

МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* — ПРОДУЦЕНТОВ ФЕНАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ К СОБСТВЕННЫМ ФЕНАЗИНАМ

Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Феназиновые антибиотики представляют собой низкомолекулярные гетероциклические азотсодержащие соединения, синтезируемые в ходе реакций ароматического пути. Основу всех соединений данного ряда составляет феназин-1-карбоксилат (РСА), а феназин, 2-оксифеназин-1-карбоксилат, пиоцианин, оксихлорорафин, гемипиоцианин – его производные (рис. 1) [1–3].

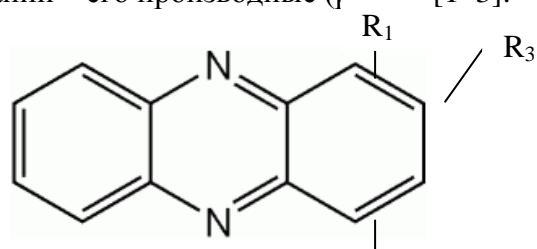


Рисунок 1 – Строение феназин R_2 антибиотиков.

$R_1, R_2, R_3 = 0$ – феназин; $R_1: \text{COOH}$ – феназин-1-карбоксилат; OH – гемипиоцианин; CONH_2 – оксихлорорафин. $R_1 = \text{O}^-$, $R_2 = \text{CH}_3$ – пиоцианин. $R_1 = \text{COOH}$, $R_3 = \text{OH}$ – 2-оксифеназин-1-карбоксилат; $R_1 = \text{COOH}$, $R_2 = \text{CH}_3$ – 5-метилфеназин-1-карбоксилат.

Соединения феназинового ряда проявляют высокую антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов [4]. Широкий спектр активности объясняется механизмом их действия. Обладая способностью легко проникать внутрь бактериальных клеток и вступать там в окислительно-восстановительные реакции, принимая электроны от глутатиона и NADH и превращаясь в относительно стабильные анионы, данные вещества вызывают генерацию активных форм кислорода (O_2^- , OH^- и H_2O_2), имеющих высокую реакционную способность, результатом чего является индукция окислительного стресса и последующая гибель микроорганизмов [4, 5].

Способностью к синтезу феназиновых антибиотиков обладают бактерии родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces* и *Methanosarcina* [5-8], что обеспечивает им высокий уровень антагонистической активности [9]. В настоящее время установлено, что соединения феназинового ряда способны легко выходить из бактерий, синтезирующих данные соединения, и генерировать образование активных форм кислорода непосредственно во внеклеточном пространстве, либо после проникновения в клетки чувствительных к ним организмов (клетки-мишени) (рис. 2) [10-11]. Установлено, что во внеклеточном пространстве феназины, в основном, генерируют образование H_2O_2 , а внутри клеток – супероксид-анион радикалов (O_2^-) [11]. Независимо от того, где образуются активные формы кислорода, и какая из них преобладает, результатом является гибель чувствительных к ним клеток.

В свою очередь, клетки-продуценты проявляют устойчивость к собственным феназинам. Однако механизм этого явления в настоящее время в деталях еще не изучен. Известно лишь, что в формировании устойчивости к феназинам у бактерий *Bacillus sp.* принимает участие ацил-СоА-синтетаза [12]. Что касается бактерий *Pseudomonas*,

синтезирующих феназиновые антибиотики, то изучение механизмов их устойчивости к собственным феназинам до сих пор никем не проводилось.

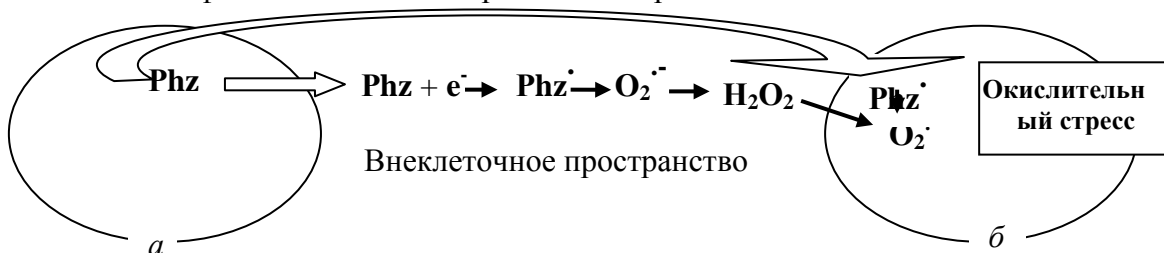


Рисунок 2 – Механизм антагонистической активности бактерий-продуцентов феназиновых антибиотиков. Phz – феназиновые антибиотики; а – клетка-продуцент, б – клетка-мишень.

Известно, что в системе защиты организмов от окислительного стресса главная роль отводится антиоксидантному комплексу, включающему каталазу, супероксиддисмутазу (СОД), NADH-оксидазу, а также глутатион и связанную с ним систему ферментов, отвечающих за его превращение из окисленной формы в восстановленную [13].

Целью данной работы являлось исследование механизмов устойчивости к собственным феназинам бактерий *P. aurantiaca* – продуцентов данных соединений.

Методы исследования

В работе использовали штамм *P. aurantiaca* В-162 из коллекции кафедры генетики Белорусского государственного университета (коллекционный номер КМБУ-162), а также его регуляторные мутанты, способные к сверхсинтезу феназинов [14], и мутанты, утратившие способность синтезировать данные соединения (phz–мутанты), полученные с помощью транспозонного мутагенеза.

Бактерии выращивали при 28°C в жидкой питательной среде с аэрацией или без аэрации в зависимости от целей эксперимента, а также на агаризованной среде того же состава. Для изучения продукции феназинов культивирование бактерий проводили в среде специального состава [15] при 28°C в течение 5 сут. Транспозонный мутагенез осуществляли по методу, предложенному ранее [16] с использованием штамма *E. coli* S17/1(pro⁻;thi⁻) pUT(Ap^R::miniTn5(Sm^R)) в качестве донора, реципиентом служили бактерии *P. aurantiaca*.

Концентрацию жизнеспособных бактерий определяли методом разведений. Клеточный экстракт получали путем обработки суспензии клеток ультразвуком (30 кГц, 3 раза по 15 сек) при 4°C в 0,015 М фосфатном буфере.

Выделение феназиновых антибиотиков и определение их концентрации осуществляли по методу, описанному ранее [17].

Определение активности СОД проводили по методу, основанному на спектрофотометрической регистрации изменения концентрации кверцетина с течением времени [18]. Определение активности каталазы осуществляли согласно известной методике, предложенной Aebi [19]. Активность NADH-оксидазы определяли спектрофотометрически по уменьшению концентрации NADH [20]. Содержание окисленной и восстановленной форм глутатиона в клетках – по методу, разработанному Senft и др. [21]. Активность глутатион-редуктазы – спектрофотометрически, согласно методике, предложенной в статье [22]. Активность СОД выражали в у.е./мг белка (1 у.е. соответствует 50% ингибированию реакции разрушения кверцетина на мг белка). Активность каталазы – ммоль/мин × мг белка, NADH-оксидазы и глутатион-редуктазы – в мкмоль/мин × мг белка.

Спектрофотометрический анализ проводили на спектрофотометре Cary 50 scan (Varian, Australia) Белок определяли по методу, предложенному Bradford [23].

Результаты и обсуждение

Ранее на основе ризосферных бактерий *P. aurantiaca* В-162 (продукция феназиновых антибиотиков 71–75 мг/л) в результате нескольких серий последовательных мутагенезов и отбора устойчивых к токсическим аналогам мутантов, нами были получены штаммы-продуценты В-162/55 и В-162/255 с повышенным в 3–6 раз уровнем синтеза антибиотиков (210 и 410 мг/л соответственно) [14]. При этом выживаемость мутантных

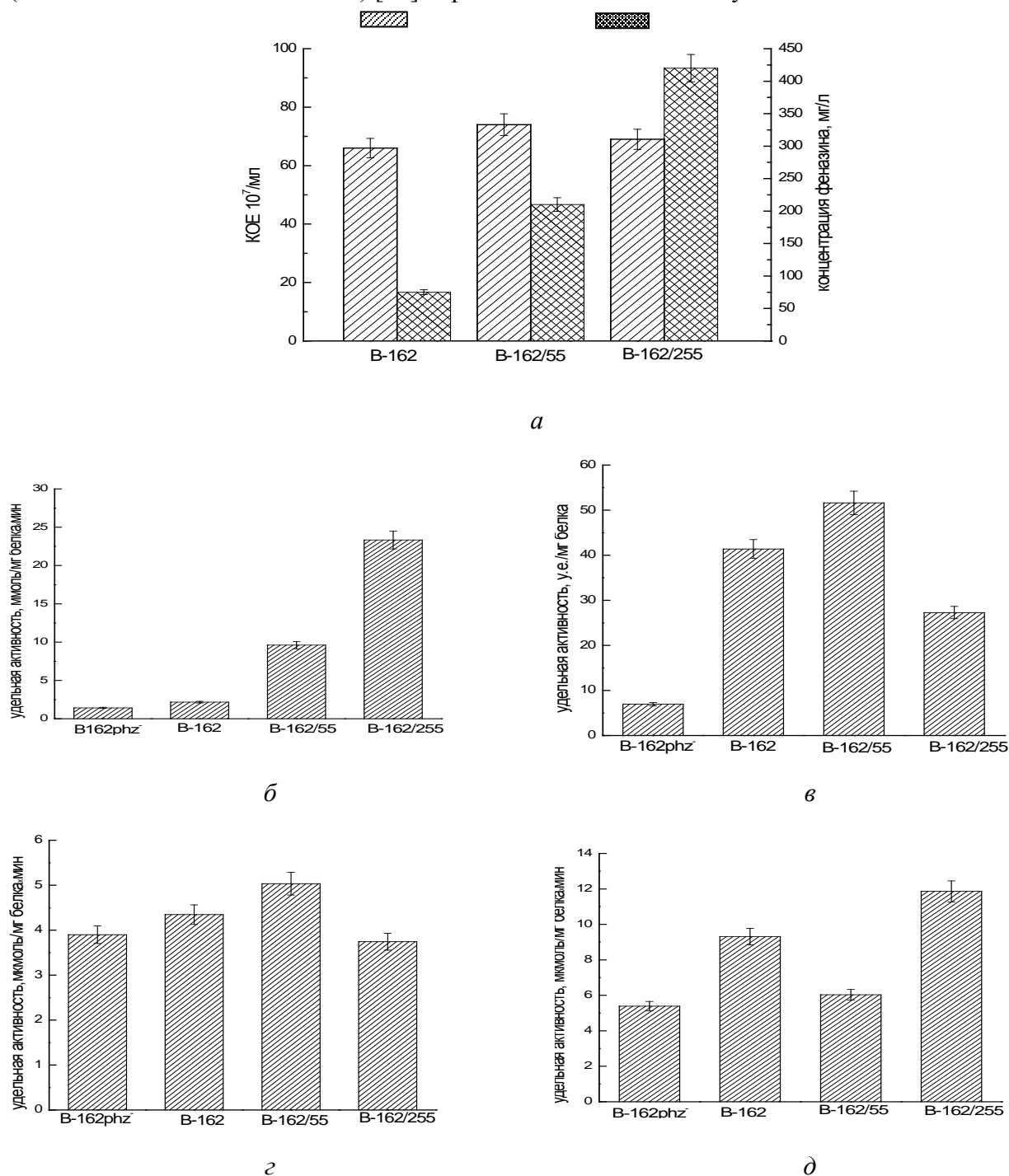


Рисунок 3 – Продукция феназинов и активность ферментов антиоксидантного комплекса у *P. aurantiaca* и его мутантов: а – КОЕ $\times 10^7$ /мл, – концентрация феназинов, мг/л. Удельная активность: б – каталазы; в – СОД; г – NADH–оксидазы, д – глутатион–редуктазы.

бактерий практически не изменялась и была сопоставима с таковой для бактерий дикого типа (рис. 3а). Следует отметить, что наблюдаемый уровень синтеза феназиновых антибиотиков у полученных мутантов является достаточно высоким и в 10-20 раз превышает таковой у известных в этом отношении штаммов *P. chlororaphis* и *P. aeruginosa* [24]. Было сделано предположение, что устойчивость штаммов-продуцентов *P. aurantiaca* к высоким концентрациям собственных феназинов связана с наличием у них мощной антиоксидантной системы, которая способна активироваться в присутствии феназинов и обеспечивать не только нормальную выживаемость бактерий-продуцентов в этих условиях, но также и сверхсинтез антибиотиков.

На первом этапе работы у полученных штаммов-продуцентов феназинов, а также бактерий дикого типа и В-162phz⁻-мутантов, вообще утративших способность к их синтезу, был проведен сравнительный анализ профилей активности одного из основных ферментов антиоксидантного комплекса – каталазы. Установлено, что уровень удельной активности каталазы у мутантов В-162/55 и В-162/255 многократно возрастает – в 4,4 и 10,8 раз, соответственно, по сравнению с бактериями дикого типа, и в 6,7 и 16,4 раза – по сравнению В-162phz⁻ вариантом (рис. 3б). Следует отметить, что у phz⁻-мутантных бактерий показатель удельной активности этого фермента находился на низком уровне и практически не превышал 1,4 ммоль/мин × мг белка, в то время как для штамма, обладающего наибольшим уровнем продукции феназинов, он соответствовал 23,3 ммоль/мин × мг белка. Кроме того, зарегистрирована корреляция между значениями удельной активности данного фермента у мутантных бактерий и уровнем продукции феназиновых антибиотиков (см. рис. 3а и 3б). Известно, что синтез каталазы является индуцибельным, где в качестве индуктора выступает H₂O₂ [25].

Полученные данные могут быть объяснены исходя из современных представлений о механизме действия феназинов [11], согласно которым эти вещества легко покидают бактериальные клетки и генерируют образование O₂^{·-}. Ввиду высокой реакционной способности данная форма кислорода мгновенно вступает в реакции спонтанного превращения, образуя пероксид водорода. Именно H₂O₂, по-видимому, является тем веществом, которое образуется при массовой продукции феназинов, что и объясняет значительное увеличение уровня удельной активности каталазы у штаммов В-162/55 и В-162/255 – продуцентов феназиновых антибиотиков. В свою очередь, об это свидетельствует об индукции синтеза данного фермента у изучаемых штаммов *P. aurantiaca*.

Кроме того, было проведено исследование профилей активности СОД у бактерий *P. aurantiaca* В-162 дикого типа и полученных феназин-продуцирующих мутантов. Предполагалось, что уровень удельной активности данного фермента будет возрастать по мере увеличения продукции феназинов. Однако, несмотря на то, что эта тенденция в целом сохранялась для бактерий дикого типа и одного из штаммов-продуцентов (а именно, штамма В-162/55) – регистрировался рост удельной активности данного фермента в 5,9 и 7,4 раза, соответственно, неожиданным оказался факт снижения этого показателя у бактерий В-162/255, для которого, наоборот, характерен наиболее высокий уровень продукции феназинов (рис. 3в). Можно предположить, что высокий уровень образования активных форм кислорода (или H₂O₂) в присутствии феназинов подавляют активность СОД. Аргументом в пользу этого предположения служит факт, что одна из наиболее распространенных у микроорганизмов изоформ СОД, а именно, Fe-СОД [26], является чувствительной к высоким концентрациям пероксида водорода и подвержена ингибированию в его присутствии при достижении определенного порогового уровня [13, 27].

Интересно отметить, что снижение активности СОД при высоком уровне продукции феназинов может компенсироваться еще одним альтернативным механизмом для элиминации активных форм кислорода, а именно, увеличением уровня внутриклеточного глутатиона, что, по мнению ряда авторов, компенсирует низкую активность СОД [13].

Известно, что важнейшим фактором защиты организмов от активных форм кислорода является накопление в клетках глутатиона. У граммотрицательных бактерий, в том числе, *Pseudomonas*, глутатион обнаружен в относительно высоких концентрациях и, являясь частью ферментативно-регулируемой редокс-системы, выполняет защитную функцию [28]. Ранее было установлено, что внутриклеточная концентрация глутатиона в клетках некоторых бактерий (*Haemophilus influenzae*, *Rhizobium tropici*) может повышаться в присутствии H_2O_2 , причем действие последнего является дозозависимым [29, 30]. Исходя из этого, нами было исследовано содержание глутатиона в клетках изучаемых штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков *P. aurantiaca* и проанализировано соотношение его окисленной и восстановленной форм.

Показано, что в клетках *P. aurantiaca*, независимо от уровня синтеза феназинов имеется относительно высокий исходный уровень глутатиона (например, 17 нМ для не продуцирующего феназины мутанта В-162phz⁻). Кроме того, установлено, что накопление глутатиона в клетках дикого типа и изучаемых мутантных штаммов коррелирует с уровнем синтеза феназинов. В частности, зарегистрировано увеличение суммарной концентрации глутатиона в 2,7, 4,9 и 8,4 раза у бактерий штаммов В-162, В-162/55 и В-162/255 по сравнению со штаммом В-162phz⁻ (таблица). Полученные результаты свидетельствуют, что у продуцирующих феназин штаммов происходит индукция синтеза глутатиона, которая является одной из приспособительных реакций, обеспечивающих им защиту от собственных токсических соединений. Известно, что повышение уровня глутатиона в клетках может происходить за счет активизации γ -глутамилсинтазы, а также положительной регуляции транскрипции генов тяжелой цепи данного фермента в присутствии H_2O_2 [31]. Увеличение суммарной концентрации глутатиона у штамма В-162/255 может также являться свидетельством компенсаторной реакцией в ответ на снижение активности СОД.

Кроме того, нами проведены исследования уровня синтеза глутатион-редуктазы — фермента, переводящего окисленный глутатион в восстановленную форму. Согласно данным, представленным на рис. 3д, у бактериальных штаммов В-162 и В-162/255 наблюдается возрастание удельной активности данного фермента (в 1,7 и 2,2 раза соответственно) по сравнению со штаммом В-162phz⁻, не способным к продукции феназинов. Этим можно объяснить некоторое увеличение концентрации восстановленной формы глутатиона у исследованных бактерий (см. таблицу). Что касается бактерий штамма В-162/55, активность глутатион-редуктазы у которого практически не изменилась по сравнению с контролем, то у него сохраняется и близкое к В-162phz⁻ соотношение окисленной и восстановленной форм глутатиона. Возможно, у данного штамма преобладающим защитным механизмом является активация СОД и увеличение уровня синтеза глутатиона.

Таблица – Содержание различных форм глутатиона у бактерий *P. aurantiaca* В-162 и его мутантов

Штаммы	$C_{\text{окисл. глутатиона, нМ}}$	$C_{\text{восст. глутатиона, нМ}}$	$\sum C_{\text{глутатиона, нМ}}$	$C_{\text{окисл.}}:C_{\text{восст.}}$
В-162phz ⁻	8±0,15	11±0,12	17	1:1,38
В-162	18±0,3	28±0,21	46	1:1,56
В-162/55	33±0,12	43±0,27	83	1:1,40
В-162/255	55±0,45	88±0,24	143	1:1,60

На следующем этапе работы была проанализирована активность NADH-оксидазы, роль которой в защите от окислительного стресса, особенно у факультативно анаэробных микроорганизмов, хорошо известна [13]. В связи с этим были проведены эксперименты по изучению уровня удельной активности этого фермента у штаммов В-162, В-162/55, В-162/255 и В-162phz⁻. Оказалось, что активность NADH-оксидазы у всех изучаемых бактерий практически не зависела от уровня продукции феназиновых антибиотиков. По-

видимому, данный механизм защиты не активируется в клетках штаммов-продуцентов *P. aurantiaca* в ответ на повышение уровня синтеза феназинов (рис. 3з).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что высокий уровень синтеза феназинов у штаммов-продуцентов *P. aurantiaca* коррелирует с возрастанием активности отдельных компонентов антиоксидантного комплекса. Наибольший вклад в этот процесс вносит каталаза, удельная активность которой возрастает в 16,4 раза и находится в прямой зависимости от уровня синтеза феназиновых антибиотиков. Аналогичная ситуация характерна и для суммарной концентрации глутатиона. Вместе с тем, установлено, что NADH-оксидаза не участвует в обеспечении устойчивости клеток в ответ на действие феназинов, поскольку ее удельная активность практически не меняется при увеличении продуктивности штаммов. Интересно отметить, что для СОД и глутатион-редуктазы зарегистрирован взаимный компенсаторный эффект. Например, для штамма В-162/55 при увеличении уровня активности СОД уровень синтеза глутатион-редуктазы снижается, а для штамма В-162/255, наоборот, уровень активности СОД снижается, а глутатион-редуктазы повышается. Подобная картина ранее была зарегистрирована для бактерий *Lactococcus lactis* при изучении окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода [13].

Сопоставляя полученные в настоящей работе результаты с опубликованными ранее данными по активации под действием пероксида водорода каталазы [25], ингибированию активности СОД при достижении его пороговых концентрациях [27], а также повышению уровня синтеза глутатиона внутри клеток [31], есть основания предполагать, что формирование ответной реакции на токсическое действие феназинов в клетках-продуцентах *P. aurantiaca* обусловлено именно пероксидом водорода.

Список литературы

1. Laursen, J.B., Nielsen, J. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. // Chem. Rev. – 2004. – V. 104. – P. 1663–1686.
2. Kerr, J.R. Phenazine pigments: antibiotics and virulence factors. // Infect. Dis. Rev. – 2000 – V. 2. – P. 184–194 (2000).
3. Chang P. C., Blackwood A. C. Simultaneous production of three phenazine pigments by *Pseudomonas aeruginosa* Mac436. // Can. J. Microbiol. – 1969. – V. 15. – p. 439-444.
4. Price-Whelan A., Dietrich L. E. P., Newman D. K. Rethinking «secondary» metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. // Nat. Chem. Biol. – 2006. – V. 2. – №2. – P. 71-78.
5. Rao, Y.M., Sureshkumar, G.K. Oxidative-stress-induced production of pyocyanin by *Xanthomonas campestris* and its effect on the indicator target organism, *Escherichia coli*. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – V. 25. – P. 266–272.
6. Delaney S.M., Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Thomashow L.S. Phz O, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30–84. // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. – №1. – P. 318–327.
7. Turner, J.M., Messenger, A.J. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. // Adv. Microb. Physiol. – 1986. – V. 27. – P. –211–275.
8. Beifuss, U., Tietze, M. Methanophenazine and other natural biologically active phenazines. // Top. Curr. Chem. – 2005. – V. 244. – P. 77–113.
9. Katsuwon J., Anderson A. J. Catalases and Superoxide Dismutase of Root-Colonizing Saprophytic Fluorescent *Pseudomonas*. // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – V. 56. – №11. – P. 3576-3582.
10. Dwight C. Look, Lynn L. Stoll, Sara A. Romig, Alicia Humlicek, Bradley E. Britigan, Gene M. Denning. Pyocyanin and Its Precursor Phenazine-1-Carboxylic Acid Increase IL-8 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Human Airway Epithelial Cells by Oxidant-Dependent Mechanisms. // J.Immunol. – 2005. – V. 175. – P. 4017-4023.

11. H. Moustafa Hassan, I. Fridovich. Mechanism of Antibiotic Action of Pyocyanine. // *J. Bacteriol.* – 1980. – V. 141. – №1. – P. 156-163.
12. Kyoung-Ja K. Phenazine 1-carboxylic acid resistance in 1- carboxylic acid producing *Bacillus sp* B-6. // *J. Biochem Mol. Biol.* – 2000. – V. 33. – №4. – P. 332-336.
13. Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J., Loir Y., Oliveira S., Langella P., Azavedo V. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. // *Gen. Mol. Res.* – 2003. – V 2. – №4. – P. 348-359.
14. Материалы международной конференции «От классических методов генетики и селекции к ДНК- технологиям» (Веремеенко Е. Г. Получение регуляторных мутантов *Pseudomonas aurantiaca* B-162, устойчивых к токсическим аналогам ароматических аминокислот. // Гомель, 2007 г., с. 112
15. Levitch M.E., Stadtman E.R. A study of the biosynthesis of Phenazine–1–carboxylic acid. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1964. – V. 106. – P. 194–199.
16. V. de Lorenzo, Herrero M., Timmis K. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. // *J Bacteriol.* 1990. V. 172. №11 P 6557-6567
17. Levitch M. E., Stadtman E. R. A study of the biosynthesis of Phenazine-1-corboxylic acid. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1964. – V. 106. – p. 194-199.
18. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – Т. 36, №2. – С. 88-91
19. Aebi H. Catalase in vitro. // *Methods in Enzymol.* – 1984. – V. 105. – P. 121-126
20. F. Lopez de Felipe, Kleerebezem M., Hugenholtz J. Cofactor Engineering: a Novel Approach to Metabolic Engineering in *Lactococcus lactis* by Controlled of NADH Oxidase. // *J. Bacteriol.* – 1998. – V. 180. – №15. – P. 3804-3808.
21. Senft A., Dalton T., Shertzer H. Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe o-Phthalaldehyde. // *Analyt. Biochem.* – 2000. – V. 280. – P. 80-86.
22. Li Y., Hugenholtz J., Abee T., Molenaar D. Glutathione Protects *Lactococcus lactis* against Oxidative Stress. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69. – №10. – P. 5739-5745.
23. Bradford J.K. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal. Biochem.*, – 1976. – V. 72. – P. 248-254
24. Levitch M.E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine- producing strains. // *J. Bacteriol.* 1970. Vol. 103. № 1. P. 16-19.
25. Hertel C., Schmidt G., Fischer M., Oellers K., Hammes W. Oxygen-Dependent Regulation of the Expression of the Catalase Gene *katA* of *Lactobacillus sakei* LTH677. // *Appl. Envir. Microbiol.* – 1998. – V. 64. – №4. – P. 1359-1365.
26. Vance C., K., Miller A. Novel Insights into the Basis for *Escherichia coli* Superoxide Dismutase's Metal Ion Specificity from Mn-Substituted FeSOD and Its Very High Em. // *Biochem.* – 2001. – №40 – P. 13079-13087.
27. Miller A. Handbook of Metalloproteins: Fe superoxide dismutase. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2001, P 668-682.
28. Chesney J. A., Eaton J. W., Manorey J. R. Bacterial Glutathione: a Sacrificial Defense against Chlorine Compounds. // *J. Bacteriol.* – 1995. – V. 178. – №7. – P. 2131-2135.
29. Vergauwen B., Pauwels F., Van Beeumen J. Glutathione and Catalase Provide Defenses for Protection against Respiration-Generated Hydrogen Peroxide in *Haemophilus influenzae*. // *J. Bacteriol.* – 2003. – V. 185. – №18. – P. 5555-5562
30. Riccillo P. M., Muglia C. I., Bruijn F. J., Roe A. J., Booth I. R., Aguilar O. M. Glutathione is Involved in Environmental Stress Responses in *Rhizobium tropici*, Including Acid Tolerance. // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182. – №6. – P. 1748-1753
31. Ochi T. Hydrogen Peroxide Increases the Activity of γ -glutamylcysteine synthetase in Cultured Chinese Hamster V79 Cells. // *Ach. Toxicol.* – 1995. – V. 70. – №2. – P. 96-103

