

УДК 579.22

Е.В. Лепехина, О.Н. Октябрьский

Пермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия,
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
Пермь, Россия

Г.В. Смирнова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
Пермь, Россия

**ДЕЙСТВИЕ СТРЕПТОМИЦИНА НА БАКТЕРИИ *E. COLI*,
МУТАНТНЫЕ ПО ТИОЛОВЫМ РЕДОКС-СИСТЕМАМ,
ПРИ ТЕМПЕРАТУРНЫХ СТРЕССАХ**

Широкое распространение штаммов патогенных микроорганизмов, устойчивых к лечебным препаратам, привело к резкому снижению эффективности терапии инфекционных болезней. Поиск новых антибиотиков требует более глубоких исследований адаптационных реакций клетки на вызванный антибактериальными препаратами стресс с целью обнаружения новых внутриклеточных мишеней. Наряду с этим все большее внимание уделяется исследованию условий, модифицирующих действие антибиотиков.

*В связи с этим в данной работе изучено действие стрептомицина при неоптимальных температурах на бактерии *Escherichia coli*, мутантные по тиоловым редокс-системам. Устойчивость бактерий к стрессовым воздействиям оценивали по удельной скорости роста на минимальной среде M9 и колониеобразующей способности методом высева на чашки Петри с LB-агаром по стандартной методике. При выполнении исследований использовалась библиотека делеционных мутантов *Escherichia coli* (Keio collection) по генам *gshA*, *gor*, *trxA*, *trxB*, *grxA*, *grxB* и их родительский штамм. Кроме того, использовались двойные мутанты *gshAtrxA* и *gortrxB*, сконструированные в Лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН.*

В результате исследований впервые была выявлена V-образная зависимость чувствительности бактерий к стрептомицину от температуры в диапазоне от 20 до 46 °С. В культурах дикого

типа и большинства мутантов вид кривой был тесно связан с изменением скорости роста бактерий при разных температурах культивирования. Показано, что мутации по компонентам тиоловых редокс-систем существенным образом влияют на чувствительность бактерий к стрептомицину.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, окислительный стресс, тиоловые редокс-системы, антибиотикорезистентность, стрептомицин, температурные стрессы.

E.V. Lepekhina, O.N. Oktyabrskij

Perm National Research Polytechnic University,
Perm, Russian Federation
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS,
Perm, Russian Federation

G.V. Smirnova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS,
Perm, Russian Federation

EFFECT OF STREPTOMYCIN ON *E. COLI* MUTANTS IN THIOL REDOX SYSTEMS UNDER TEMPERATURE STRESSES

Widespread pathogenic strains of microorganisms resistant to therapeutic drugs led to a sharp decrease in efficiency of the treatment of infectious diseases. The search for new antibiotics requires a more in-depth studies of adaptive reactions to cell stress caused by antibacterial agents for the detection of new intracellular targets. In addition, the increasing attention paid to the study of conditions that modify the action of antibiotics.

*Therefore in this study we investigated the effects of streptomycin under the action of suboptimal temperatures on bacteria *Escherichia coli* defected with thiol redox systems. Bacterial resistance to stresses assessed by specific growth rate in a minimal medium M9, and the colony-forming ability by plating on Petri dishes with LB-agar plates according to standard procedures. We used a library of deletion mutants of *Escherichia coli* (Keio collection) in genes *gshA*, *gor*, *trxA*, *trxB*, *grxA*, *grxB* and their parent strain. Also double mutants *gshAtrxA* and *gortrxB* were constructed at the Laboratory of Physiology and Genetics of Microorganisms IEGM UB RAS.*

As a result of studies it was first detected V-shaped relationship between bacteria sensitivity to streptomycin and temperature, ranging from 20 to 46 °C. The form of the curve in cultures of wild type and mutants was closely associated with changes in the rate of growth of the bacteria at different cultivation temperatures. It has been shown that the mutations in the components of thiol redox systems significantly affect the sensitivity of bacteria to streptomycin.

Keywords: *Escherichia coli; oxidative stress; thiol redox systems; antibiotic resistance; streptomycin; temperature stresses.*

В связи с появлением феномена антибиотикорезистентности все большее внимание уделяется исследованию механизмов гибели бактериальных клеток и условий, модифицирующих действие антибиотиков. В последние годы в ведущих мировых журналах разгорелась дискуссия о вкладе активных форм кислорода в механизм индуцированной антибиотиками клеточной смерти.

М.А. Kohanski и ряд других исследователей представили доказательства в пользу того, что наряду с действием на специфические молекулярные мишени, бактерицидные антибиотики стимулируют образование активных форм кислорода (АФК), которые вносят вклад в убивание бактерий. Предполагается рассматривать этот процесс как общий механизм индуцированной антибиотиками клеточной смерти [1–3]. Для стрептомицина предложен следующий механизм. Аминогликозидные антибиотики, к которым относится стрептомицин, нарушают синтез белка путем связывания с 30S субъединицей рибосом. Хотя это связывание не предотвращает инициацию синтеза пептида, происходит нарушение элонгации зарождающейся цепи в результате ошибок считывания. Неправильные белки затем могут встраиваться в клеточную мембрану, что ведет к изменению ее проницаемости и дальнейшей стимуляции транспорта аминогликозидов [4]. Предполагают, что при встраивании неправильных белков в клеточную мембрану клетка испытывает «envelope» стресс, что ведет к продукции АФК [5]. Эти работы вызвали широкий резонанс, поскольку открывали новые пути повышения эффективности антибактериальных препаратов. Однако недавно появились работы, опровергающие эту гипотезу и указывающие на то, что активные формы кислорода (АФК) не участвуют в гибели клеток, вызванной антибиотиками [6, 7].

Ранее было обнаружено, что резкие изменения температуры культивирования в аэробных культурах бактерий *Escherichia coli* сопровождаются окислительным стрессом, и показано, что тиоловые ре-

докс-системы играют важную роль в поддержании нормальной жизнедеятельности бактерий в этих условиях [8–11]. Внутриклеточные тиоловые редокс-системы у *E. coli* включают в себя системы глутатиона (GSH, глутатионредуктаза (GOR) и глутаредоксины) и тиоредоксина (тиоредоксины и тиоредоксинредуктаза). Эти системы играют существенную роль в поддержании восстановленного состояния SH-групп в различных белках, многие из которых являются важными ферментами, сенсорными или регуляторными факторами, и прямо или косвенно участвуют в ответе на окислительный стресс [12]. Если окислительный стресс включен в механизм индуцированной антибиотиками смерти, дефекты тиоловых редокс-систем должны существенным образом влиять на чувствительность бактерий к антибиотикам.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили бактерии *E. coli* BW25113 (*wt*) и одиночные делеционные мутанты JW2663 (Δ *gshA*), JW3467 (Δ *gor*), JW0833 (Δ *grxA*), JW1051 (Δ *grxB*), JW5856 (Δ *trxA*), JW0871 (Δ *trxB*) из коллекции Keio. Кроме того, в экспериментах использовали сконструированные в нашей лаборатории методом трансформации плазмид и трансдукции с фагом PI двойные мутанты NM3655 (Δ *gshAtrxA*) и NM3761 (Δ *gortrxB*). Бактерии *E. coli* выращивали в течение 16–18 ч на минимальной среде M9 с добавлением 0,15 % глюкозы и антибиотиков, к которым был устойчив исследуемый штамм. После центрифугирования клетки из ночной культуры ресуспендировали в 100 мл свежей среды до значения оптической плотности 0,1 при 600 нм и далее выращивали при 37 °C в колбах объемом 250 мл в термостатируемом орбитальном шейкере (Россия) при частоте вращения 150 об/мин. В середине логарифмической фазы ($OD_{600} = 0,5$) бактерии обрабатывали сублетальной концентрацией стрептомицина и в течение 2 ч следили за ростом по изменению OD_{600} . В экспериментах с совместным действием неоптимальных температур и стрептомицина температурный стресс производили за 1 ч до добавления антибиотика.

Удельную скорость роста культуры (μ) рассчитывали по формуле

$$\mu = (\ln OD_{t_2} - \ln OD_{t_1}) / (t_2 - t_1),$$

где OD_{t_2} и OD_{t_1} – оптические плотности культуры в моменты времени t_2 и t_1 соответственно, измеренные при длине волны 600 нм.

Колониеобразующую способность определяли через 0, 30, 60 и 120 мин после добавления стрептомицина или начала температурного стресса методом высева на чашки Петри с LB-агаром по стандартной методике.

Результаты и их обсуждение

При изучении влияния температуры на удельную скорость роста (μ) бактерий родительского типа была выявлена характерная кривая с максимумом при 40 °С. Существенных изменений выживаемости, регистрируемых по изменению колониобразующей активности (КОЕ), в диапазоне температур от 20 до 46 °С не наблюдалось. При температуре, близкой к оптимальной (40 °С), как и при 37 °С, пониженные значения удельной скорости роста наблюдали у штаммов, мутантных по *gor*, *trxA* и *gortrxB*. Двойной мутант *gshAtrxA* при 40 °С рос с более низкой скоростью, чем клетки родительского типа. При быстром изменении ростовой температуры до 20 или 46 °С наблюдалось значительное ингибирование роста у всех изученных штаммов. В наибольшей степени этот эффект проявлялся у двойных мутантов *gshAtrxA* и *gortrxB*. У этих бактерий при повышении температуры до 46 °С рост останавливался почти полностью.

В то же время клетки *E. coli trxB* при сифте к 46 °С сохраняли более высокую скорость роста, чем клетки родительского типа, так же как мутант *gshAtrxA* при сифте к 20 °С. Наличие мутаций *gshAtrxA* и *gortrxB* приводило к снижению выживаемости бактерий при всех ростовых температурах.

При обработке стрептомицином через 1 ч экспозиции к этому антибиотику все мутанты, за исключением *trxA*, демонстрировали повышенную устойчивость. Через 2 ч экспозиции мутанты по генам *gshAtrxA*, *gortrxB* и *trxA* имели одинаковую чувствительность с клетками родительского штамма. Остальные мутанты, особенно по глутатионоксидоредуктазе и обоим глутаредоксинам, оставались более устойчивыми к стрептомицину, чем родительский штамм. Рост культуры родительского штамма полностью прекращался через 70 мин после добавления стрептомицина, в то время как *gshAtrxA* и *grxB* мутанты останавливали рост на 10 и 30 мин позже, соответственно, а остальные штаммы – на 20 мин позже, чем родительские клетки. Обнаружена статистически значимая корреляция между выживаемостью и концентрацией пероксида водорода в среде ($r = 0,7$, $P < 0,05$), а также выявлены прямые корреляции между удельной скоростью роста в присутствии стрептомицина и выживаемостью в этих условиях ($r = 0,94$, $P < 0,05$).

Изучалась также зависимость чувствительности к стрептомицину от температуры культивирования бактерий. Для бактерий родительского

типа выявлена характерная V-образная кривая с максимумом чувствительности при 40 °С. Выживаемость бактерий была обратно пропорциональна их удельной скорости роста (μ), максимум которой также достигался при 40 °С. Коэффициент корреляции между μ и \log CFU (число колоний образующих единиц) составлял $-0,90$ для стрептомицина. Таким образом, чувствительность бактерий родительского типа к стрептомицину была максимальной при максимальной скорости роста.

Характер зависимости чувствительности бактерий к стрептомицину от температуры сохранялся у мутантов по компонентам тиоловых редокс-систем. При 20 и 46 °С все мутанты проявляли более высокую устойчивость к антибиотику, чем при 37 и 40 °С. Исключение составил мутант *grxA*, чувствительность которого к стрептомицину при 46 °С была близкой к наблюдаемой при 37 °С. При каждой их испытанных температур мутанты отличались между собой по чувствительности, примечательно, что эти различия в наибольшей степени были выражены при оптимальных для роста температурах (37 и 40 °С) и в наименьшей степени – при экстремальных температурах (20 и 46 °С). При действии стрептомицина наибольшую устойчивость при 37 °С показали мутанты *gor*, *grxA* и *grxB*, при 40 °С – *gor*, *grxA*, *grxB* и *trxB*.

Примечательно, что выживаемость мутантов при тепловом шоке 46 °С в присутствии стрептомицина коррелировала с базовым уровнем продукции пероксида водорода ($r = 0,79$, $P < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в наших условиях температурные стрессы приводили к повышению, а не снижению устойчивости к стрептомицину, что было связано, возможно, с замедлением роста бактерий. При оптимальных температурах одни и те же мутанты проявляли различную устойчивость к стрептомицину, что свидетельствует скорее об участии продуктов мутантных генов в специфическом ответе клетки на антибиотик, чем об их роли в антиоксидантной защите от индуцированных антибиотиками АФК.

Представляется, что изменения в чувствительности тиоловых мутантов к стрептомицину при разных температурах связаны как с различием их редокс-активных свойств, так и с косвенным влиянием мутаций на скорость роста в испытываемых условиях.

Исследования поддержаны грантами РФФИ № 13-04-96039 и 13-04-00706.

Список литературы

1. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics / M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, B. Hayete, C.A. Lawrence, J.J. Collins // *Cell*. – 2007. – Vol. 130. – P. 797–810.
2. Yeom J., Imlay J.A., Park W. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 22689–22695.
3. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics / J. Foti, B. Devadoss, J.A. Winkler, J.J. Collins, G.C. Walker, F. Abramet // *Science*. – 2012. – Vol. 336. – P. 315–319.
4. Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P.M. Aminoglycosides: activity and resistance // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43. – P. 727–737.
5. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger aminoglycoside-mediated oxidative stress and cell death / M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, J. Wierzbowski, G. Cottarel, J.J. Collins // *Cell*. – 2008. – Vol. 135. – P. 679–690.
6. Liu Y., Imlay J.A. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species // *Science*. – 2013. – Vol. 339. – P. 1210–1213.
7. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species / I. Keren, Y.Wu Inocencio, J.L. Mulcahy, K. Lewis // *Science*. – 2013. – Vol. 339. – P. 1213–1216.
8. Lee P.C., Bochner B.R., Ames B.N. AppppA, heat shock stress and cell oxidation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1983. – Vol. 80. – P. 7596–7600.
9. Benov L., Fridovich I. Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177. – P. 3344–3346.
10. Смирнова Г.В., Закирова О.Н., Октябрьский О.Н. Роль антиоксидантных систем в отклике бактерий *Escherichia coli* на тепловой шок // *Микробиология*. – 2001. – Т. 70. – С. 595–601.
11. Smirnova G.V., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. Enhanced resistance to peroxide stress in *Escherichia coli* grown outside their niche temperatures // *J. Therm. Biol.* – 2007. – Vol. 32. – P. 321–327.
12. Роль тиоловых редокс-систем в отклике бактерий *Escherichia coli* на пероксидный стресс / О.Н. Октябрьский, Н.Г. Музыка, В.Ю. Ушаков, Г.В. Смирнова // *Микробиология*. – 2007. – Т. 76. – С. 1–7.

References

1. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 2007, vol. 130, pp. 797–810.
2. Yeom J., Imlay J.A., Park W. Iron homeostasis affects antibiotic-mediated cell death in *Pseudomonas* species. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, pp. 22689–22695.
3. Foti J., Devadoss B., Winkler J.A., Collins J.J., Walker G.C., Abramet F. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*, 2012, vol. 336, pp. 315–319.
4. Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P.M. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, pp. 727–737.
5. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Wierzbowski J., Cottarel G., Collins J.J. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger aminoglycoside-mediated oxidative stress and cell death. *Cell*, 2008, vol. 135, pp. 679–690.
6. Liu Y., Imlay J.A. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*, 2013, vol. 339, pp. 1210–1213.
7. Keren I., Inocencio Y.Wu, Mulcahy J.L., Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*, 2013, vol. 339, pp. 1213–1216.
8. Lee P.C., Bochner B.R., Ames B.N. AppppA, heat shock stress and cell oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, pp. 7596–7600.
9. Benov L., Fridovich I. Superoxide dismutase protects against aerobic heat shock in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, pp. 3344–3346.
10. Smirnova G.V., Zakirova O.N., Oktyabrskij O.N. Rol antioksidantnykh sistem v otklike bakterij *Escherichia coli* na teplovoj shok [The role of antioxidant systems in response *Escherichia coli* to heat shock]. *Mikrobiologiya*, 2001, vol. 70, pp. 595–601.
11. Smirnova G.V., Muzyka N.G., Oktyabrskij O.N. Enhanced resistance to peroxide stress in *Escherichia coli* grown outside their niche temperatures. *J. Therm. Biol.*, 2007, vol. 32, pp. 321–327.
12. Oktyabrskij O.N., Muzyka N.G., Ushakov V.Yu., Smirnova G.V. Rol tiolovykh redoks-sistem v otklike bakterij *Escherichia coli* na peroksidnyj stress [The role of the thiol redox systems in response the bacteria *Escherichia coli* to peroxide stress]. *Mikrobiologiya*, 2007, vol. 76, pp. 1–7.

Получено 20.11.2015

Об авторах

Лепехина Елена Владимировна (Пермь, Россия) – кандидат биологических наук, доцент кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: alenshick@mail.ru); инженер Лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (614081, г. Пермь, ул. Голева, 13).

Октябрьский Олег Николаевич (Пермь, Россия) – доктор биологических наук, заведующий Лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (614081 г. Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: oktyabr@iegm.ru).

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

About the authors

Elena V. Lepekhina (Perm, Russian Federation) – Ph.D. of Biological Sciences, Associate Professor, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: alenshick@mail.ru); engineer of Laboratory of Physiology and Genetics of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS (13, Goleva str., Perm, 614081, Russian Federation).

Oleg N. Oktyabrskij (Perm, Russian Federation) – Dr. of Biological Sciences, the Head of Laboratory of Physiology and Genetics of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS (13, Goleva str., Perm, 614081, Russian Federation, e-mail: oktyabr@iegm.ru).

Galina V. Smirnova (Perm, Russian Federation) – Dr. of Biological Sciences, Leading Researcher of Laboratory of Physiology and Genetics of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UrB RAS (13, Goleva str., Perm, 614081, Russian Federation, e-mail: smirnova@iegm.ru).

ПРОЦЕССЫ И АППАРАТЫ ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

