штаммы, любезно предоставленные зарубежными коллегами: RO91 (*rpoS::lacZ[hybr]*) и EH40 (*soxS::lacZ*). Экспрессию генов определяли методом Миллера [2]. Концентрацию полиаминов измеряли, как описано ранее [3]. Активность лизиндекарбоксилаз определяли по изменению концентрации полиаминов в реакции *in vitro*.

Результаты и обсуждение. Оценка эффекта антибиотиков на экспрессию *ldcC* показала, что фторхинолоны вызывают повышение транскрипции этого гена в 2 раза, в то время как бета-лактамы приводят к 2-кратному ее снижению. Экспрессия гена *rpoS*, продукт которого является единственным известным регулятором транскрипции *ldcC*, в обоих случаях возрастала. Базовый уровень экспрессии *ldcC* в RpoS-дефицитном штамме *E. coli* оказался на порядок ниже, чем в штамме дикого типа. Вместе с тем как фторхинолоновые, так и бета-лактамные антибиотики в отсутствие RpoS вызывали активацию экспрессии *ldcC*, причем ее итоговые уровни на фоне внесения этих препаратов статистически не различались. Более того, в случае бета-лактамов не обнаружилось значимых различий экспрессии *ldcC* в RpoS+ и RpoS- штаммах.

Таким образом, экспрессия *ldcC* в значительной степени зависит от RpoS (о чем уже говорили ранее другие авторы [4]). Вместе с тем, если судить по транскрипции *ldcC* в отсутствие этого регулятора, она не является зависимой исключительно от RpoS, но изменяется под действием каких-то еще, неизвестных пока, факторов.

Экспрессия гена *cadA*, в отличие от *ldcC*, возрастает в ответ на внесение как фторхинолоновых, так и β -лактамных антибиотиков. Кодирующий белок-регулятор ген *soxS* в этих условиях также демонстрирует возрастание экспрессии в 1,5–2 раза. Эти данные подтверждают принадлежность *cadA* к *soxRS*-регулону. Вместе с тем SoxS, очевидно, задействован в активации транскрипции *cadA* еще в меньшей степени, чем RpoS в регуляции *ldcC*, поскольку в *soxS*-дефицитном штамме как базовая, так и индуцированная антибиотиками экспрессия *cadA* снижается не более чем на 30%.

Добавка полиаминов на фоне внесения фторхинолоновых антибиотиков продемонстрировала неоднозначный эффект. Экспрессия *ldcC* возрастала почти в 2 раза при внесении пугресцина и кадаве-

рина и падала до контрольного уровня в ответ на добавку спермидина. Стоит отметить, что действие полиаминов как регуляторов экспрессии генов *rpoS* и *ldcC* было очень сходным. Это могло бы напрямую свидетельствовать о том, что их влияние на *ldcC* опосредовано RpoS, однако анализ эффектов путресцина и спермидина в RpoS-дефицитном штамме позволяет заключить, что они способны проявлять свое действие также и независимо от этого регулятора.

Транскрипция *cadA* при действии фторхинолонов снижалась в ответ на добавку путресцина и спермидина, но не кадаверина, внесение которого в среду культивирования практически не изменяло индуцированный антибиотиком высокий уровень экспрессии этого гена. Профили экспрессии регуляторного гена *soxS* и гена лизиндекарбоксилазы *cadA* в SoxS-дефицитном штамме следовали тем же тенденциям.

Таким образом, на фоне действия фторхинолоновых антибиотиков добавка спермидина вызывает снижение экспрессии обеих лизиндекарбоксилаз, путресцин – стимулирует *ldcC*, но снижает синтез CadA, а кадаверин – усиливает экспрессию обоих генов.

На фоне β-лактамов антибиотиков полиамины не оказывали влияния на транскрипцию *ldcC*. Точно так же, путресцин и спермидин практически не влияли на экспрессию *rpoS*, хотя кадаверин вызывал существенное усиление синтеза этого белка. В то же время в *rpoS*-дефицитном штамме эффект полиаминов на экспрессию *ldcC* существенно отличался – все исследованные соединения усиливали синтез мРНК этого гена.

Транскрипция *cadA* на фоне β-лактамов антибиотиков изменялась в значительно большей степени. Путресцин и кадаверин снижали ее до уровня, наблюдаемого в контрольной культуре без антибиотика (почти в 2 раза). Спермидин в тех же условиях неожиданно уменьшал экспрессию *cadA* только на 20%. В SoxS-дефицитном штамме наблюдался

сходный профиль кривых экспрессии, хотя «негативный» эффект путресцина проявлялся не столь ярко, а спермидин еще более усиливал экспрессию *cadA* в присутствии антибиотика. В то же время, на экспрессию *soxS* спермидин действовал прямо противоположным образом – экспрессия заметно снижалась. Кадаверин и путресцин влияния на нее практически не оказывали.

Таким образом, в условиях действия β-лактамов антибиотиков полиамины не влияют на экспрессию *ldcC* в штамме дикого типа. Транскрипция *cadA*, напротив, претерпевает существенные изменения, особенно сильно снижаясь при добавках путресцина и кадаверина.

Если проследить влияние добавок полиаминов на накопление биомассы бактериальной культуры на фоне действия антибиотиков, обнаруживается, что путресцин и спермидин довольно значительно «облегчают жизнь» микроорганизмов, в то время как добавка кадаверина усугубляет действие антибактериального соединения. В присутствии β-лактамов все изученные полиамины усиливают действие антибиотика.

Такие неоднозначные и разнонаправленные эффекты полиаминов, с большой вероятностью, обусловлены их преимущественным взаимодействием с теми или иными полианионными структурами клетки [5]. Поскольку основной мишенью связывания спермидина является ДНК, он оказывается эффективен на фоне фторхинолоновых антибиотиков, ингибирующих ДНК-гиразу. В то же время кадаверин, преимущественно локализованный в клетке в области мембраны и клеточной стенки, такого действия не оказывает. Путресцин является более универсальной молекулой. Он способен как стабилизировать клеточную мембрану, так и влиять на пространственную структуру нуклеиновых кислот. Кроме того, он может оказывать положительное воздействие на экспрессию генов защиты от окислительного стресса и, как и спермидин, нейтрализовать активные формы кислорода [6].

По-видимому, именно многообразие механизмов его влияния на физиологию бактериальной клетки в условиях добавки антибиотиков и определяет способность путресцина снижать интенсивность стрессового воздействия, вызывая тем самым снижение уровня транскрипции генов лизиндекарбоксилаз.

Изучение ферментативной активности лизиндекарбоксилаз показало, что как фторхинолоновые, так и β -лактамы антибиотики вызывают ее возрастание. Причем на добавку фторхинолонов сильнее отвечает LdcC, а β -лактамов – CadA. Несмотря на относительно небольшое изменение активности ферментов, внутриклеточная концентрация продукта катализируемой ими реакции – кадаверина – возрастает почти на порядок.

Внесение путресцина в этих экспериментах приводило к снижению ферментативной активности обеих лизиндекарбоксилаз. Ее итоговый уровень во всех случаях опускался ниже контрольного. Обнаруженный эффект, предположительно, был связан со снижением общей интенсивности стрессового воздействия за счет исключения неспецифического компонента киллерной активности антибиотиков, связанного с антибиотик-индуцированной продукцией активных форм кислорода и фрагментацией ДНК [7].

Для фторхинолоновых антибиотиков эта находка хорошо подтверждается также значительным возрастанием числа колониеобразующих единиц на плотных средах. На фоне β -лактамов антибиотиков подобного эффекта путресцина не наблюдалось, что, по-видимому, обусловлено меньшим вкладом неспецифических

киллерных механизмов в гибель бактериальных клеток в этих условиях.

Заключение. Ответ бактериальных клеток на действие антибиотиков различных групп во многом неодинаков. Так, при добавке фторхинолонов наблюдается возрастание экспрессии генов обеих лизиндекарбоксилаз (LdcC и CadA), которое приводит к некоторому повышению активности кодируемых ими ферментов (преимущественно LdcC) и обеспечивает накопление в клетках эндогенного кадаверина.

Полиамины путресцин и спермидин ослабляют действие антибиотика, снижая чувствительность к нему бактериальных клеток. Поскольку они уменьшают активность лизиндекарбоксилаз (за счет снижения экспрессии генов), их эффект проявляется вследствие ослабления интенсивности антибиотик-индуцированного эндогенного окислительного стресса.

При внесении β -лактамов происходит возрастание экспрессии гена лизиндекарбоксилазы CadA (экспрессия *ldcC* значительно снижается), что приводит к повышению лизиндекарбоксилазной активности и, как следствие, накоплению в клетках высоких концентраций кадаверина. Экзогенные полиамины снижают экспрессию *cadA*, активность соответствующего фермента и не оказывают положительного воздействия на выживаемость бактериальных клеток.

Таким образом, нам удалось установить, что в присутствии фторхинолонов путресцин и спермидин оказывают на клетки *E. coli* выраженное протекторное действие; в ответ на β -лактамы таких эффектов не наблюдается.

Библиографический список

1. Ткаченко А.Г., Шумков М.С., Ахова А.В. Адаптивные функции полиаминов при сублетальных воздействиях антибиотиков // Микробиология. – 2009. – Т. 78. – № 1. – С. 32–41.
2. Miller J.H. Experiments in molecular genetics. – New York: Cold Spring Harbor, 1992.
3. Tkachenko A.G., Pozhidaeva O.N., Shumkov M.S. Role of polyamines in formation of multiple antibiotic resistance of *Escherichia coli* under stress conditions // Biochemistry. – 2006. – Vol. 71. – P. 1042–1049.
4. Kikuchi Y., Kurahashi O., Nagano T., et al. RpoS-dependent expression of the second lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli* // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1998. – Vol. 62. – P. 1267–1270.
5. Cohen S.S. What do the polyamines do? // Nature. – 1978. – Vol. 274. – P. 209–210.
6. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от силы стрессорных воздействий супероксидных радикалов // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – С. 109–116.

7. Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nesterova L.Yu. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics // Research in microbiology. – 2012. – Vol. 163. – P. 83–91.

POLYAMINES AS A FACTOR OF CADAVERINE SYNTHESIS REGULATION UNDER ANTIBIOTIC TREATMENT

A.V. Akhova¹, A.M. Kylosova², A.V. Goncharenko³, A.G. Tkachenko^{1,2}, M.S. Shumkov^{1,3}

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

² Perm State National Research University

³ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS

E. coli antibiotic susceptibility could come down due to a cadaverine-caused decrease in cell wall permeability. Cadaverine synthesis is at that realized by CadA and/or LdcC lysine decarboxylases. Here we analyze cadaverine synthesis regulation under antibiotic treatment.

We found an increase in *ldcC* and *cadA* gene expression following fluoroquinolone application. It leads to lysine decarboxylases enzymatic activity growth (LdcC par excellence) and, finally, to high intracellular cadaverine accumulation. Polyamines putrescine and spermidine in these conditions inhibit expression of lysine decarboxylase genes and diminish their enzymatic activity. Nevertheless, they make bacteria more tolerant of antibiotics due to the weakening of the intensity of antibiotic-induced endogenous oxidative stress.

Following the application of β -lactams growth in the expression of *cadA* was found. The expression of *ldcC*, on the contrary, dropped down. Lysine decarboxylase activity in these conditions grew (due to CadA activity), however, and led to increased cadaverine accumulation. Exogenous polyamines decreased the expression of *cadA* and CadA enzymatic activity and had no positive effects on bacterial viability.

Thus, there exist pronounced protective effects of putrescine and spermidine under fluoroquinolone treatment and the lack of such effects in response to β -lactams. The physiological role of cadaverine, which is synthesized in a bacterial cell in response to antibacterial compounds, is yet to be specified.

Keywords: lysine decarboxylase, LdcC, CadA, expression, polyamines, putrescine, cadaverine, spermidine, antibiotics.

Сведения об авторах

Ахова Анна Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: akhovan@mail.ru

Кылосова Алёна Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; студентка, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: aljoshka@mail.ru

Гончаренко Анна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов, Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН), 119071, г. Москва, Ленинский пр., 33, стр. 2; e-mail: pylaevanna@gmail.com

Ткаченко Александр Георгиевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией адаптации микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; профессор кафедры микробиологии и иммунологии, ПГНИУ; e-mail: agtkachenko@iegm.ru

Шумков Михаил Сергеевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории адаптации микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; научный сотрудник лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов, Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН; e-mail: shumkovm@gmail.com

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.