

РОЛЬ ТИОЛОВЫХ РЕДОКС-СИСТЕМ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ДЕЙСТВИИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР И АНТИБИОТИКОВ У БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI**

Г.В. Смирнова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
Е.В. Лепехина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский национальный исследовательский политехнический университет*
Н.Г. Музыка, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
З.Ю. Самойлова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
А.В. Тюленев, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
К.В. Безматерных, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
М.А. Петерс, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
В.Ю. Ушаков, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский государственный национальный исследовательский университет*
М.Н. Брысова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Исследованы стрессы, индуцированные резким изменением температуры, антибиотиками разных классов и комбинированным действием неоптимальных ростовых температур и антибиотиков у бактерий *Escherichia coli*, мутантных по компонентам редокс-систем глутатиона (*gshA*, *gor*, *grxA*, *grxB*) и тиоредоксина (*trxA*, *trxB*). Показано, что исследуемые мутации существенно изменяют количество S-S связей в белках, уровни оксидантов (H₂O₂) и редуцтантов (глутатион), экспрессию антиоксидантных генов и чувствительность бактерий к действию антибиотиков и экстремальных температур. Направленность воздействия (повышение или понижение чувствительности) зависит от вида мутации и имеет различный характер для антибиотиков разных классов. Во всех изученных ситуациях (эффект мутаций на действие антибиотиков при оптимальной температуре роста, эффект комбинированных стрессов и воздействие добавок, изменяющих редокс-статус) были обнаружены обратные корреляции между IgКОЕ (колониеобразующие единицы) при действии цiproфлоксацина и ампициллина и удельной скоростью роста бактерий.

Ключевые слова: тиоловые редокс-системы, цiproфлоксацин, ампициллин, температура, бактерии.

Опасный рост числа антибиотико-резистентных штаммов патогенных бактерий повышает интерес исследователей к изучению механизмов действия антибиотиков на клетки и адаптивного ответа бактерий при стрессе, индуцированном антибиотиками. Понимание этих механизмов может способствовать обнаружению внутриклеточных мишеней, воздействие на которые позволит повысить чув-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-96039).

ствительность к существующим препаратам и разработать новые лекарственные средства.

В связи с этим интенсивную дискуссию вызвала гипотеза о роли окислительного стресса как общего механизма бактерицидного действия антибиотиков с различными внутриклеточными мишенями [4, 7]. Авторы гипотезы предполагают, что воздействие бактерицидных антибиотиков на специфические мишени сопровождается значительными неспецифическими изменениями центрального метаболизма, в том числе дыхания и баланса ионов железа, что приводит к повышению продукции активных форм кислорода (АФК), окислительному повреждению и гибели клеток. Исходя из этой гипотезы, эффективность антибиотиков можно повысить, воздействуя на антиоксидантные системы клетки. Однако недавно появились работы, позволяющие заключить, что индуцированная антибиотиками гибель клеток осуществляется посредством механизмов, специфичных для разных антибиотиков, и не требует АФК [6, 8].

Основными видами АФК являются супероксидный радикал (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2) и токсичный гидроксильный радикал (HO^\cdot), возникающий в ходе реакции Фентона с участием H_2O_2 и редокс-активного железа. АФК способны повреждать все макромолекулы в клетке, и поддержание их низкого уровня является необходимым условием жизни в аэробной среде. К основным деструкторам АФК у *E. coli* относятся супероксиддисмутазы, кодируемые генами *sodA*, *sodB* и *sodC*, каталазы НРІ, НРІІ (*katG*, *katE*) и алкилгидропероксидредуктаза (*ahpFC*) [5].

KatE контролируется регулятором стационарной фазы RpoS (σ^S); гены *katG* и *ahpFC* в активно растущей культуре регулируются транскрипционным фактором OxyR, отвечающим на повышение уровня H_2O_2 . В антиоксидантную защиту вовлечены также редокс-системы глутатиона и тиоредоксина. Редокс-система глутатиона включает трипептид глутатион (GSH), первый фермент синтеза которого коди-

руется геном *gshA*, глутаредоксины (Grx) (*grxA*, *grxB*, *grxC*, *grxD* и *NrdH*) и глутатионредуктазу (*gor*) [9]. В состав редокс-системы тиоредоксина (Trx) входят Trx1 и Trx2 (*trxA* и *trxC*) и тиоредоксинредуктаза (*trxB*) [3]. Grx и Trx – небольшие белки, осуществляющие восстановление S-S связей в белках с использованием редокс-химии цистеиновых остатков. Окисленные Grx1, Grx2 и Grx3 неферментативно восстанавливаются GSH, окисленные тиоредоксины и глутатион – с участием тиоредоксинредуктазы и глутатионредуктазы [9]. Субстратами Grx и Trx являются SH-содержащие ферменты, сенсорные и регуляторные белки, многие из которых, в том числе транскрипционный фактор OxyR, играют важную роль в защите от окислительного стресса.

Кроме того, Trx и Grx поддерживают в восстановленном состоянии SH-группы белков, спонтанно окисляющиеся в аэробных условиях [3]. Trx и Grx включены в единую регуляторную сеть бактериальной клетки и контролируются с участием OxyR, RpoS и алармона гуанозинтетрафосфата (ppGpp). Глутатион способен прямо взаимодействовать со всеми типами АФК. Показано, что предобработка растущих клеток высокими дозами GSH защищает их от гибели при экспозиции к антибиотикам разных классов, что служит одним из аргументов гипотезы об общем оксидантном механизме бактерицидного действия антибиотиков [4].

Ранее мы показали, что резкие изменения температуры культивирования сопровождаются окислительным стрессом, в защите от которого существенную роль играют тиоловые редокс-системы [2]. Цель настоящей работы – проверка влияния мутаций в тиоловых редокс-системах на бактерицидное действие антибиотиков при оптимальной температуре и при температурных стрессах.

В работе использовались делеционные мутанты *E. coli* по генам *gshA*, *gor*, *trxA*, *trxB*, *grxA*, *grxB* (Keio collection), сконструированные нами двойные мутанты *gshAtrxA*, *gortrxB* и штаммы, несущие

слияния промоторов генов *katG*, *katE* и *sodA* со структурным геном β -галактозидазы *lacZ*. При температурах, близких к оптимальной (37 и 40°C), в среде M9 с глюкозой мутанты *gor*, *trxA* и *trxB* росли с более низкой скоростью, а мутант *gshA* – с более высокой скоростью, чем родитель. При резком снижении температуры до 20°C или повышении до 46°C скорость роста значительно ингибировалась у всех изученных штаммов. Наибольший эффект наблюдался при 46°C у двойных мутантов *gshAtrxA* и *gortrxB*, где рост полностью останавливался. Мутации *gshAtrxA* и *gortrxB* снижали выживаемость (КОЕ) при всех температурах.

Все мутанты, кроме *gshA*, имели повышенный уровень дисульфидов в белках (в 2–12,7 раз больше, чем родитель). Мутант *trxA* содержал на 26% меньше, а двойной мутант *gortrxB* в 1,4 раза больше внутриклеточного GSH, чем клетки родителя. При 37°C все мутанты демонстрировали увеличенную активность каталазы НРІ и повышенную экспрессию кодирующего ее гена *katG*. В двойных мутантах экспрессия *katG* была в 5 раз выше, а активность НРІ в 20 раз выше, чем у родителя. Экспрессия гена *katE*, кодирующего каталазу НРІІ, была близкой у всех изученных штаммов, за исключением *gortrxB*, где она превышала родительский уровень в 1,5 раза. Оба двойных мутанта и мутанты *grxA* и *grxB* имели в 1,5–2 раза более низкий уровень экспрессии гена *sodA*, чем родительский штамм. Продукция H_2O_2 при 37°C была максимальна у мутантов *trxA* и *gor* (почти в 2 раза выше, чем у родителя), в то время как уровень H_2O_2 у мутанта *gshAtrxA* был в 5 раз ниже. Таким образом, все мутанты по тиоловым редокс-системам, за исключением *gshA*, испытывали дисульфидный стресс и индуцировали экспрессию гена *katG* и каталазу НРІ, что в максимальной степени проявлялось у двойных мутантов.

У клеток родителя и большинства мутантов переход от 37°C к 20°C приводил к повышению экспрессии гена *katG* и постепенному снижению концентрации

H_2O_2 в среде. Только у двойных мутантов *gshAtrxA* и *gortrxB*, несмотря на существенное возрастание экспрессии *katG*, наблюдалось обратимое повышение продукции H_2O_2 . При тепловом стрессе (46°C) наблюдалось снижение экспрессии гена *katG* у мутантов *gor*, *grxA* и *grxB* относительно их уровня при 37°C. Концентрация H_2O_2 при этом возрастала у большинства штаммов, за исключением мутантов *trxA* и *trxB*. Холодовой стресс приводил к повышению, а тепловой стресс – к снижению экспрессии *sodA* у всех изученных штаммов относительно уровня экспрессии при оптимальной температуре. Экспрессия гена *katE* также имела тенденцию к снижению при повышении температуры культивирования.

В целом, анализ данных о продукции H_2O_2 и экспрессии антиоксидантных генов показывает, что производство оксидантов может увеличиваться при изменении температуры культивирования в обе стороны от оптимума, при этом антиоксидантная защита при холодовом стрессе возрастает, а при тепловом – снижается. Это согласуется с общей тенденцией к повышению выживаемости исследованных штаммов при 20°C и ее снижением при 46°C относительно оптимума 37°C.

Мутанты *gortrxB* и *gshAtrxA* проявляли повышенную устойчивость к действию H_2O_2 . Наблюдалась высокая корреляция между устойчивостью к пероксиду и индукцией каталаз НРІ и НРІІ и гена *katG* ($r = 0,93$, $0,95$ и $0,83$ соответственно). Максимальные различия между мутантами по чувствительности к антибиотикам регистрировались при 37°C и 40°C. Мутанты *gor* и *gortrxB* при 37°C, а также *gor* и оба двойных мутанта при 40°C обладали большей устойчивостью к ципрофлоксацину, в то время как *gshA* был более чувствителен к этому антибиотику, чем клетки родителя. Мутанты *gor*, *trxB* и *gortrxB* были более устойчивы к ампициллину, причем *trxA* практически терял чувствительность к этому антибиотику; напротив, мутанты *grxA* и *gshAtrxA* были более чувствительны к ампициллину.

При 37°C выявлена обратная корреляция между удельной скоростью роста у испытуемых штаммов перед добавлением антибиотиков и их выживаемостью при последующей обработке ципрофлоксацином или ампициллином ($r = -0,93$ и $-0,9$ соответственно).

Резкое изменение температуры в обе стороны от температурного оптимума сопровождалось повышением устойчивости бактерий к действию антибиотиков разных классов (ципрофлоксацин, ампициллин, стрептомицин), так что кривая зависимости lgКОЕ от температуры имела V-образный характер. Минимальное значение КОЕ наблюдалось при 40°C, то есть при максимальных значениях удельной скорости роста. Наблюдалась высокая корреляция между удельной скоростью роста и lgКОЕ ($r = -0,97$, $-0,93$ и $-0,89$ для ципрофлоксацина, ампициллина и стрептомицина). Общий V-образный вид зависимости lgКОЕ от температуры сохранялся у мутантов по компонентам тиоловых редокс-систем, которые при температурах 20°C и 46°C проявляли более высокую устойчивость к антибиотикам, чем при 37°C и 40°C. Не было выявлено достоверной связи между выживаемостью

мутантных бактерий при действии антибиотиков и уровнем их редокс-статуса (содержание дисульфидов в белках, концентрация глутатиона и H_2O_2), экспрессией антиоксидантных генов, активностью каталаз и устойчивостью к пероксидному стрессу при всех изученных температурах.

Искусственная модуляция редокс-ситуации за счет предобработки клеток *E. coli* веществами, изменяющими уровень глутатиона (GSH, GSSG, цистеин, цистин, валин, SH-реагент NEM), значительно влияла на выживаемость бактерий при действии антибиотиков. Это влияние сохранялось у мутанта *gshA* и было, вероятно, связано не с изменением редокс-ситуации как таковой, а со способностью этих соединений воздействовать на скорость роста бактерий. Наблюдалась корреляция между значением скорости роста и lgКОЕ при действии ципрофлоксацина и ампициллина ($r = -0,98$ и $0,89$).

Полученные данные не согласуются с гипотезой об оксидантном механизме бактерицидного действия антибиотиков разных классов и указывают на высокую зависимость бактерицидного эффекта от скорости роста бактерий.

Библиографический список

1. Смирнова Г.В., Лепехина Е.В., Музыка Н.Г., Октябрьский О.Н. Роль тиоловых редокс-систем при ответе бактерий *Escherichia coli* на стрессорные воздействия температур и антибиотиков // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 1. – С. 26–35.
2. Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. Глутатион у бактерий // Биохимия. – 2005. – Т. 70. – Вып. 11. – С. 1459–1473.
3. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – P. 6161–6165.
4. Dwyer D.J., Belenky P.A., Yang J.H., MacDonald I.C., Martell J.D., Takahashi N., [et al.] Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – Vol. 111. – P. E2100–E2109.
5. Imlay J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide // Annu. Rev. Biochem. – 2008. – Vol. 77. – P. 755–776.
6. Keren I., Wu Y., Inocencio J., Mulcahy L.R., Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species // Science. – 2013. – Vol. 339. – P. 1213–1216.
7. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // Cell. – 2007. – Vol. 130. – P. 797–810.
8. Liu Y., Imlay J.A. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species // Science. – 2013. – Vol. 339. – P. 1210–1213.
9. Meyer Y., Buchanan B.B., Vignols F., Reichheld J.P. Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology // Annu. Rev. Genet. – 2009. – Vol. 43. – P. 335–367.
10. Смирнова Г., Музыка Н., Лепехина Е., Октябрьский О. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent systems in the *Escherichia coli* responses to ciprofloxacin and ampicillin // Arch. Microbiol. – 2016. – Vol. 198. – P. 913–921.

11. Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Tyulenev A.V., Oktyabrsky O.N. Extracellular superoxide provokes glutathione efflux from *Escherichia coli* cells // Res. Microbiol. – 2015. – Vol. 166. – P. 609–617.

THE ROLE OF THIOL REDOX SYSTEMS UNDER A COMBINED ACTION OF EXTREME TEMPERATURES AND ANTIBIOTICS IN ESCHERICHIA COLI

G.V. Smirnova¹, E.V. Lepekhina^{1,2}, N.G. Muzyka¹, Z.Y. Samoilova¹, A.V. Tyulenev¹,
K.V. Bezmaternykh¹, M.A. Peters¹, V.Y. Ushakov^{1,3}, M.N. Brysova¹

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

² Perm National Research Polytechnic University

³ Perm State National Research University

Stresses induced by abrupt temperature shifts, antibiotics of different classes and by a combined action of nonoptimal growth temperatures and antibiotics are studied in bacteria *Escherichia coli* deficient by components of redox systems dependent on glutathione (*gshA*, *gor*, *grxA*, *grxB*) and thioredoxin (*trxA*, *trxB*). It is shown that the mutations under consideration significantly change the number of S-S bindings in proteins, the levels of oxidants (H₂O₂), reductants (glutathione) and the antioxidant gene expression, as well as the susceptibility of bacteria to antibiotics and extreme temperatures. The direction of influence (an increase or decrease in susceptibility) depends on the type of mutation and differs for antibiotics of different classes. Significant inverse correlations were observed between IgCFU (colony-forming units) and specific growth rate prior to antibiotic addition under all the situations investigated: the effect of mutations on the antibiotic activity at an optimal growth temperature, the effect of combined stresses and the effect of supplements that change the redox state.

Keywords: thiol redox systems, ciprofloxacin, ampicillin, temperature, bacteria.

Сведения об авторах

Смирнова Галина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: smirnova@iegm.ru

Лепехина Елена Владимировна, кандидат биологических наук, инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; доцент кафедры химии и биотехнологии, Пермский национальный исследовательский политехнический университет (ПНИПУ), 614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: alenshick@mail.ru

Музыка Надежда Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: muzyka@iegm.ru

Самойлова Зоя Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: samzu@iegm.ru

Тюленев Алексей Валерьевич, кандидат биологических наук, инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: leksey333@yandex.ru

Безматерных Ксения Викторовна, инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: hydrargyrum@iegm.ru

Петерс Михаил Александрович, аспирант лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: mixeu-mhz@mail.ru

Ушаков Вадим Юрьевич, кандидат биологических наук, ведущий инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; доцент кафедры физиологии растений и микробиологии, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: ushakovvad@yandex.ru

Брысова Марина Николаевна, старший лаборант лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: m-brysova75@mail.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.