

На правах рукописи

Волошин Сергей Александрович

**ЗНАЧЕНИЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У
БАКТЕРИЙ *MICROCOCCUS LUTEUS* И *RHODOCOCCUS
RHODOCHROUS* ДЛЯ ИНИЦИАЦИИ РОСТА**

Специальность 03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва-2005

Работа выполнена в лаборатории «Биохимии стрессов микроорганизмов»
Института биохимии им. А.Н. Баха РАН

Научный руководитель

доктор биологических наук,
профессор А.С. Капрельянц

Официальные оппоненты

доктор биологических наук,
профессор Л.И. Воробьёва
кандидат биологических наук
А.Б. Шевелёв

Ведущая организация

Институт биохимии и физиологии
Микроорганизмов им. Г.К. Скрябина
РАН, г. Пущино

Защита состоится 13 декабря 2005 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета К 002.247.01 по принуждению учёной степени кандидата наук в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, корп. 1.

Автореферат разослан «10» ноября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

2006-4
21963

2214399

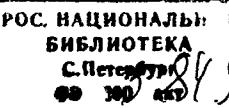
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В современной микробиологии интенсивно дебатируется вопрос о роли межклеточных взаимодействий при росте различных видов микроорганизмов. Особое внимание привлекает возможная роль таких взаимодействий в отношении прокариотических организмов, популяции которых до недавнего времени считали простой «смесью» клеток, которые растут независимо друг от друга. Однако за последние десять лет появилось много фактов, свидетельствующих о наличии разнообразных систем межклеточной коммуникации прокариотических клеток. В настоящее время хорошо известен целый ряд бактериальных факторов роста, цитокинов и сигнальных молекул, секрецируемых клетками, которые участвуют в таких процессах, как споруляция, конъюгация, биolumинесценция, вирулентность и т.д. Также достигнут значительный прогресс в исследовании такого явления как кворум-сенсинг, имеющий большое значение в развитии микробных популяций, в том числе и патогенных бактерий. Но, несмотря на значительные успехи в области химических факторов коммуникации и роста микроорганизмов, остаётся много вопросов, связанных с возможной ролью физических контактов между бактериальными клетками и образованием бактериями специфических скоплений (агрегатов). Хорошо известно, что некоторые бактерии образуют в процессе роста сложные структуры (например, плодовые тела миксобактерий или стрептомицетов), однако, кроме этого, довольно большое число видов бактерий имеет склонность к агрегации при росте в жидкких средах, и значение такого явления остаётся до конца не изученным.

На сегодняшний день одними из самых исследованных бактериальных ассоциатов являются биоплёнки и бактериальные маты. Бактериальные маты являются сложными многовидовыми и многослойными ассоциатами, характерными для различных местообитаний на земле и играют большую роль в экстремальных экосистемах. Биоплёнки часто образуются в естественной среде обитания на границе раздела двух фаз и могут состоять всего из одного вида. В настоящее время изучены процессы образования биоплёнок, значение биоплёнок для медицины и экологии.

Однако, несмотря на активное исследование матов и биоплёнок, уделяется мало внимания агрегации бактерий в жидкой фазе, которая имеет место при развитии многих микроорганизмов, особенно в условиях неблагоприятных для роста данного вида. Практически не исследованы механизмы такой агрегации и её роль в развитии бактериальной популяции в различных условиях окружающей среды.



Цели и задачи исследования.

Цель работы состояла в поиске ответа на вопрос: какое значение для развития популяции имеет агрегация ряда бактерий на жидких средах? И если имеет, то, при каких условиях и какие механизмы могут быть ответственны за это явление.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать, как влияют различные факторы, приводящие к изменению степени агрегированности клеток (интенсивность перемешивания, температура) на рост бактерий *R. rhodochrous* и *M. luteus* на разных средах.
2. Проследить, как изменяется степень агрегации бактерий при росте в жидких средах, и как агрегация зависит от состава среды.
3. Выяснить, как связаны инициация роста бактерий и агрегация; изучить влияние химических факторов, секрецируемых клетками, на эти процессы.
4. Исследовать какие механизмы лежат в основе диссоциации клеточных агрегатов. Изучить возможное участие секрецируемого бактериями белка Rpf в этом процессе.

Научная новизна.

1. Впервые показана роль клеточной агрегации для роста бактерий *R. rhodochrous* и *M. luteus* в жидких обеднённых питательных средах. Предотвращение образования клеточных ассоциатов приводит к резкому замедлению или даже полной остановке роста.
2. Впервые установлена роль частичного автолиза клеток для роста бактерий *R. rhodochrous* и *M. luteus* на обеднённых средах. Предполагается, что в лаг-фазе «микрокриптический» рост в пределах бактериальных агрегатов позволяет поддержать деление части клеток и дальнейшую инициацию видимого роста.
3. Впервые приведены убедительные доказательства того, что секрецируемый клетками *M. luteus* белок Rpf обладает ферментативной (мурамидазной) активностью в отношении бактериальной клеточной стенки и участвует в процессе диссоциации клеточных агрегатов и инициации активного роста культуры на ранней стадии развития.

Научно-практическое значение.

Полученные в работе должны учитываться в биотехнологических процессах при оптимизации сред и условий культивирования бактерий для получения биологически активных соединений, а также при создании эффективных биологических плёнок для очистки загрязнённых вод.

Полученные результаты были использованы при выполнении Институтом биохимии работ по приоритетному направлению "Живые системы" (тема ЖС-КП.6/003).

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы докладывались на итоговых научных конференциях: «Горизонты физико-химической биологии» (Пущино, 2003), The 1-st Congress of European Microbiologist (Slovenia, Liubliana, 2003), «Горизонты физико-химической биологии» (Пущино, 2004), «Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой» (Саратов, 2004), «Горизонты физико-химической биологии» (Пущино, 2005)

Публикации.

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 печатных работ, в числе которых 3 статьи в российских научных журналах.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 115 страницах. Список цитируемой литературы включает 185 наименований. Иллюстративный материал содержит 39 рисунков и 2 таблиц.

Сокращения, принятые в тексте. LMM – лактатная минимальная среда (от английского Lactic Minimum Medium), ПААГ – полиакриламидный гель, ДДС-На – додецилсульфат натрия, ДЭ – дрожжевой экстракт, АТ – антитела, БСА – бычий сывороточный альбумин, СБ – связывающий буфер, D₆₀₀ – оптическая плотность при длине волны 600 нм, TBS – солевой трис-буфер, ТГЭС – трис глицин этанол ДДС-На буфер, Rpf – фактор способствующий оживлению (от английского resuscitation promoting factor).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дана общая характеристика диссертационной работы. Обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, изложены научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

Первая глава содержит обзор литературы, посвящённый различным аспектам межклеточного взаимодействия у бактерий. Рассматриваются химические факторы коммуникации, колониальная организация бактериальных культур и биоплёнки, также показана связь между межклеточным взаимодействием и «социальным поведением» микроорганизмов. Отдельное внимание удалено строению клеточной стенки и ферментам, связанным с её реорганизацией, показана большая роль клеточной стенки в коммуникации между клетками в развивающейся бактериальной популяции. В последнем разделе собрано множество фактов, описывающих межклеточную агрегацию бактерий, растущих в жидких питательных средах и различные механизмы агрегации и её возможная биологическая роль.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования

2.1. Выращивание бактериальных культур.

Rhodococcus rhodochrous, штамм NCIMB 13805. Культивирование проводили аэробно при 37°C в колбах на качалке (125 мл среды в колбах объемом 750 мл, 250 об/мин и 70 об/мин) в богатой питательной среде broth E («Himedia», Индия) или модифицированной среде Сатона (г/л: MgSO₄·7H₂O – 0,5; L-аспарagine – 4; железоаммонийный цитрат – 0,05; трёхзамещённый цитрат натрия – 2; K₂HPO₄·3H₂O – 7,75; NaH₂PO₄·2H₂O – 4,25; 1% раствор ZnSO₄·7H₂O – 0,1 мл; глицерина – 60 мл).

Micrococcus luteus, штамм NCIMB 13267. Культивирование проводили аэробно при 30°C в колбах на качалке (200 мл среды в колбах объемом 750 мл, 200 об/мин и 70 об/мин) в богатой питательной среде broth E («Himedia», Индия) или минимальной среде с лактатом лития (LMM) (г/л: KH₂PO₄ – 8; NH₄Cl – 4; лактат лития – 5; биотин – 0,005; метионин – 0,02; инозин – 0,04; тиамин – 0,04; мг/мл: ZnSO₄ – 0,05; H₃BO₄ – 0,05; CuSO₄ – 0,024; Na₂MoO₄ – 0,025; Ca(NO₃)₂·6H₂O – 0,05; MnCl₂ – 0,5; MgSO₄ – 7,0; FeSO₄ – 1,0).

2.2. Общее число клеток (ОЧК) в миллилитре культуры определяли в камере Горяева, по формуле: $n/5 \cdot 10^8$, где n – среднее количество клеток в одном малом квадрате.

2.3. Микроскопические исследования проводили с помощью микроскопа Eclipse E4000 («Nikon», Япония), используя приставку для фазового контраста и цифровую камеру Camedia C-4040 («Olympus», Япония). Для определения степени повреждения мембранные клетки окрашивали пропидиум иодидом (4 мкМ в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7), который окрашивает клетки только с поврежденной мембраной за счет проникновения внутрь и взаимодействия с нуклеиновыми кислотами.

2.4. Распределение клеток по размеру. Распределение клеток и клеточных агрегатов по размерам регистрировали с помощью дифракции лазерного луча на дифракционном определителе размера частиц "Malvern 3600Ec". Для анализа распределений частиц по размерам была использована зависимость: $n_i = f(r_i)$, где n_i – численная доля размерной группы r_i . Для этих целей мы также использовали метод динамического светорассеивания с использованием фотонного спектрометра («PhotoCor Instruments Inc.», США). Данные обрабатывали с помощью коррелирующей программы PhotoCor-FC и DynaLS («Alango», Израиль).

2.5. Получение супернатантов для стимуляции роста бактерий. Культуры *R. rhodochrous* и *M. luteus* были выращены на среде Сатона и LMM соответственно. После центрифугирования (12000 g, 20 мин) супернатанты стерилизовали фильтрацией через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Для концентрирования супернатанта использовали роторный испаритель («Labconco», США).

2.6. Анализ компонентов супернатанта. Анализ супернатанта проводили с помощью метода гель-фильтрации на колонке с носителем Sephadex G-10 («Pharmacia», США). На колонку наносили концентрированный супернатант (1% от объема колонки) и элюировали минимальной средой (LMM), после чего

получившиеся фракции тестировали на биологическую активность в культуральных плашках при 30°C на качалке 200 об/мин. После этого повторно наносили супернатант на колонку, но элюировали водой. Отобранные по биологической активности фракции анализировали с помощью метода хроматомассспектроскопии («SHIMADZU», Япония).

2.7. Электрофорез белков в ПААГ по Лэммли. Денатурирующий электрофорез белков в присутствии додецилсульфата натрия проводили по стандартным методикам в электрофоретической камере фирмы («Bio-Rad» США) при 4°C, ток 30 мА на 1 пластину. Для электрофореза использовали 12% ПААГ.

2.8. Иммуноблоттинг рекомбинантных белков.

Электрофорез белков проводили в двух одинаковых пластинах 12% SDS ПААГ, одну из которых затем окрашивали коллоидным Кумасси G-250, а вторую использовали для собственно блоттинга, проводившегося в специальной ячейке («BIORAD», США) в буфере ТГЭС, (г/л триц – 3,2, глицин – 14,4, ДДС-На – 1, этанол – 200 мл, довести дистиллированной водой до 1 л). Блоттинг проходил на мембрану Millipore Nitrocellulose НАНУ (размер пор 0,45 мкм) в течение 16 часов при 50 мА и 4°C. Снижение неспецифического связывания проводили инкубацией мембранны в буфере TBS+3%BCA при 37°C и 50 об/мин в течение часа. После этого мембрану промывали 3 раза по 10 мл TBS (20 mM трис-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl (20 ml 1 M трис-HCl, pH 8,0; 8,7 г NaCl; H₂O до 1 л)). Первичные АТ (поликлональные кроличьи АТ против Rpf: 100 мкл препарата АТ в 8 мл TBS) инкубировали с мембрани в течение 1-2 часов при 37°C и 50 об/мин, после чего мембрану промывали 3 раза по 5 мин (10 мл TBS + твин 80 (0,05%)) при 37°C и 50 об/мин. Вторичные АТ (анти-кроличий щелочной фосфатазный коньюгат («Sigma», Германия)) использовали в разведении 1:5000 (2 мкл анти-кроличий щелочной фосфатазный коньюгат / 10 мл TBS + твин 80 (0,05%)). Анализ проводили в течение 40 мин при 37°C и 50 об/мин. Мембрану промывали 3 раза по 5 мин (10 мл TBS + твин 80 (0,05%)) при 37°C, затем аналогично - TBS, после чего окрашивали 3-5 мин специальным красителем («Sigma», Германия) при комнатной температуре.

2.9. Иммуноферментный анализ. Бактериальный супернатант (0.2 мл) был помещен в пластиковые 96-луночные планшеты («Costar», США), которые инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем лунки промывали 3 раза фосфатным буфером, содержащим 0,05% твина-80. Первичные анти-Rpf антитела кролика добавляли в разведении 1:10000 в каждую лунку, и дальнейшая инкубация проходила при 37°C в течение 45 минут. После 3-х кратной промывки добавляли вторичные антитела (анти-кроличий щелочной фосфатазный коньюгат (Sigma, 1:5000)). Затем после очередного цикла промывки добавляли субстрат щелочной фосфатазы и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Интенсивность окраски определяли сканированием планшетов при длине волны 405 нм («Labsystem optical reader», Финляндия). Для калибровки метода использовали различные концентрации рекомбинантного белка Rpf в соответствующей культуральной среде.

2.10. Получение Rpf и его модификаций. Рекомбинантный Rpf белок из штамма *E. coli* LMG194, содержащий плазмиду Rpf-HisTag/pBAD/g111, был получен при выращивании клеток продуцента на RM среде (г/л: казаминовые кислоты – 20, Na_2HPO_4 – 6, KH_2PO_4 – 3, NaCl – 0,5, NH_4Cl – 1; мл/л: 1М раствор тиамина – 0,1, 1М раствор MgCl_2 – 1, pH 7,4 с добавлением 10 мл 20% раствора глюкозы и 1мл 10% раствора ампидиллина) при 37°C и 150 об/мин. Индукцию проводили добавлением 0,01% L-арабинозы («ДиаМ», Россия) после того, как плотность культуры достигала 0,5-0,7 единиц оптической плотности (D_{600}). После 4-х часовой инкубации культуру центрифугировали в течение 15 минут при 4000 об/мин. Клетки ресуспенсировали в буфере, содержащем 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , pH 8,0, 10 мкг/мл РНКазы и 10 мкг/мл ДНКазы. Клеточную суспензию озвучивали на ультразвуке («Soniprep 150», Япония) после центрифугирования (10000 об/мин, 30 минут) супернатант разбавляли в 3 раза и наносили на аффинную колонку Ni-NTA агароза («Qiagen», Германия). Колонку промыли последовательно 10 объемами СБ, 10 объемами СБ с 10 mM имидазола («Sigma», Германия), 2 объемами СБ с 20 mM имидазола. Элюцию проводили 20 mM трис-HCl pH 7,2, со 100 mM гистидина («Sigma», Германия). Элюат дialisировали против 20 mM трис-HCl pH 7,2 в течение ночи при температуре 4°C . Готовый препарат белка разводили равным объемом глицерина и хранили при -20°C . Количество белка определяли спектрофотометрическим методом. Рекомбинантные белки с аминокислотными заменами получали по той же схеме, что и не модифицированный Rpf.

2.11. Приготовление грубого препарата клеточных стенок *M. luteus*. Культуру *M. luteus* (Штамм NCIMB 13267) выращивали на богатой среде broth E («HiMedia», Индия) при 30°C на качалке (200 об/мин) до оптической плотности (D_{600}) равной 1,5 единицам. После этого клетки осаждали на центрифуге при 10000 об/мин в течение 15 минут. Полученный осадок промывали 0,9% раствором NaCl три раза. Промытый осадок ресуспенсировали в 20 мл 4% раствора ДДС-На и автоклавировали 20 минут при 121°C . Затем суспензию центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 минут. Осадок отмывали от ДДС-На три раза 0,1% раствором Тритона X-100, а затем три раза 10 mM буфером трис-HCl pH 8,0. После этого суспензию высушивали на роторном испарителе до полного испарения влаги. Высушеннюю суспензию хранили при -20°C .

2.12. Определение литической активности белка Rpf по отношению к грубому препарату клеточных стенок *M. luteus*. Высушенный осадок клеток, обработанных ДДС-На ресуспенсировали в фосфатном буфере pH 7,0 и гомогенизировали полученную суспензию в стеклянном гомогенизаторе. Суспензию добавляли в 96-луночный планшет по 300 мкл в каждую лунку. В лунки добавляли белок Rpf до конечной концентрации 1 мкг/мл. Несколько лунок оставляли в качестве контрольных (добавляли 100 mM фосфатный буфер pH 7,0). После этого образцы инкубировали 2 часа при 30°C и 900 об/мин. Литическую активность Rpf смотрели по уменьшению оптической плотности суспензии обработанных клеток

(D₆₀₀), которую измеряли на планшетном спектрофотометре Multiscan Ascent («Thermo labsystems», Финляндия)

2.13. Определение мурамидазной активности белков Rpf и его модификаций. Для определения мурамидазной активности рекомбинантного белка использовали субстрат 4-метилумбелиферил-β-d-N,N',N'-триацетилхитотриозид – (MUF-3-NAG) («Sigma», Германия). Субстрат (конечная концентрация 8 мкМ) инкубировали с белком (конечная концентрация 1-10 мкг/мл) в присутствии 5 мМ MgSO₄ в 50 мМ цитратном буфере (рН 6,0) в течение 3 часов при температуре 37°C. Интенсивность флюoresценции измеряли на спектрофлуориметре RF-5301PC («SHIMADZU», Япония) при длине волны возбуждения 360 нм и эмиссии 450 нм.

2.14. Проточная цитометрия. Проводилась с помощью проточного цитометра («Skatron Ltd», Англия). Для детекции родамина 123 (маркёр мембранных потенциала) был использован флуоресцентный фильтр со следующими характеристиками: длина волны возбуждения 470 – 495 нм, длина волны испускания 520 – 550 нм. Образцы окрашивались с помощью родамина 123 (конечная концентрация 0,3 мкМ) в 50 мМ натрий-fosфатном буфере, рН 7,4, в течение 1 часа при комнатной температуре.

В третьей главе представлены собственные результаты.

Ингибирующий эффект интенсивного перемешивания на рост культур *Rhodococcus rhodochrous* и *Micrococcus luteus* в жидких обеднённых средах.

Было обнаружено, что рост культуры *R. rhodochrous* в жидкой обеднённой среде (среда Сатона) ингибирался интенсивным перемешиванием (в колбах с отбойниками) (Рис. 1), в то время как на богатой среде этого явления не наблюдалось. Одним из возможных объяснений данного явления могло быть повышенное количество кислорода, наблюдающееся при интенсивном перемешивании. Однако *R. rhodochrous* является облигатным аэробом, и кислород не должен ингибировать её рост. Для контроля был поставлен эксперимент, в котором в неподвижную колбу стерильный воздух подавался принудительно. Как видно из рис. 1 в этом опыте наблюдался видимый рост культуры, из чего следует, что повышенное содержание кислорода не является причиной остановки роста. Аналогичное явление было обнаружено при исследовании роста другой ГЦ-богатой бактерии – *M. luteus*: при культивировании в жидкой обеднённой среде (LMM), интенсивное перемешивание ингибировало рост (Рис. 2), в то время как на богатой среде (МПБ) такого эффекта не наблюдалось. В данном случае надо учесть, что температура культивирования была оптимальной для роста бактерий на богатой среде (37°C). Однако при снижении температуры до 30°C, рост культуры в жидкой обеднённой среде становился менее чувствителен к перемешиванию. Надо заметить, что на агаризованных обеднённых средах обе эти культуры росли хорошо и количество колоний было близко к таковому на богатой агаризованной среде (МПА). Изучение культуры *R. rhodochrous* в световом микроскопе обнаружило, что при оптимальных условиях культивирования в жидкой среде в начальных фазах

роста клетки в большинстве своём находятся в агрегатах, тогда как в условиях интенсивного перемешивания культура в основном представлена единичными клетками (Рис. 3). Эти визуальные наблюдения были подтверждены с помощью метода динамического светорассеивания, который позволяет оценивать состояние культуры при малых концентрациях клеток. На рисунке 4 представлены данные распределения частиц в культуре *M. luteus* при разных режимах культивирования. Видно, что при умеренном перемешивании и пониженной температуре культура представлена в основном довольно крупными агрегатами, в тоже время при повышенной температуре и интенсивном перемешивании культура представлена в основном единичными клетками и небольшими агрегатами. Таким образом, интенсивное перемешивание сильно влияет на степень агрегированности этих культур при выращивании в жидких средах и в тоже время ингибирует рост в жидких обеднённых средах.

Однако отсутствие видимого роста не позволяет сделать вывод о том, что реально происходит с культурой, погибают ли клетки или остаются жизнеспособными при интенсивном перемешивании. Для ответа на этот вопрос была прослежена динамика изменения жизнеспособных (колониеобразующих) единиц. На рисунке 5 видно, что при росте в жидкой обеднённой среде и интенсивном перемешивании клетки в культуре *R. rhodochrous* производят несколько генераций, после чего прекращают делиться, однако остаются жизнеспособными длительное время. Добавление к среде культивирования небольших (0,5%) количеств дрожжевого экстракта (ДЭ) полностью снимало ингибирующий эффект интенсивного перемешивания. Это ещё раз подтверждает, что ингибирование проявляется только на обеднённых средах. Культура *M. luteus* ведёт себя подобным образом в аналогичных условиях.

Если клетки *R. rhodochrous* оставались жизнеспособными после остановки деления, логично было бы предположить, что культура возобновит рост при снижении интенсивности перемешивания. Для проверки этого предположения, был проведен эксперимент, в котором первоначальная скорость качалки (250 об/мин) была снижена через определённое время (100 часов) до 70 об/мин. Как видно из рисунка 6, при уменьшении интенсивности перемешивания культура начинала расти, и вырастала до плотностей, характерных для данной среды. Вышеприведённые данные свидетельствуют о том, что интенсивное перемешивание препятствует агрегации клеток *R. rhodochrous* и *M. luteus*, которая, по-видимому, необходима для инициации роста на обеднённых питательных средах.

Клеточная агрегация на ранних стадиях развития бактериальных культур и её механизмы.

Было замечено, что чувствительность роста культур к интенсивности перемешивания характерна только для периода лаг-фазы, в фазе логарифмического роста интенсивное перемешивание не ингибирует рост, а даже наоборот способствует ему. Чем же отличаются клетки в разных фазах с точки зрения

образования межклеточных контактов? На рисунке 7 представлены фотографии, на которых показана степень агрегированности культуры *R. rhodochrous* в разных фазах при росте в условиях умеренного перемешивания. Как видно из рисунка, в инокуляте, в основном, присутствуют единичные клетки. Однако в начале логарифмической фазы роста наблюдается большое количество агрегатов, причём некоторые из них заключены в некие полупрозрачные структуры – «покровы». Агрегаты постепенно распадаются в процессе экспоненциального роста и в стационарной фазе культура представлена в основном единичными клетками.

Для количественной оценки состояния агрегированности клеток был применен метод определения размера частиц с помощью дифракции лазерного луча. Из рисунка 8 видно, что культура в конце лаг-фазы действительно состоит в основном из агрегатов, в то время как к фазе стационарного роста агрегаты практически полностью распадаются на единичные клетки. Такая же картина наблюдается в случае с *M. luteus* растущем на минимальной среде (в данном опыте был применён метод динамического светорассеивания). Из рисунка 9 видно, что практически сразу после засева происходит уменьшение доли единичных клеток и довольно резкое возрастание доли клеточных агрегатов в культуре. Как только клетки переходят к активному росту, происходит обратный процесс, агрегаты постепенно диссоциируют и в культуре возрастаёт доля единичных клеток.

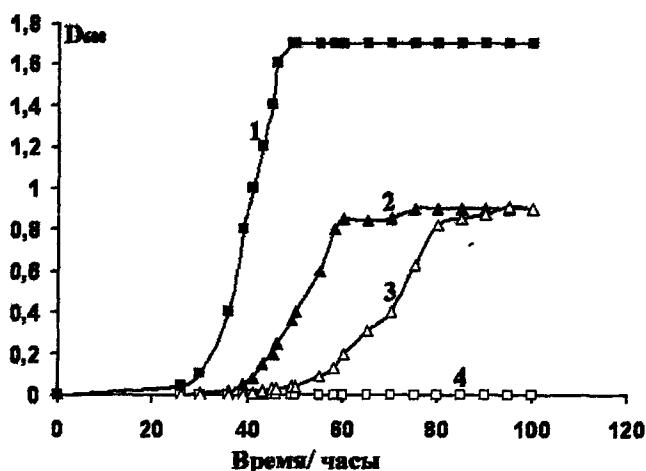


Рис. 1. Рост культуры *R. rhodochrous* при культивировании в жидкой среде Сатона при разных режимах перемешивания. 1-МПБ, интенсивное перемешивание (колба с отбойниками); 2-среда Сатона, умеренное перемешивание (обычная колба); 3-среда Сатона, без перемешивания, принудительная подача воздуха; 4-среда Сатона, интенсивное перемешивание (колба с отбойниками).

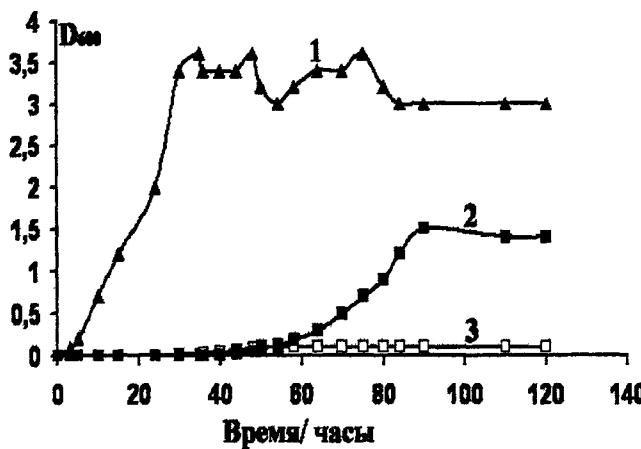


Рис. 2. Рост культуры *M. luteus* при культивировании в жидкой синтетической среде (LMM) при разных режимах перемешивания. 1-МПБ, 250 об/мин; 2-LMM, 70 об/мин; 3-LMM, 250 об/мин.

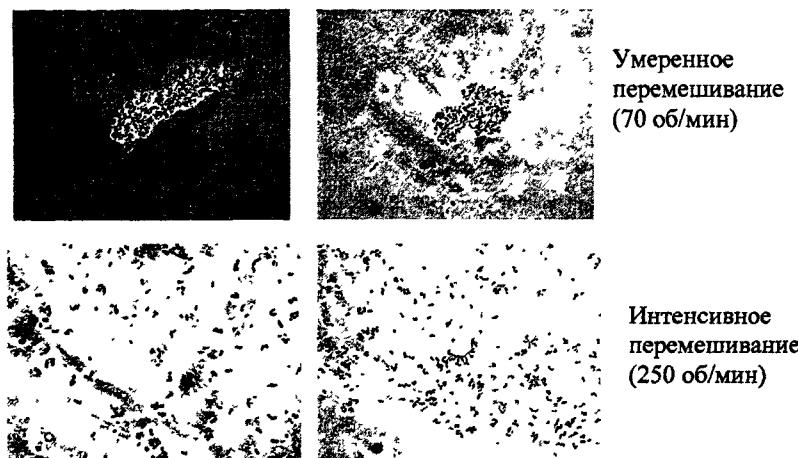


Рис. 3. Степень агрегированности культуры *R. rhodochrous* растущей при разных режимах перемешивания в начале фазы логарифмического роста. Увеличение ×1000.

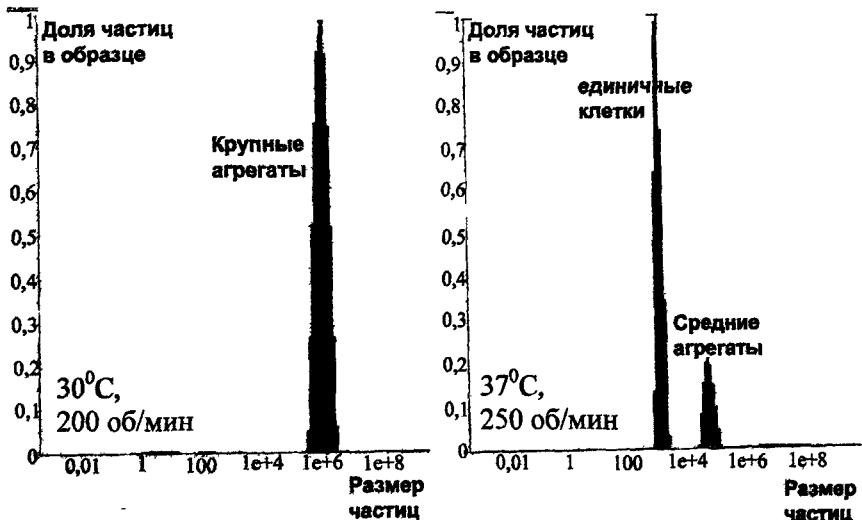


Рис. 4. Распределение клеток и клеточных агрегатов по размерам в культуре *M. luteus*, растущей на минимальной среде в разных условиях в начале фазы логарифмического роста (по данным динамического светорассеивания).

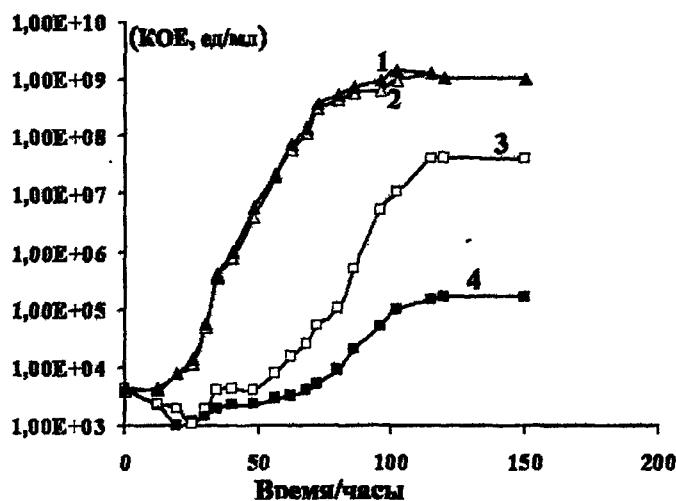


Рис. 5. Изменение концентрации колониеобразующих единиц при выращивании культуры *R. rhodochrous* в условиях умеренного перемешивания и в условиях интенсивного перемешивания. 1-среда Сатона+ДЭ, обычная колба; 2-среда Сатона+ДЭ, колба с отбойниками; 3-среда Сатона, обычная колба; 4-среда Сатона, колба с отбойниками.

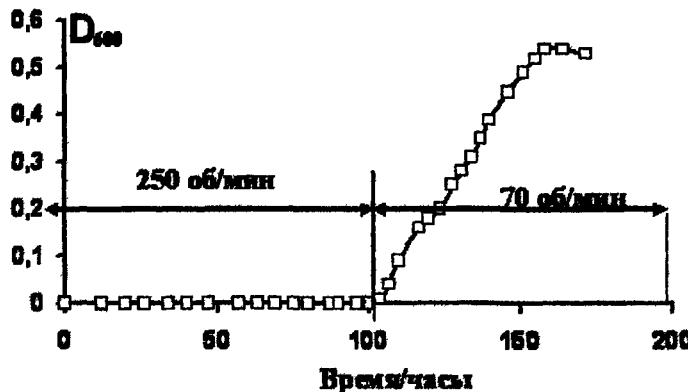


Рис. 6. Возобновление роста культуры *R. rhodochrous* в жидкой среде Сатона после снижения интенсивности перемешивания среды культивирования.

Следует заметить, что на богатых средах поведение культур в целом напоминало таковое на обеднённых. Однако, если на богатых средах время распада агрегатов было небольшим и в начале фазы логарифмического роста крупных агрегатов в культуре уже практически не было, то в случае обеднённой среды распад агрегатов растягивался на всю фазу логарифмического роста.

Так как чувствительность к перемешиванию проявляется только в лаг-фазе, а в фазе логарифмического роста такой чувствительности нет, то нельзя было исключить, что это связано с изменением состава самой среды. Для того чтобы проверить это предположение, был поставлен эксперимент, в котором вместо обеднённой среды использовали супернатант, взятый из фазы логарифмического роста (для каждой бактерии соответственно своя среда). Как видно из рисунка 10 в этих условиях никакого ингибирующего влияния перемешивания не наблюдается, и бактерии растут так же, как и на богатой среде. Кроме того, наблюдалась зависимость стимулирующего эффекта супернатанта от фазы роста культуры, из которой супернатант был получен. На рисунке 11 представлены три кривые роста *M. luteus*. Как видно, кривая роста в пермессивных условиях представлена тремя периодами: практически сразу после засева следует активный рост (период I), после которого наступает довольно длительный период «замедленного роста» (период II), затем культура переходит в фазу экспоненциального роста (период III). Во время периода II визуальный рост культуры практически не наблюдается, и клетки собраны в агрегаты. Как показали наши эксперименты, супернатант, взятый из периода I или II, не проявляет никаких стимулирующих свойств в непермессивных условиях (повышенная температура и интенсивное перемешивание), а супернатант взятый из периода III стимулировал рост клеток в таких условиях. Т.е. супернатант,

взятый из этого периода, напоминает полноценную среду, а супернатант, взятый из периода I или II такими свойствами не обладает.

На основании вышеизложенных данных был сделан вывод, что распад агрегатов и приобретение супернатантом стимулирующей активности связаны между собой. Очевидно, что в супернатанте происходит накопление каких-то веществ, способствующих росту клеток. Одним из простых объяснений может быть то, что эти вещества являются продуктами распада части клеток в популяции. И, действительно, с помощью метода проточной цитометрии (который позволяет оценить физиологическое состояние отдельных клеток, в данном случае по величине мембранныго потенциала) были получены данные, из которых следует, что в лаг-фазе доля активных клеток представляет собой всего 20% от общего числа клеток в культуре (Рис. 12). Однако эта цифра значительно увеличивается, когда культура переходит к активному росту. Используя флуоресцентный краситель – пропидиум иодид, проникающий в клетки с повреждённой мембраной, было также обнаружено, что в агрегатах очень много таких клеток (Рис. 13). Это даёт возможность предполагать, что повреждённые клетки являются источниками веществ, стимулирующих рост жизнеспособных клеток.

Анализ супернатант с помощью диализа и ультрафильтрации показал, что стимулирующие вещества являются низкомолекулярными и устойчивы к нагреванию (автоклавирование при 121⁰C). Дальнейший анализ супернатанта с помощью метода гель-фильтрации с последующей хромато-массспектроскопией показал, что стимулирующую активность имеют небольшие по массе вещества, доминирующими из которых является этил-гексановая кислота (Рис. 14). Поскольку в этих экспериментах для выращивания культуры использовалась синтетическая среда, то источником этой кислоты могли быть только клетки. Но, очевидно, что в супернатанте присутствуют ещё какие-то низкомолекулярные вещества, пока не идентифицированные, которые также могут стимулировать рост клеток.

Подводя итог, можно сделать следующее промежуточное заключение. Клетки *M. luteus* и *R. rhodochrous* в лаг-фазе могут находиться длительное время в агрегатах в жизнеспособном состоянии, возможно, за счет использования питательных веществ, образующихся вследствие лизиса части клеток («микро»криптический рост). Когда концентрация этих веществ достигает определённого размера, достаточного для начала объёмного роста, культура переходит в фазу экспоненциального развития; этот переход связан с постепенным распадом агрегатов.

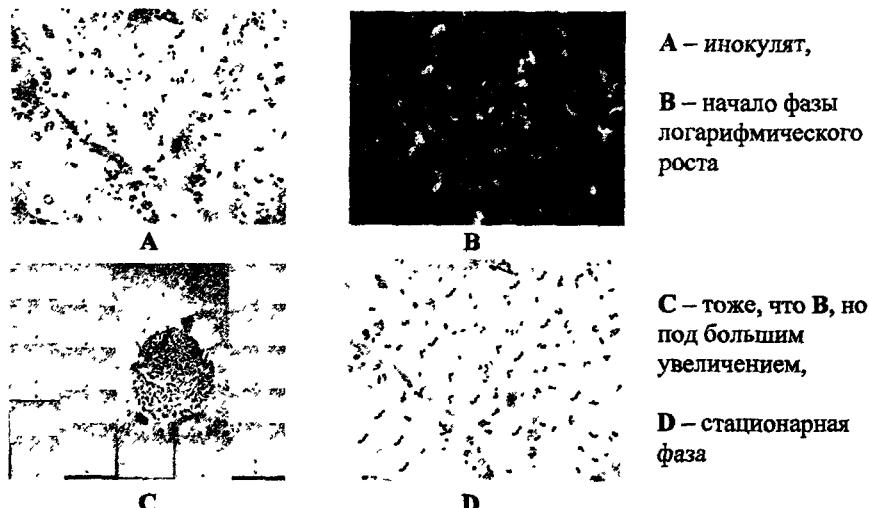


Рис. 7. Агрегация клеток *R. rhodochrous*, растущих в жидкой среде Сатона

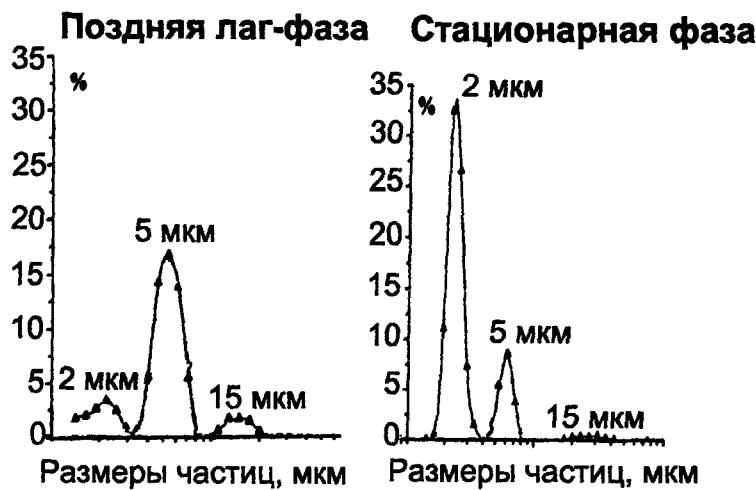


Рис. 8. Процентное содержание частиц различного размера в растущей культуре *R. rhodochrous* (данные, полученные с помощью дифракционного определителя размера частиц "Malvern 3600Ec").

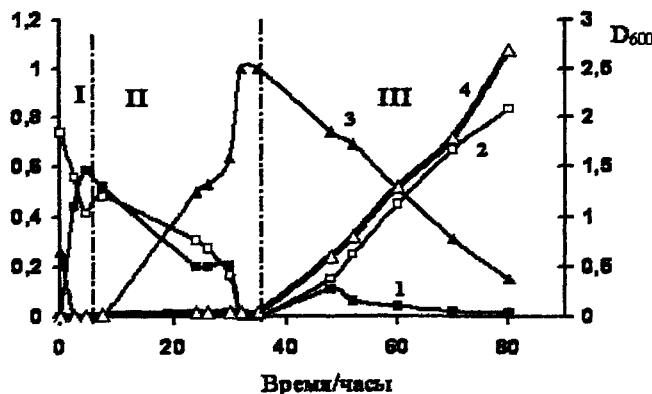


Рис. 9. Численное распределение клеточных агрегатов различного размера и единичных клеток в культуре *M. luteus*, растущей на синтетической среде (по данным динамического светорассеивания). По левой оси ординат отложена доля частиц разного размера в образце. 1-средние агрегаты (5-50 мкм), 2-мелкие агрегаты и одиночные клетки (0,5-5 мкм), 3-крупные агрегаты (50-1000 мкм), 4- D_{600} растущей культуры. Римскими цифрами обозначены периоды, в которых культура находится в разном агрегированном состоянии.

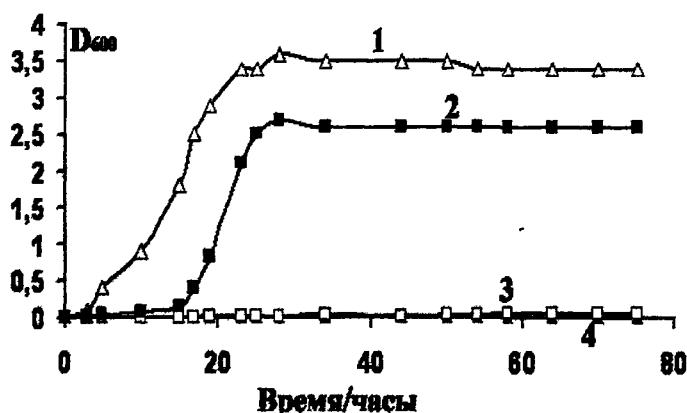


Рис. 10. Стимуляция роста *R. rhodochrous* и *M. luteus*, растущих на бедных средах при интенсивном перемешивании, супернатантами активных культур. 1-*M. luteus*, рост в супернатанте взятом из фазы экспоненциального роста той же бактерии, выращенной на LMM; 2-*R. rhodochrous*, рост в супернатанте взятом из фазы экспоненциального роста той же бактерии, выращенной на среде Сатона; 3-*M. luteus*, рост на LMM; 4-*R. rhodochrous*, рост на среде Сатона.

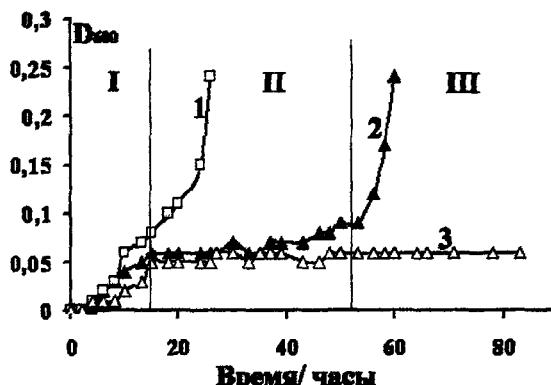
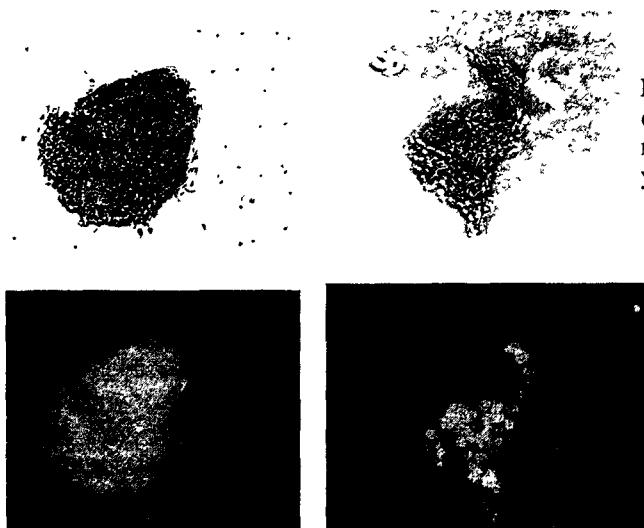


Рис. 11. Стимулирующая активность супернатанта *M. luteus*, полученного из культуры, находящейся на разных фазах развития на синтетической среде (LMM). 1-*M. luteus*, рост в супернатанте взятом из периода III в непермессивных условиях (интенсивное перемешивание); 2-*M. luteus*, рост на среде LMM в пермессивных условиях; 3-*M. luteus*, рост в супернатанте взятом из периода II в непермессивных условиях. Римскими цифрами обозначены периоды роста на начальных стадиях развития культуры *M. luteus* в среде LMM.



Рис. 12. Изменение относительного содержания активных клеток *M. luteus* на начальных стадиях развития культуры, растущей на минимальной среде LMM. 1-кривая роста культуры (D_{600}), 2-относительное содержание клеток, имеющих выраженный мембранный потенциал, определенный методом проточной цитометрии с помощью флуоресцентного зонда – родамина 123.



Клеточные агрегаты в фазово-контрастном микроскопе,
увеличение $\times 1000$.

Эти же агрегаты во флуоресцентном микроскопе,
увеличение $\times 1000$.

Рис. 13. Обнаружение повреждённых клеток в агрегатах *R. rhodococcus* в поздней лаг-фазе.

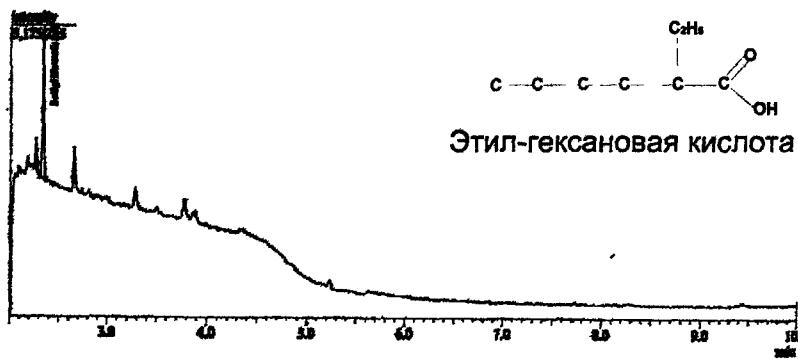


Рис. 14. Хроматограмма супернатанта полученная с помощью метода хромато-массспектроскопии (супернатант, полученный при выращивании *M. luteus* на минимальной среде (LMM), фаза логарифмического роста).

Роль белка Rpf в дезагрегации клеточных ассоциатов бактерии *M. luteus*.

Одной из задач нашего исследования было изучение процесса распада агрегатов и его механизмы. По-видимому, в нём должны участвовать внеклеточные ферменты, проявляющие литическую активность по отношению к клеточной стенке бактерий. Из литературных данных известно, что белок Rpf, ранее открытый и

исследованный в нашей лаборатории, как фактор, стимулирующий активацию покоящихся клеток *M. luteus*, имеет структурное сходство с ферментом лизоцимом, известным, как литический фермент бактериальных клеточных стенок. Из рисунка 15 видно, что у лизоцима имеются три альфа-спирали пространственное расположение которых сходно с расположением альфа-спиралей консервативного домена Rpf, согласно предсказанной модели на основе аминокислотной последовательности Rpf.

Исходя из этих данных, можно предположить, что Rpf также может обладать литической активностью по отношению к клеточным стенкам, и, таким образом, принимать участие в дезагрегации клеточных ассоциатов. Для выявления мурамидазной активности мы использовали специфический субстрат МУФ-3-НАГ, применяемый для измерения активности лизоцима и являющийся линейной цепочкой трех молекул ацетил глюкозамина, входящего в структуру клеточной стенки. Как видно из рисунка 16, рекомбинантная форма белка Rpf действительно способна гидролизовать 1-4 связи в молекуле МУФ-3-НАГ. Однако удельная активность Rpf в 50 раз меньше, чем таковая у лизоцима. Для того чтобы выяснить, насколько механизм катализа молекулы Rpf близок к таковому у лизоцима, были использованы мутантные белки Rpf, у которых в предполагаемом (по аналогии с лизоцимом) активном центре произведены замены важных для катализа аминокислот. Например, замена глутамата E54 – центральной аминокислоты для катализа у лизоцима – на глутамин приводила лишь к некоторому уменьшению активности. Замены E54 на аланин и, особенно, лизин вызывали значительно больший эффект подавления литической активности Rpf (Рис. 16). Были также исследованы и другие замены – например, двух остатков цистеина, которые могли скреплять молекулу Rpf в виде дисульфидной связи. Единичные замены C53 и C114 приводили лишь к частичному подавлению активности, а их совместная замена приводила к практически полной инактивации Rpf (Рис. 16).

Эти данные позволили нам предположить, что, по-видимому, между лизоцимом и Rpf действительно имеется определенное сходство, однако возможно механизм действия Rpf все же отличается от такового у лизоцима. В любом случае действие Rpf приводит не к тотальному лизису всей клеточной стенки, а, по-видимому, к расщеплению определенных β -1-4 связей в структуре муреина, что делает пептидогликановый слой более рыхлым и позволяет проводить с ним различные модификации, которые, в частности, имеют место при распаде клеточных агрегатов.

Для того чтобы выяснить, как продукция Rpf коррелирует с распадом клеточных агрегатов отбирали супернатант из растущей культуры *M. luteus* и исследовали его с помощью иммуноблоттинга специфическими антителами к Rpf. Оказалось, что максимум Rpf образуется в фазе логарифмического роста (Рис. 17), а именно в этот момент происходит активный распад клеточных агрегатов.

На рисунке 18 представлены данные динамического светорассеивания и световой микроскопии культуры *M. luteus*, взятой из середины логарифмической

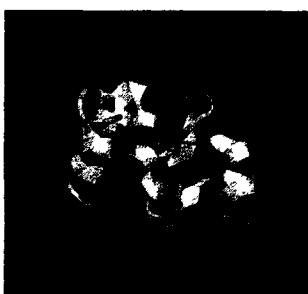
фазы роста и обработанной рекомбинантным Rpf в концентрации 10 мкг/мл. Видно, что до обработки культура представлена двумя популяциями агрегатов размерами несколько десятков и несколько сотен микрон, после обработки Rpf культура представлена в основном единичными клетками и маленькими агрегатами размером несколько микрон.

Дополнительное свидетельство о роли Rpf в дезагрегации было получено при исследовании мутантного штамма *M. luteus* с инактивированным геном Rpf. Оказалось, что такой мутант растёт практически, как и дикий тип, однако, при росте клетки сильно агрегируют (Рис. 19), причём агрегаты данного мутантного штамма не распадаются даже в процессе роста культуры.

Эти данные, конечно, не объясняют детали механизма распада клеточных агрегатов, но являются подтверждением того, что Rpf участвует в процессе дезагрегации и, таким образом, способствует активному росту клеток при переходе от лаг-фазы к фазе экспоненциального роста.



Лизоцим



Консервативный
Домен Rpf

Рис. 15. Структура консервативного домена белка Rpf.

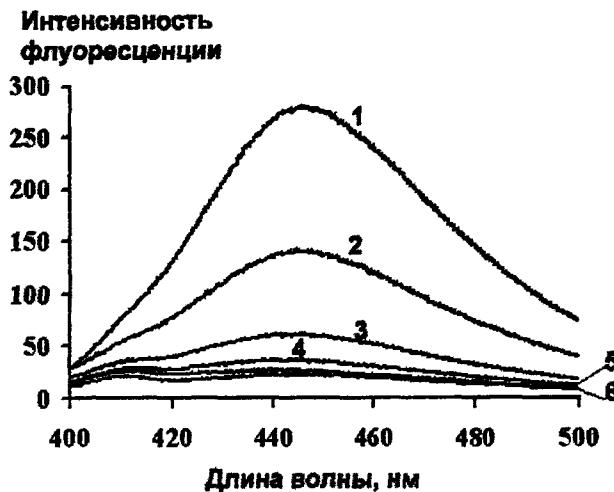


Рис. 16. Мурамидазная активность рекомбинантных белков Rpf.

Rpf(1), мутантные формы Rpf: E54Q(2), E54A(3), E54K(4), C53K+C114T(5); контроль-буфер(6). Е – глутамат, С – цистеин, А – аланин, Q – глутамин, К – лизин, Т – треонин. (Приведены спектры флуоресценции MUF-3-NAG после 3 часового гидролиза при 37°C в присутствии белков Rpf)

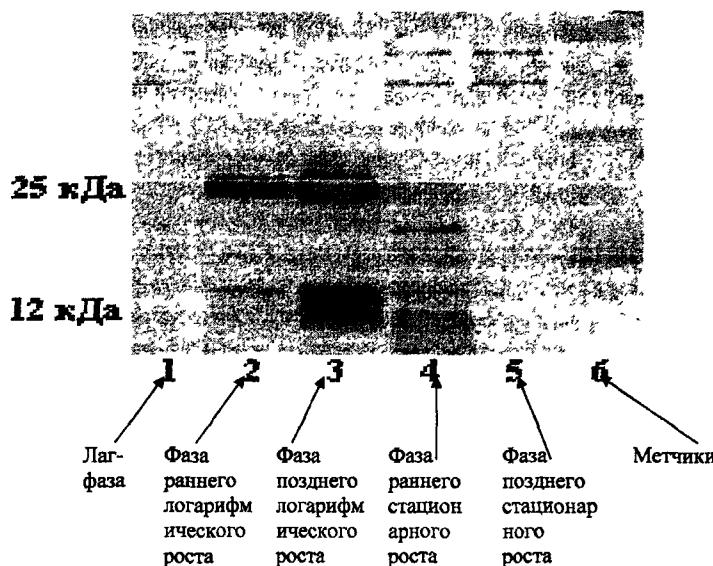


Рис. 17. Секреторные формы Rpf в культуральной жидкости *M. luteus*.

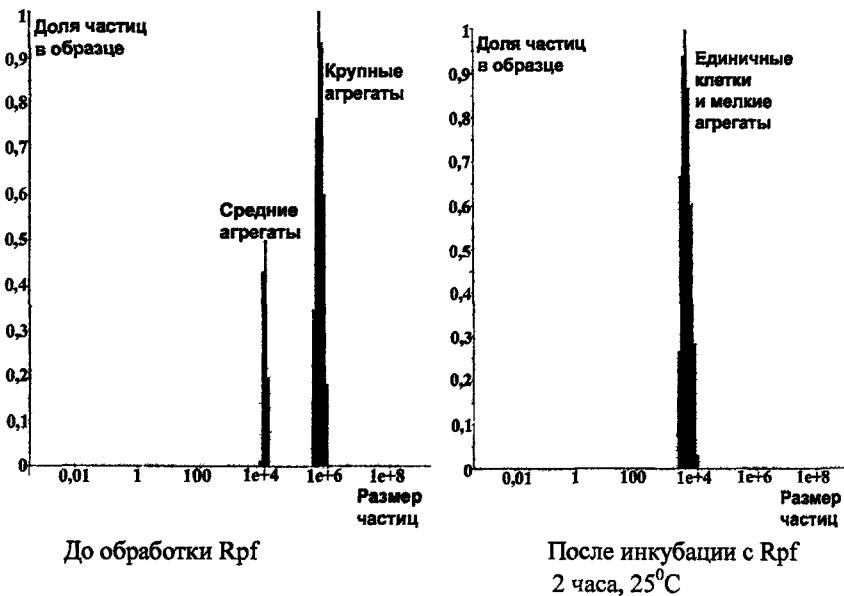


Рис. 18. Влияние белка Rpf на клеточные агрегаты *M. luteus* (фаза логарифмического роста).

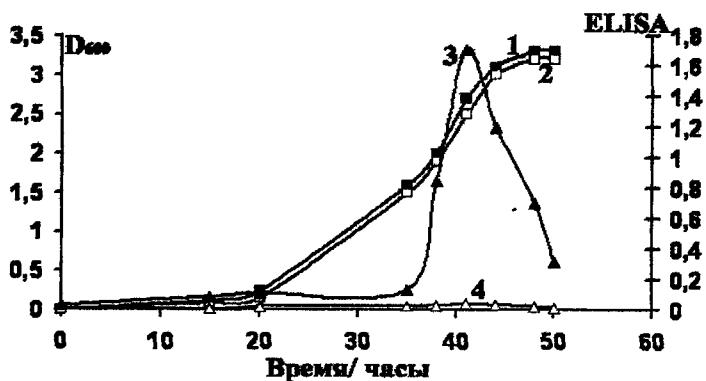


Рис. 19. Количество Rpf, секрецируемого в супернатант, двух культур *M. luteus*: мутант по гену *rpf* и дикий тип. 1-*M. luteus* дикий тип; 2-*M. luteus* мутант; 3-Rpf дикий тип; 4- Rpf мутант.

Обсуждение.

Клеточная агрегация у некоторых видов бактерий является давно известным фактом. Однако исследователи уделяли мало внимания этому явлению, особенно его биологическому смыслу. В нашей работе мы показали значимость этого явления для выживания бактерий *R. rhodochrous* и *M. luteus* в стрессовых условиях (обеднённая питательная среда, интенсивное перемешивание)

Исходя из данных, полученных в нашей работе, мы предлагаем следующую гипотезу. В условиях обеднённых питательных сред клетки бактерий, возможно, не способны расти независимо, как индивидуальные организмы, так как для роста нужны некие вещества, которые отсутствуют в среде культивирования. В этих условиях, в лаг-фазе, клетки образуют агрегаты, и дальнейшее развитие культуры происходит в пределах агрегатов. При этом некоторая доля клеток лизируется, и часть продуктов этого лизиса может служить источником субстратов для оставшихся клеток. Логично предположить, что определенная часть субстратов попадает в среду культивирования и концентрация их в макрообъеме повышается. В этот период, видимого роста культуры практически не происходит, и деление клеток, в основном, происходит в пределах агрегатов. В это время также идёт незначительный синтез Rpf и его накопление в агрегатах и в среде. Увеличение концентрации питательных веществ в макрообъеме до определённого уровня приводит к тому, что среда становится пригодной для автономного роста бактерий. В результате увеличения синтеза Rpf агрегаты начинают распадаться на отдельные клетки, и культура переходит в фазу экспоненциального роста. Однако, если условия не позволяют клеткам образовать агрегаты (интенсивное перемешивание), то культура остаётся в лаг-фазе довольно продолжительное время и затем погибает. Конечно, данная схема является гипотетической, однако она достаточно хорошо объясняет экспериментальные данные, полученные в этой работе. Таким образом, мы предполагаем, что агрегация бактерий путем установления межклеточных контактов при росте в жидких средах позволяет данному виду развиваться на бедной среде в условиях, когда рост единичных клеток невозможен. Такой «кооперативный» тип роста бактерий может представлять новый вид стратегии выживания клеток в экстремальных условиях

Выходы.

- 1) Рост бактерий *R. rhodochrous* и *M. luteus* в жидких средах сопровождается образованием клеточных агрегатов в лаг-фазе и их распадом в фазе экспоненциального роста.
- 2) Факторы, препятствующие образованию клеточных агрегатов в лаг-фазе, вызывают остановку роста *R. rhodochrous* и *M. luteus* в обеднённой жидкой среде.
- 3) При росте бактерий в обеднённой жидкой среде происходит частичный лизис клеток и выход в культуральную жидкость низкомолекулярных веществ, способных стимулировать рост бактерий.
- 4) Секретируемый клетками *M. luteus* белок Rpf, проявляющий мурамидазную активность, участвует в диссоциации клеточных агрегатов.
- 5) Предложена новая стратегия роста и размножения бактерий в обеднённых питательных средах, включающая образование клеточных агрегатов на начальных стадиях развития и криптический рост.

Список публикаций.

- 1) Волошин С. А., Капрельянц А.С. (2003) Роль межклеточных взаимодействий в развитии культуры *Rhodococcus rhodochrous* при росте в жидких питательных средах. 7-ая школа-конференция молодых учёных, Пущино. С. 268.
- 2) Voloshin S.A., Kaprelyants A.S. (2003) Cell-cell contacts are essential for the growth of bacterial cultures under poor nutrient conditions. 1-st congress of European Microbiologist, Liubliana. P. 451.
- 3) Волошин С. А., Капрельянц А. С. (2004) Клеточная агрегация как стратегия выживания бактериальных популяций в стрессовых условиях на примере бактерии *Micrococcus luteus*. 8-ая школа-конференция молодых учёных, Пущино, С. 144.
- 7) Волошин С. А., Капрельянц А. С. (2004) Адаптация бактериальных популяций к неполноценным питательным средам как пример «социального поведения» микроорганизмов. Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой, материалы второй региональной конференции молодых учёных. Саратов, С. 37-38
- 4) Волошин С. А., Капрельянц А.С. (2004) Межклеточные взаимодействия в бактериальных популяциях. // Биохимия. Т. 69, № 11. С. 1555–1564.
- 5) Волошин С.А., Шлеева М.О., Сыроешкин А.В., Капрельянц А.С. (2005) Роль межклеточных контактов для инициации роста и образования временно-некультивируемого состояния культурой *Rhodococcus rhodochrous* при развитии на бедных средах. // Микробиология. Т. 74, № 4. С. 420–427.
- 6) Волошин С. А., Капрельянц А.С. (2005) Изучение клеточной агрегации в культурах *Micrococcus luteus* методом динамического светорассеивания. // Прикладная Биохимия и Микробиология. № 6. Т. 44 с. 647-651.
- 8) Волошин С.А., Дёмина Г.Р., Стеканова Т.Н., Дудик Т.В., Телков М.В., Мукамолова Г.В., Капрельянц А.С. (2005) Белок Rpf участвует в ремоделинге клеточной стенки бактерии *Micrococcus luteus*. 9-ая школа-конференция молодых учёных, Пущино. С. 188



Подписано к печати 9.11.05
Тираж 100 экз. Заказ № 195

ООП МГУ

№ 21213

РНБ Русский фонд

2006-4
21963