

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. Капрелянц**

Официальные оппоненты

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

Ведущая организация

Институт биохимии и физиологии
Микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
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

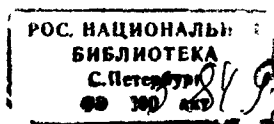
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В современной микробиологии интенсивно дебатруется 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, секретируемых клетками, которые участвуют в таких процессах, как споруляция, конъюгация, биолюминесценция, 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 жидких 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, секретируемых клетками, на эти процессы.
4. Исследовать какие механизмы лежат в основе диссоциации клеточных агрегатов. Изучить возможное участие секретируемого 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 поддерживать деление части клеток и дальнейшую инициацию видимого роста.
3. Впервые приведены убедительные доказательства того, что секретируемый 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» (Пушино, 2003), The 1-st Congress of European Microbiologist (Slovenia, Liubliana, 2003), «Горизонты физико-химической биологии» (Пушино, 2004), «Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой» (Саратов, 2004), «Горизонты физико-химической биологии» (Пушино, 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-Na – додецилсульфат натрия, ДЭ – дрожжевой экстракт, АТ – антитела, БСА – бычий сывороточный альбумин, СБ – связывающий буфер, D_{600} – оптическая плотность при длине волны 600 нм, ТБС – солевой трис-буфер, ТГЭС – трис глицин этанол ДДС-Na 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 уделено 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: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; L-аспарагин – 4; железоаммонийный цитрат – 0,05; трёхзамещённый цитрат натрия – 2; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 7,75; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ – 4,25; 1% раствор $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 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: KH_2PO_4 – 8; NH_4Cl – 4; лактат лития – 5; биотин – 0,005; метионин – 0,02; инозин – 0,04; тиамин – 0,04; мг/мл: $ZnSO_4$ – 0,05; H_3BO_4 – 0,05; $CuSO_4$ – 0,024; Na_2MoO_4 – 0,025; $Ca(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ – 0,05; $MnCl_2$ – 0,5; $MgSO_4$ – 7,0; $FeSO_4$ – 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 мембраны 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 3600Ес". 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 хроматомасспектроскопии («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 трис – 3,2, глицин – 14,4, ДДС-Na – 1, этанол – 200 мл, довести дистиллированной водой до 1 л). Блоттинг проходил на мембрану Millipore Nitrocellulose HANU (размер пор 0,45 мкм) в течение 16 часов при 50 мА и 4°C. Снижение неспецифического связывания проводили инкубацией мембраны 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 мембраной 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 конъюгат («Sigma», Германия)) использовали в разведении 1:5000 (2 мкл анти-кроличий щелочной фосфатазный конъюгат / 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 конъюгат (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: казеиновые 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 ампициллина) 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 ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ 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 мМ имидазола («Sigma», Германия), 2 объемами СБ с 20 мМ имидазола. Элюцию проводили 20 мМ трис- HCl pH 7,2, со 100 мМ гистидина («Sigma», Германия). Элюат диализовали против 20 мМ 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 ресуспендировали 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 мМ буфером трис- HCl pH 8,0. После этого суспензию высушивали на ротационном испарителе до полного испарения влаги. Высушенную 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 ресуспендировали 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 мМ 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 (pH 6,0) в течение 3 часов при температуре 37°C. Интенсивность флюоресценции 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 мембранного 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-фосфатном буфере, pH 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) ингибировался 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 – «покрывы». 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 возрастает доля единичных клеток.

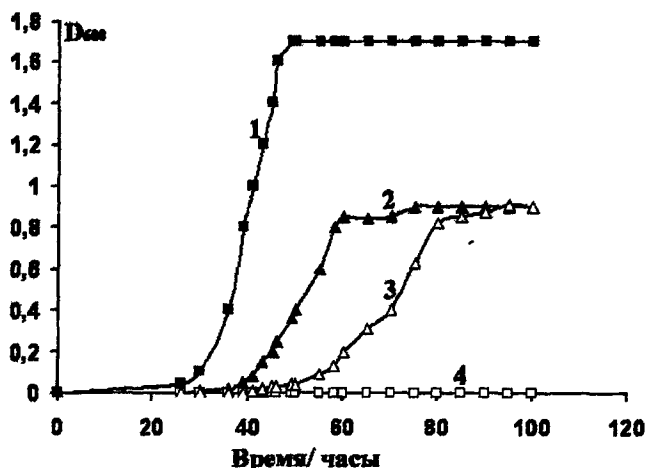


Рис. 1. Рост культуры *R. rhodochrous* при культивировании в жидкой среде Сатона при разных режимах перемешивания. 1-МПБ, интенсивное перемешивание (колба с отбойниками); 2-среда Сатона, умеренное перемешивание (обычная колба); 3-среда Сатона, без перемешивания, принудительная подача воздуха; 4-среда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

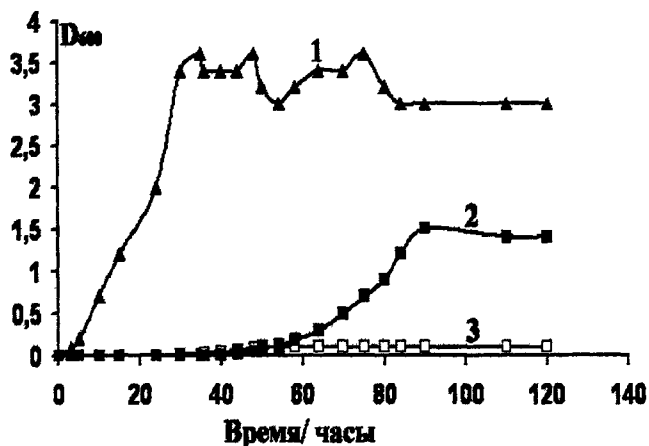
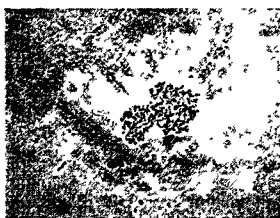
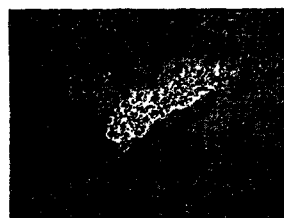
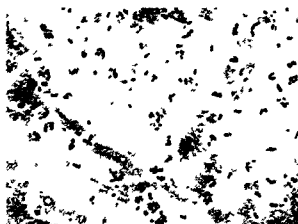


Рис. 2. Рост культуры *M. luteus* при культивировании в жидкой синтетической среде (LMM) при разных режимах перемешивания. 1-МГБ, 250 об/мин; 2-LMM, 70 об/мин; 3-LMM, 250 об/мин.



Умеренное
перемешивание
(70 об/мин)



Интенсивное
перемешивание
(250 об/мин)

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

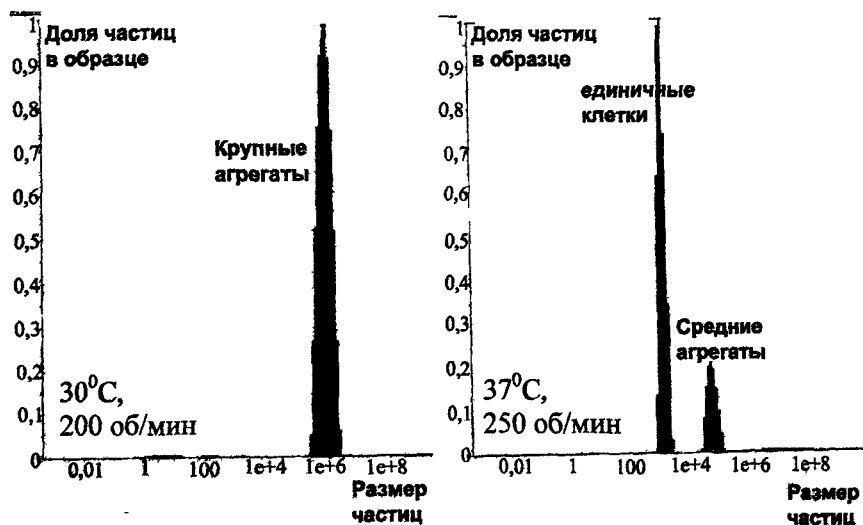


Рис. 4. Распределение клеток и клеточных агрегатов по размерам в культуре *M. luteus*, растущей на минимальной среде в разных условиях в начале фазы логарифмического роста (по данным динамического светорассеивания).

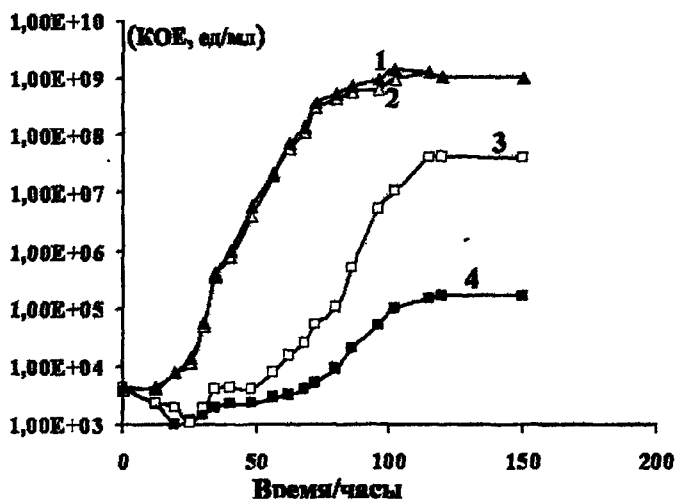


Рис. 5. Изменение концентрации колониеобразующих единиц при выращивании культуры *R. rhodochrous* в условиях умеренного перемешивания и в условиях интенсивного перемешивания. 1-среда Сатона+ДЭ, обычная колба; 2-среда Сатона+ДЭ, колба с отбойниками; 3-среда Сатона, обычная колба; 4-среда Сатона, колба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

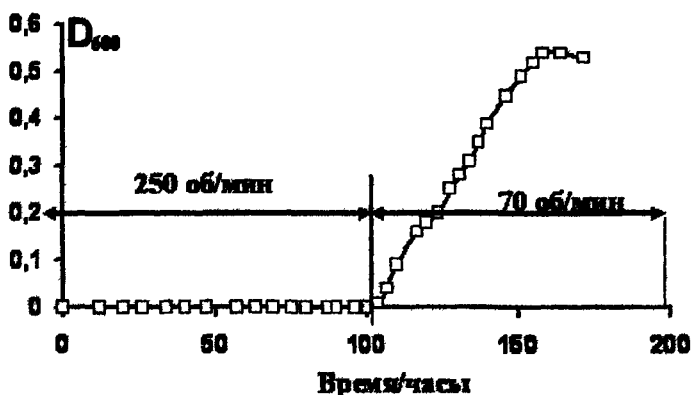


Рис. 6. Возобновление роста культуры *R. rhodochrous* в жидкой среде Сатона после снижения интенсивности перемешивания среды культивирования.

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.

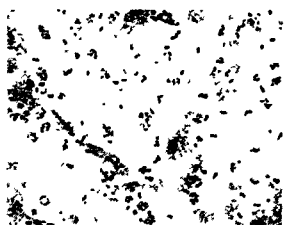
Так как чувствительность к перемешиванию проявляется только в лаг-фазе, а в фазе логарифмического роста такой чувствительности нет, то нельзя было исключить, что это связано с изменением состава самой среды. Для того чтобы проверить это предположение, был поставлен эксперимент, в котором вместо обеднённой 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 пермиссивных 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 непермиссивных 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 мембранного 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 супернатанта с помощью диализа и ультрафильтрации показал, что стимулирующие вещества являются низкомолекулярными и устойчивы к нагреванию (автоклавирование при 121°C). Дальнейший анализ супернатанта с помощью метода гель-фильтрации с последующей хромато-масс-спектроскопией показал, что стимулирующую активность имеют небольшие по массе вещества, доминирующим 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.

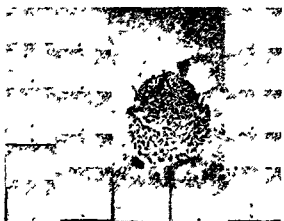
Подводя итог, можно сделать следующее промежуточное заключение. Клетки *M. luteus* и *R. rhodochrous* в лаг-фазе могут находиться длительное время в агрегатах в жизнеспособном состоянии, возможно, за счет использования питательных веществ, образующихся вследствие лизиса части клеток («микро»криптический 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.



A



B



C



D

A – инокулят,

B – начало фазы
логарифмического
роста

C – тоже, что **B**, но
под большим
увеличением,

D – стационарная
фаза

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

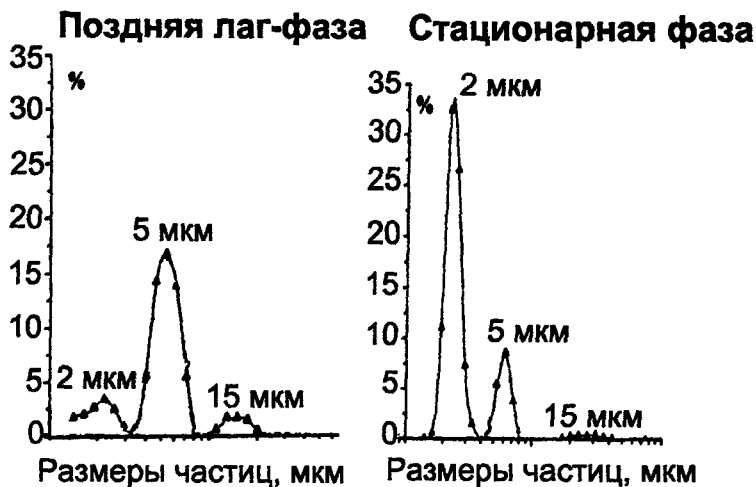


Рис. 8. Процентное содержание частиц различного размера в растущей культуре *R. rhodochrous* (данные, полученные с помощью дифракционного определителя размера частиц "Malvern 3600Ec").

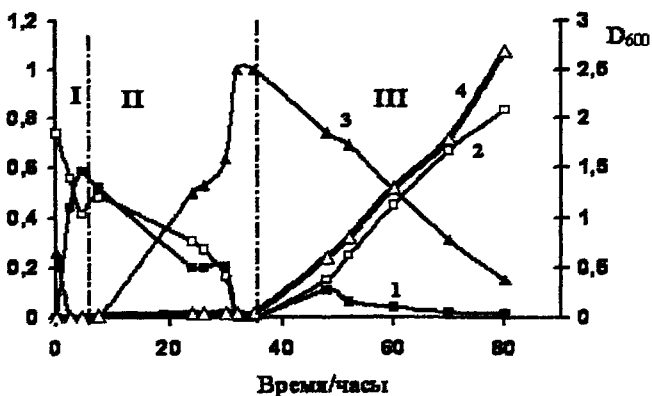


Рис. 9. Численное распределение клеточных агрегатов различного размера и единичных клеток в культуре *M. luteus*, растущей на синтетической среде (по данным динамического светорассеивания). По левой оси ординат отложена доля частиц разного размера в образце. 1-средние агрегаты (5-50 мкм), 2-мелкие агрегаты 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.

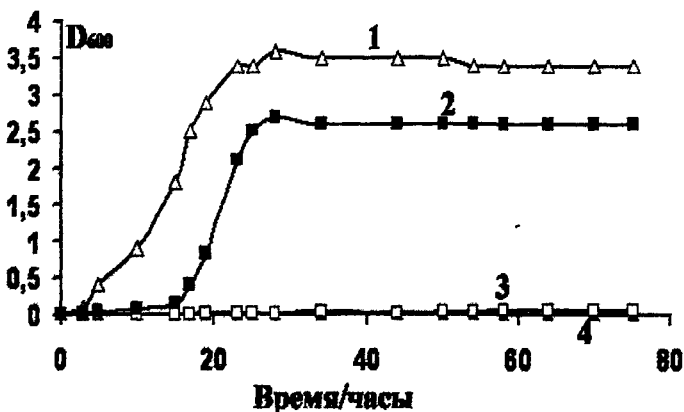


Рис. 10. Стимуляция роста *R. rhodochrous* и *M. luteus*, растущих на бедных средах при интенсивном перемешивании, супернатантами активных культур. 1-*M. luteus*, рост в супернатанте взятом из фазы экспоненциального роста той же бактерии, выращенной на LMM; 2-*R. rhodochrous*, рост в супернатанте взятом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

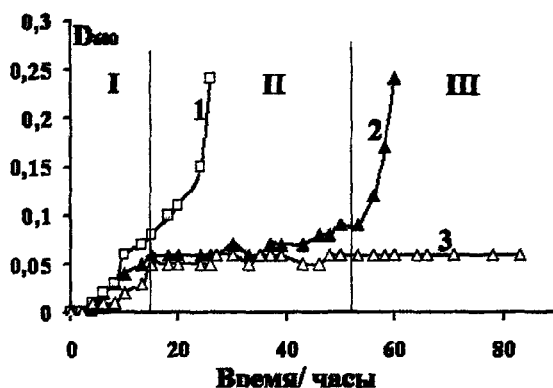


Рис. 11. Стимулирующая активность супернатанта *M. luteus*, полученного из культуры, находящейся на разных фазах развития на синтетической среде (LMM). 1-*M. luteus*, рост в супернатанте взятом из периода III в непрямых условиях (интенсивное перемешивание); 2-*M. luteus*, рост на среде LMM в прямых условиях;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

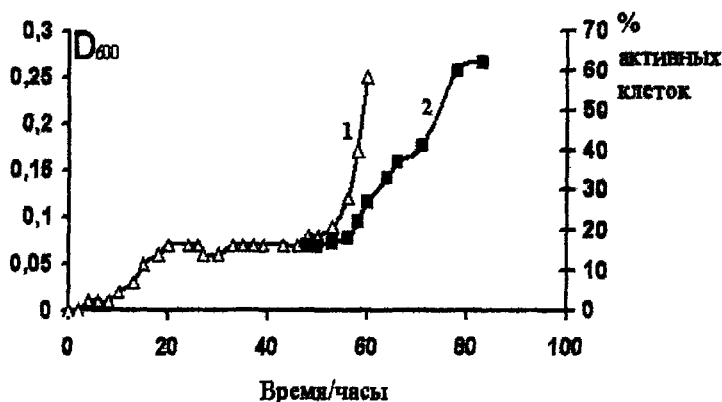


Рис. 12. Изменение относительного содержания активных клеток *M. luteus* на начальных стадиях развития культуры, растущей на минимальной среде LMM. 1-кривая роста культуры (D_{600}), 2-относительное содержание клеток, имеющих выраженный мембранный потенциал, определенный методом проточной цитометрии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

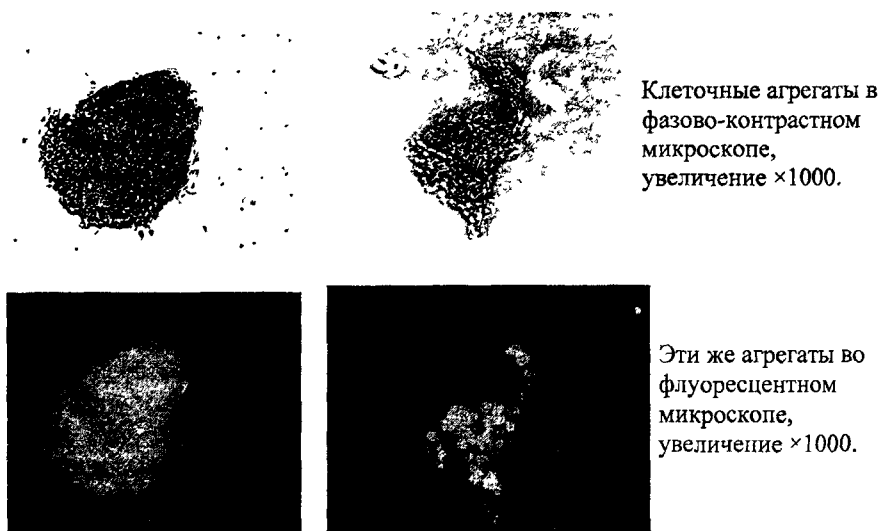


Рис. 13. Обнаружение повреждённых клеток в агрегатах *R. rhodococcus* в поздней лаг-фазе.

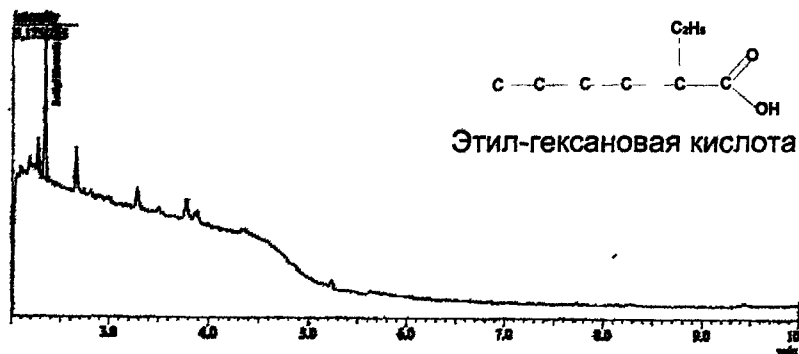


Рис. 14. Хроматограмма супернатанта полученная с помощью метода хромато-масспектрологии (супернатант, полученный при выращивании *M. luteus* на минимальной среде (LMM), фаза логарифмического роста).

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

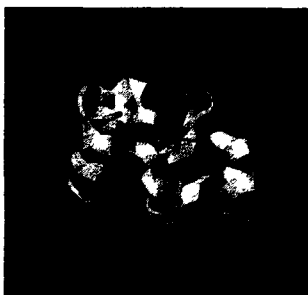
фазы роста и обработанной рекомбинантным Rpf в концентрации 10 мкг/мл. Видно, что до обработки культура представлена двумя популяциями агрегатов размерами несколько десятков и несколько сотен микрон, после обработки Rpf культура представлена в основном единичными клетками и маленькими агрегатами размером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

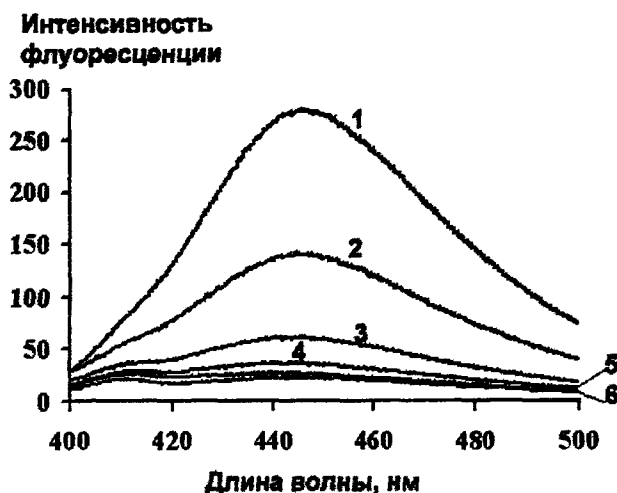


Рис. 16. Мурамидазная активность рекомбинантных белков Rpf. Rpf(1), мутантные формы Rpf: E54Q(2), E54A(3), E54K(4), C53K+C114T(5); контроль-буфер(6). Е – глутамат, С – цистеин, А – аланин, Q – глутамин, К – лизин, Т – треонин. (Приведены спектры флуоресценции MUF-3-NAG после 3 часового гидролиза при 37°C в присутствии белков Rpf)

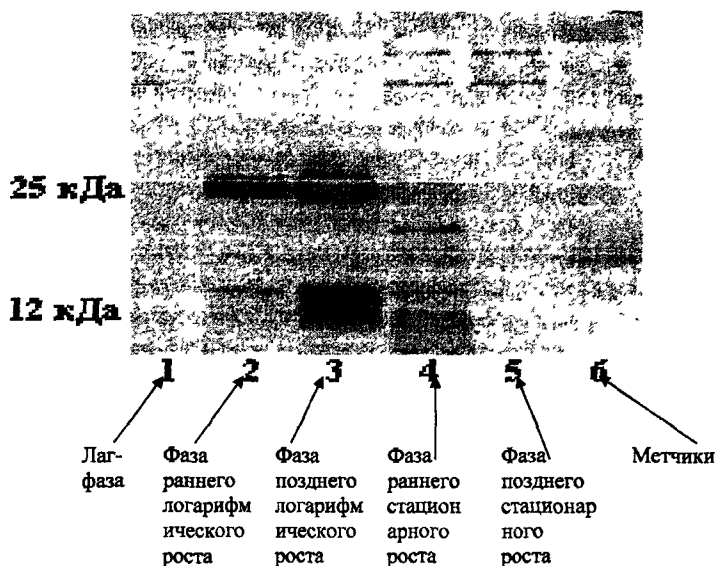


Рис. 17. Секреторные формы Rpf в культуральной жидкости *M. luteus*.

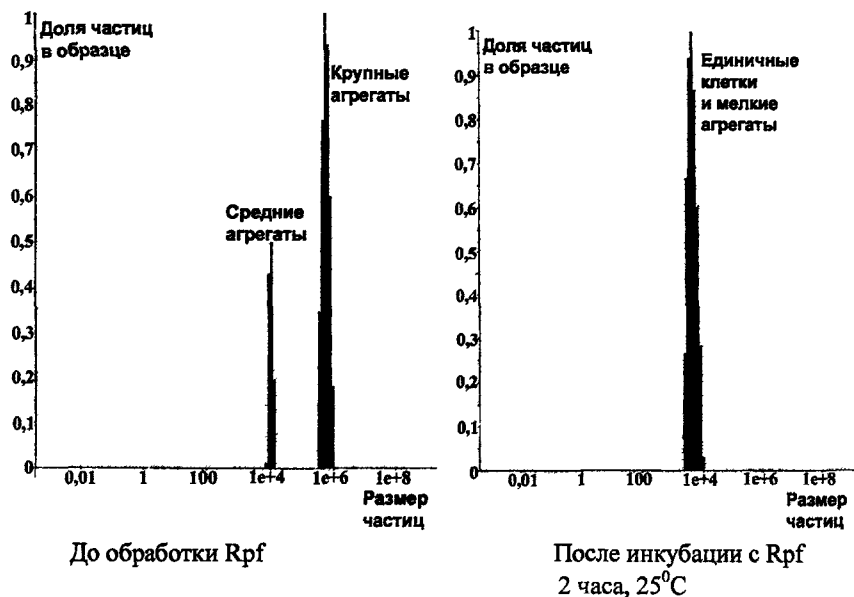


Рис. 18. Влияние белка Rpf на клеточные агрегаты *M. luteus* (фаза логарифмического роста).

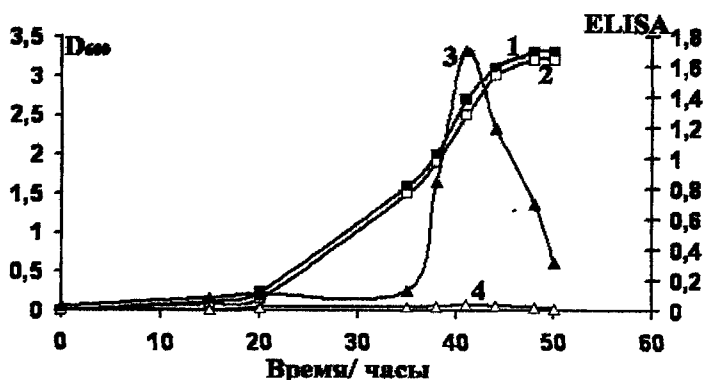


Рис. 19. Количество Rpf, секретируемого в супернатант, двух культур *M. luteus*: мутант по гену *rpf* и дикий тип. 1-*M. luteus* дикий тип; 2-*M. luteus* мутант; 3-Rpf дикий тип; 4- Rpf мутант.

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

Выводы.

- 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, Пушино. 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, Пушино, 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., Стеханова 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, Пушино. С. 188



Подписано к печати 9.11.05
Тираж 100 экз. Заказ № 195

ООП МГУ

№ 21213

РНБ Русский фонд

2006-4

21963