

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН



2015 * № 3

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Е.В. Лепехина, Г.В. Смирнова, 2015

УДК 579.22

Е.В. Лепехина^{1, 2}, Г.В. Смирнова¹

МОДУЛЯЦИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ МУТАНТОВ *ESCHERICHIA COLI* ПО ТИОЛОВЫМ РЕДОКС-СИСТЕМАМ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Цель: Выявить влияние мутаций в компонентах редокс-систем глутатиона и тиоре-доксина на биопленкообразование *E. coli* в присутствии антибиотиков с различным меха-низмом действия.

Материалы и методы: Способность к формированию биопленок у одиночных де-леционных мутантов из коллекции Keio и сконструированных в лаборатории двойных му-тантов определялась на планшетах при окрашивании генцианвиолетом.

Результаты: Установлено, что мутации по компонентам тиоловых редокс-систем значительно изменяют интенсивность биопленкообразования. Способность к формиро-ванию биопленок у мутантов по тиоловым редокс-системам в присутствии антибиотиков зависела от типа антибиотика.

Заключение: Изменение редокс-ситуации в клетке, вызванное мутациями, по-разному влияло на биопленкообразование в присутствии антибиотиков с разными внутри-клеточными мишенями. Полученные данные указывают, что в основе модулирующего действия изменений редокс-статуса на биопленкообразование может лежать дисульфид-ный стресс и активация OxyR-регулона у мутантов по компонентам тиоловых редокс-систем.

Ключевые слова: тиоловые редокс-системы, биопленкообразование, окислительный стресс.

E.V. Lepekhina^{1,2}, G.V. Smirnova¹

BIOFILM FORMATION MODULATION OF *ESCHERICHIA COLI* THIOL REDOX-SYSTEM MUTANTS IN ANTIBIOTICS ACTION

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS, Perm, Russia

² Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

Objective. To reveal the influence of glutathione and thioredoxin redox-systems on *E. coli* biofilm formation under action of different antibiotics.

Materials and methods. Biofilm formation capacity of single deletion mutants from Keio collection and double mutants constructed in the Laboratory was performed in microplates after staining with gentian violet.

Results. Mutations on thiol redox-systems significantly modify the intensity of biofilm formation. Biofilm formation capacity of thiol redox-system mutants under the presence of anti- biotics was dependent on type of antibiotic.

Conclusions. Modification of redox situation in the cell caused by mutations differently influenced on biofilm formation in the presence of different classes antibiotics. The data suggest that disulfide stress and activation of OxyR regulon in thiol redox-system mutants may be the basis of redox-status modulating action.

Keywords: thiol redox-systems, biofilm formation, oxidative stress.

Введение

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию молекулярных механизмов, ответственных за высокую устойчивость к стрессам (в том числе к антибиотикам) у микроорганизмов в составе биопленок. Формирование и дисперсия биопленок являются строго контролируруемыми процессами, требующими перепрограммирования экспрессии многих генов, которое осуществляется в ответ на изменение условий окружающей среды. Существует предположение, что эти структурированные сообщества являются эволюционным способом защиты микроорганизмов от стрессовых условий, таких как лимитирование субстратом, изменение pH, окисление активными формами кислорода, действие антибиотиков и различных биоцидов [1]. Бактерии, находящиеся в составе биопленки, проявляют повышенную устойчивость ко всем типам стрессовых воздействий, в том числе к антибиотикам и окислительному стрессу, что приводит к существенным медицинским и техническим проблемам и стимулирует исследование факторов, влияющих на биопленкообразование.

Выбор между планктонной и сессильной формой существования, по видимому, является результатом суммарного действия множественных сигнальных каскадов, регулируемых с участием различных внутриклеточных мессенджеров и транскрипционных факторов, включая сигма-фактор стационарной фазы RpoS (σ^S) [2]. Кроме того, в регуляцию подвижности и биопленкообразования у бактерий *E. coli* вовлечено большое количество малых регуляторных РНК (sRNA) [3].

Известно, что как в эукариотических, так и прокариотических клетках многие ключевые регуляторы и ферменты содержат значимые SH-группы, окисление которых сопровождается образованием дисульфидных связей и изменением активности этих молекул. Восстановление дисульфидных связей в белках может осуществляться с участием глутаредоксинов и тиоредоксинов, окисленные формы которых, в свою очередь, восстанавливаются при помощи глутатиона (GSH), а также глутатионредуктазы (GOR) и тиоредоксинредуктазы, соответственно.

В данной работе было решено изучить влияние мутаций в компонентах редокс-систем глутатиона и тиоредоксина на биопленкообразование *E. coli* в присутствии антибиотиков с различными механизмами действия.

Материалы и методы

Объектом исследования служили бактерии *E. coli* BW25113 (*wt*) и одиночные делеционные мутанты JW2663 (Δ *gshA*), JW3467 (Δ *gor*), JW0833 (Δ *grxA*), JW1051 (Δ *grxB*), JW5856 (Δ *trxA*), JW0871 (Δ *trxB*) из коллекции Keio. Кроме того, в экспериментах использовали сконструированные в нашей лаборатории методом трансформации плазмид и трансдукции с фагом P1 двойные мутанты NM3655 (Δ *gshAtrxA*) и NM3761 (Δ *gortrxB*). Бактерии выращивали на минимальной среде M9 с глюкозой (0.15%) при 37°C. Для приготовления клеточной суспензии бактерии из ночной культуры центрифугировали и ресуспендировали в 5 мл среды M9 (0,4% глюкозы) с добавлением 0,2% казаминовых кислот и тиамина (10 мкг/мл) до значения оптической плотности $OD_{600}=0.1$. Способность к биопленкообразованию определяли в полистирольных планшетах, в лунки которых стерильно вносили по 100 мкл суспензии бактериальных клеток или среды M9 (контроль), культивировали 110 минут при 37°C в термостатируемом шейкере ST-32 ELMi, а затем добавляли исследуемые антибиотики или редокс-активные соединения. Через 21 час интенсивность биопленкообразования оценивали по степени окрашивания генцианвиолетом [4]. Подвижность бактерий определяли путем измерения диаметра зоны роста на полужидком агаре (0,3%) через сутки инкубации при 30°C [5].

Результаты и обсуждение

Мутации по компонентам тиоловых редокс-систем значительно влияли на подвижность бактерий и способность к биопленкообразованию при выбранных температурных режимах роста. Максимальное ингибирование подвижности (от 2 до 6 раз) было характерно для штаммов, несущих мутации *gor*, *grxB*, *trxA*, *gshAtrxA* и *gortrxB*. Эти же штаммы и мутант по *grxA* демонстрировали повышенный уровень биопленкообразования (SBF) от 1.5 до 2.2 раз по сравнению с клетками дикого типа. Таким образом, соблюдалась установленная ранее другими исследователями обратная зависимость между подвижностью бактерий и уровнем биопленкообразования.

Обработка бактерий экзогенными полифенолами кверцетином и таннином приводила к стимуляции биопленкообразования в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкМ, а экзогенный GSH снижал способность к формированию биопленок (рис. 1).

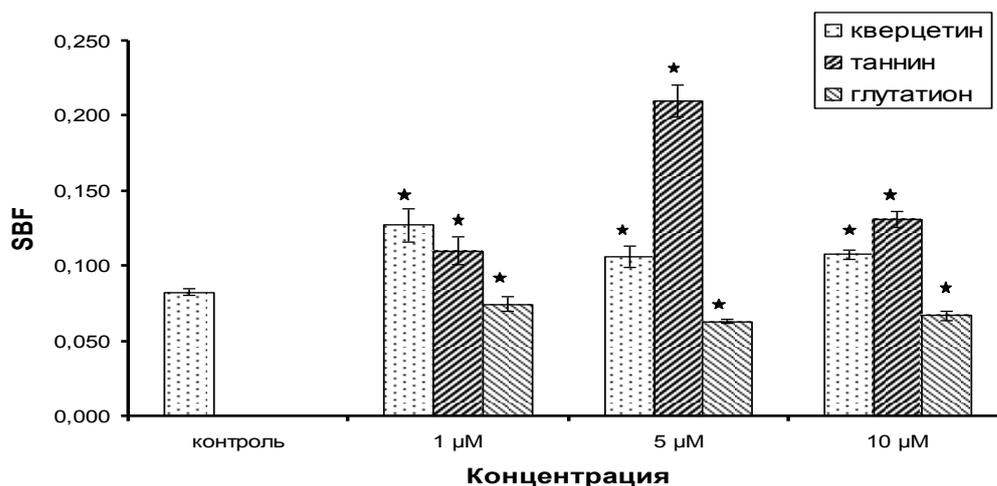


Рис. 1. Способность к биопленкообразованию у родительского штамма *E. coli* в присутствии глутатиона, кверцетина и таннина.

Стимуляция биопленкообразования в присутствии полифенолов может быть связана с окислительным стрессом, возникающим в результате накопления АФК при их аутоокислении, и индукцией антиоксидантных генов, особенно тех, которые принадлежат к *OxyR* регулону. Ранее было показано, что полифенолы кверцетин и таннин и богатые полифенолами растительные экстракты повышают экспрессию *OxyR*-контролируемого гена *katG*, кодирующего каталазу НРІ [6]. Малая регуляторная РНК *OxyS* также индуцируется при пероксидном стрессе под контролем *OxyR*. Недавно было показано, что *OxyS* снижает экспрессию генов *flhDC*, ингибируя тем самым продукцию флагелл и подвижность бактерий [7]. Кроме этих эффектов *OxyS* оказывает не прямое ингибирующее влияние на экспрессию *RpoS*. Более того, Ag43, большой протеин наружной мембраны, который необходим для формирования биопленок на различных поверхностях, также регулируется *OxyR* [8]. Если кверцетин и таннин стимулируют образование биопленок за счет своего прооксидантного действия, то GSH может ингибировать этот процесс благодаря антиоксидантным свойствам.

Рассмотренный механизм может действовать и в случае с мутантами. Все мутанты, у которых наблюдалась стимуляция образования биопленок при температуре 37°C (*gor*, *trxA*, *gshAtrxA*, *gortrxB*, *grxA* и *grxB*), имели высокий уровень дисульфидов в белках, повышенную экспрессию гена *katG* и активность каталазы НРІ. Таким образом, дисульфидный стресс и экспрессия *OxyR*-регулона у мутантов по компонентам тиоловых редокс-систем могут вносить вклад в стимуляцию их биопленкообразования.

Накапливаются данные о том, что сублетальные концентрации антибиотиков могут индуцировать или ингибировать образование биопленок бактериями [9, 10]. Предполагают, что антибиотики могут играть роль внутриклеточных сигнальных молекул, и их присутствие в низких концентрациях может вызывать адаптивный ответ. Для бактерий *E. coli* показано, что индуцированный сублетальными концентрациями β -лактамных антибиотиков синтез колановой кислоты может усиливать образование и устойчивость биопленок [11]. А. Воеhm с соавторами показали, что обработка бактерий *E. coli*, растущих на среде LB, сублетальными концентрациями антибиотиков, подавляющих синтез белка, ведет к резкому повышению биопленкообразования, что было связано с участием алармона ppGpp и вторичного мессенджера цикло-диГМФ [12].

В наших экспериментах ампициллин (10 мкг/мл) в 4,6 раза увеличивал способность к биопленкообразованию у бактерий дикого типа при температуре 37°C, что, вероятно, связано с индукцией синтеза колановой кислоты (рис. 2).

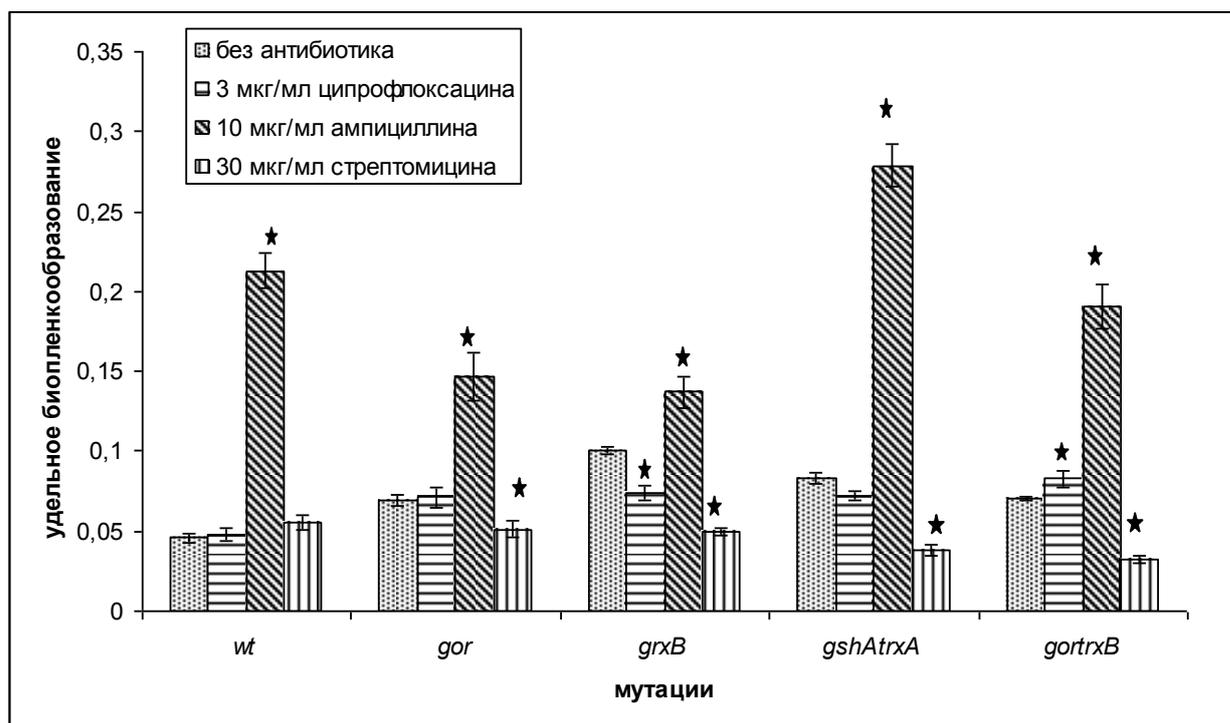


Рис. 2. Способность к биопленкообразованию у бактерий родительского штамма *E. coli* и мутантов по генам *gor*, *grxB*, *gshAtrxA*, *gortrxB* при 37°C в присутствии антибиотиков.

При обработке мутантов по генам *gor*, *grxB* ампициллином биопленкообразование снижалось в 1,5 раза, по сравнению с реакцией родительского штамма. Напротив, способность к формированию биопленок двойного му-

танта *gshAtrxA* повышалась в присутствии вышеуказанной концентрации ампициллина. Представляет интерес выявленная высокая обратная зависимость между величиной удельного образования при добавлении ампициллина и продукцией пероксида водорода исследуемыми мутантами.

В отличие от ампициллина, мутации по компонентам тиоловых редокс-систем не оказывали эффекта на биопленкообразование в присутствии ципрофлоксацина (3 мкг/мл) и ингибировали его при обработке стрептомицином 30 мкг/мл (рис. 2).

Заключение

Мутации по компонентам тиоловых редокс-систем значительно влияли на интенсивность биопленкообразования при оптимальных температурах роста. В основе модулирующего действия изменений редокс-статуса на биопленкообразование может лежать дисульфидный стресс и активация OxyR-регулона у мутантов по компонентам тиоловых редокс-систем. Изменение редокс-ситуации в клетке, вызванное мутациями, по-разному влияло на биопленкообразование в присутствии антибиотиков с разными внутриклеточными мишенями. Это указывает на то, что каждый из антибиотиков может иметь специфический механизм стимуляции или ингибирования этого процесса.

Результаты настоящей работы вносят определенный вклад в понимание участия тиоловых редокс-систем в формировании устойчивости бактерий к действию антибиотиков. Полученные данные могут быть использованы при поиске новых приемов, усиливающих эффективность антибиотикотерапии, и путей контроля биопленкообразования посредством изменения редокс-статуса бактериальных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jefferson K. What drives bacteria to produce biofilm? FEMS. Microbiol. Lett. 2004. 236: 163-173.
2. Povolotsky T.L., Hengge R. 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: Signaling by the second messenger c-di-GMP. J Biotechnol. 2012. 160: 10-16.
3. Mika F., Hengge R. Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*. Int J Mol Sci 2013; 14: 4560-4579.
4. Naves P, del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Rodriguez-Cerrato V., Ponte M.C., Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. J. Appl. Microbiol. 2008. 105: 585–590.
5. Pittman M.S., Corker H., Wu G., Binet M.B., Moir A.J., . Poole R.K. Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. J. Biol. Chem. 2002. 277: 49841-49849.
6. Samoilova Z., Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics. Microbiol. Res. 2014.

169: 307-313.

7. De Lay N., Gottesman S. A complex network of small non-coding RNAs regulates motility in *Escherichia coli* Mol. Microbiol. 2012. 84: 36-50.
8. Van der Woude M., Henderson I.R. Regulation and function of Ag43 (Flu) Annu. Rev. Microbiol. 2008. 62: 153-169.
9. Linares J.F., Gustaffson I., Baquero F., Martinez J.I. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. 103: 19484-19489.
10. Kuczynska-Wisnik D., Matuszevska E., Furmanek-Blaszk B., Leszczynska D., Grudowska A., Szczepaniak P., Laskowska E. Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signaling. Res. Microbiol. 2010. 161: 847-853.
11. Sailer F. C., Meberg B.M., Young K.D. Beta-lactam induction of colonic acid gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 2003. 226: 245-249.
12. Boehm A., Steiner S., Zaehring F., Casanova A., Hamburger F., Ritz D., Keck W., Ackermann M., Schirmer T., Jenal U. Second messenger signaling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. Mol. Microbiol. 2009. 72: 1500-1516.

Поступила 3.09.2015

(Контактная информация: Лепехина Елена Владимировна – кандидат биологических наук, инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; адрес: 614081 г. Пермь, ул. Голева, 13; тел./факс 8 (3422) 122086; E-mail: alenshick@mail.ru).

LITERATURA

1. Jefferson K. What drives bacteria to produce biofilm? FEMS. Microbiol. Lett. 2004. 236: 163-173.
2. Povolotsky T.L., Hengge R. 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: Signaling by the second messenger c-di-GMP. J Biotechnol. 2012. 160: 10-16.
3. Mika F., Hengge R. Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*. Int J Mol Sci 2013; 14: 4560-4579.
4. Naves P, del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Rodriguez-Cerrato V., Ponte M.C., Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. J. Appl. Microbiol. 2008. 105: 585–590.
5. Pittman M.S., Corker H., Wu G., Binet M.B., Moir A.J., . Poole R.K. Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly. J. Biol. Chem. 2002. 277: 49841-49849.
6. Samoiloва Z., Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics. Microbiol. Res. 2014. 169: 307-313.
7. De Lay N., Gottesman S. A complex network of small non-coding RNAs regulates motility in *Escherichia coli* Mol. Microbiol. 2012. 84: 36-50.
8. Van der Woude M., Henderson I.R. Regulation and function of Ag43 (Flu) Annu. Rev. Microbiol. 2008. 62: 153-169.
9. Linares J.F., Gustaffson I., Baquero F., Martinez J.I. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. 103: 19484-19489.
10. Kuczynska-Wisnik D., Matuszevska E., Furmanek-Blaszk B., Leszczynska D., Grudowska A., Szczepaniak P., Laskowska E. Antibiotics promoting oxidative stress inhibit formation of *Escherichia coli* biofilm via indole signaling. Res. Microbiol. 2010. 161: 847-853.
11. Sailer F. C., Meberg B.M., Young K.D. Beta-lactam induction of colonic acid gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 2003. 226: 245-249.
12. Boehm A., Steiner S., Zaehring F., Casanova A., Hamburger F., Ritz D., Keck W., Ackermann M., Schirmer T., Jenal U. Second messenger signaling governs *Escherichia coli* bio-

film induction upon ribosomal stress. Mol. Microbiol. 2009. 72: 1500-1516.

Образец ссылки на статью:

Лепехина Е.В., Смирнова Г.В. Модуляция биопленкообразования мутантов *Escherichia coli* по тиоловым редокс-системам при действии антибиотиков. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 3: 1-8 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-3/Articles/LEV-SGV-2015-3.pdf>).