

УДК 579.22

РОЛЬ БИОСИНТЕЗА КАДАВЕРИНА В АДАПТАЦИИ *Escherichia coli* К ДЕЙСТВИЮ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

© 2022 г. А. В. Ахова¹, *, А. Г. Ткаченко¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: akhovan@mail.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 20.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Исследована роль биосинтеза кадаверина в адаптации *Escherichia coli* к действию пероксида водорода. Показано дозозависимое увеличение уровня экспрессии генов *ldcC* и *cadA*, кодирующих ферменты синтеза кадаверина, в клетках, подвергнутых действию экзогенного пероксида водорода. Обнаружена обратная зависимость чувствительности бактерий от уровня внутриклеточного кадаверина в момент добавки пероксида водорода. Также установлено, что чувствительность бактерий к пероксиду водорода зависела от способности синтезировать кадаверин (наличия генов *ldcC* и *cadA*). В частности, скорость отмирания клеток, неспособных синтезировать кадаверин, была выше по сравнению с клетками способными к его синтезу. Чувствительность к пероксиду водорода увеличилась в ряду изогенных штаммов с генотипом: дикий тип < $\Delta cadA$ < $\Delta ldcC$ < $\Delta ldcC \Delta cadA$. Показана также роль накопления активных форм кислорода, в том числе пероксида водорода, в активации генов *ldcC* и *cadA* в клетках, подвергнутых воздействию антибиотика левофлоксацина.

Ключевые слова: окислительный стресс, кадаверин, полиамины, лизиндекарбоксилаза, перекись водорода, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0555109922050038

Пероксид водорода традиционно используют в качестве биоцидного средства и применяют в медицине, пищевой индустрии и промышленном производстве для дезинфекции и стерилизации поверхностей и инструментов, помещений и готовой продукции, для обработки воды, в качестве антисептика и компонента лекарственных средств [1]. Для обработки применяют пероксид водорода в виде водного раствора или в более эффективной газообразной форме [2]. Одним из преимуществ H_2O_2 по сравнению с другими дезинфектантами является его сравнительно быстрое разложение до нейтральных продуктов и низкие уровни остаточной концентрации. H_2O_2 проявляет активность в отношении широкого спектра микроорганизмов, в том числе вирусов, бактерий, грибов, простейших, устойчивых покоящихся форм бактерий и простейших – эндоспор и цист соответственно, а также, возможно, прионов [3, 4].

H_2O_2 относят к активным формам кислорода (АФК) и его биоцидное действие связано с окислением ключевых биологических макромолекул. Иницирование окисления пероксидом водорода органических соединений может происходить за счет непосредственного взаимодействия молекул,

либо вследствие образования высокореактивных гидроксильных радикалов [5]. В частности, гидроксильные радикалы, способные вызывать окислительное повреждение ключевых биомолекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов), образуются из пероксида водорода в присутствии ионов металлов с переменной валентностью (реакция Фентона).

В природных местах обитания микроорганизмы испытывают воздействие H_2O_2 естественного происхождения. Пероксиды образуются в самой микробной клетке, в частности, в качестве побочного продукта метаболизма у аэробных организмов. Основной путь образования эндогенного H_2O_2 связан с нейтрализацией посредством реакции дисмутации супероксидного аниона, который образуется за счет переноса электрона с компонентов дыхательной цепи непосредственно на кислород [6]. В отсутствие стресса сохраняется баланс между скоростью образования H_2O_2 и его нейтрализацией, поэтому концентрация АФК поддерживается на постоянном, не наносящем ущерба уровне. В условиях воздействия естественных факторов стресса разной природы концентрация H_2O_2 в клетке возрастает и наблюдается развитие окислительного стресса [7, 8]. Образование в клетках

АФК, в том числе H_2O_2 , может быть вызвано воздействием редокс-циклирующих соединений, которые катализируют перенос электрона на кислород с образованием супероксидного аниона. Редокс-циклирующие соединения могут иметь искусственное происхождение или продуцироваться живыми организмами (растениями, бактериями) [9]. Увеличение концентрации H_2O_2 в клетке до уровня способного вызвать повреждения может происходить за счет поступления его из окружающей среды. H_2O_2 может образовываться в водной среде в результате физико-химических процессов, например, фотолиза воды. Кроме того, источником H_2O_2 могут служить другие биологические объекты, например, лактобактерии и клетки иммунной системы макроорганизма [10].

Поскольку бактерии постоянно подвергаются воздействию H_2O_2 в ходе эволюции у них сформировались механизмы защиты, позволяющие справляться с его повреждающим действием. Специальные ферменты (пероксидазы/каталазы), катализируют разложение H_2O_2 до нейтральных продуктов [11]. Нейтрализовать АФК также способны малые антиоксидантные молекулы (глутатион, полиамины, витамины С и Е, каротиноиды), хотя следует отметить, что возможность синтеза витаминов в качестве защитного ответа на окислительный стресс у прокариот не показана. Важную роль в поддержании безопасного уровня свободных радикалов играет контроль количества ионов железа в клетке. Сохранять жизнеспособность в условиях окислительного стресса позволяют системы репарации макромолекул.

У *Escherichia coli* гены, кодирующие белки адаптации к пероксидному окислительному стрессу, объединены в регулон под контролем транскрипционного регулятора ОхуR. Данный белок является непосредственным сенсором пероксида водорода, поскольку его переход в активную форму происходит в результате окисления сульфгидрильных групп имеющих в его составе остатков цистеина (С199 и С208) с образованием дисульфидной связи за счет прямого контакта с H_2O_2 . Активация ОхуR приводит к согласованной индукции экспрессии генов, кодирующих пероксидазы (*kaiG*, *ahpCF*), репрессор транспорта железа из среды (*fur*), компоненты системы восстановления глутатиона и других тиоловых соединений (*gor*, *trxC*, *grxA*), мини-ферритин *dps* и другие белки и функциональные РНК [12].

Ранее было показано, что в ответ на воздействие H_2O_2 в клетках *E. coli* активируется синтез полиаминов (путресцина, спермидина и кадаверина) [13]. Если защитная функция путресцина и спермидина в условиях окислительного стресса продемонстрирована [13, 14], то вклад кадаверина в адаптацию к действию пероксида водорода остается мало изученным.

Цель работы – исследование роли биосинтеза кадаверина в адаптации *E. coli* к пероксидному окислительному стрессу.

МЕТОДИКА

Материалы. Путресцин дигидрохлорид, кадаверин дигидрохлорид, спермидин тригидрохлорид, L-лизин моногидрохлорид, дансилхлорид, левофлоксацин, орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид – производства “Sigma” (США). Растворители, кислоты, пероксид водорода – производства фирмы “Вектон” (Россия), додецилсульфат натрия – “Fluka” (США), полиамины содержали не ниже 98% основного компонента.

Объекты исследования. В качестве объектов исследования использованы штаммы *Escherichia coli* дикого типа (BW25141) и изогенные ему штаммы с делецией гена *ldcC* (BW25141Δ*ldcC*) или гена *cadA* (BW25141Δ*cadA*), а также с делецией обоих генов, кодирующих лизиндекарбоксилазу (BW25141Δ*ldcC*Δ*cadA*) [15].

Для определения уровня экспрессии генов использованы штаммы *E. coli*, несущие транскрипционные слияния *ldcC::lacZ* (штамм SHT40, производный от штамма GC4468) или *cadA::lacZ* (штамм SHT45, производный от штамма GC4468) [15]. Штамм *E. coli* BGF931, несущий генное слияние *katG::lacZ*, предоставлен профессором Б. Демплом (Stony Brook University Medical School, США) [6].

Штаммы *E. coli* BW25141 и GC4468 получены из коллекции CGSC (Йельский университет, США).

Определение уровня экспрессии генов. Уровень экспрессии генов оценивали методом Миллера по активности β-галактозидазы в экстрактах клеток, несущих слияние промоторной части исследуемого гена со структурной частью гена *lacZ* и предварительно обработанных хлороформом и додецилсульфатом натрия [16].

Клетки культивировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл бульона LB (“VWR”, США), при 37°C без ротации в течение 16–18 ч. Полученные культуры разводили в свежей питательной среде до оптической плотности $A_{600} = 0.1$ и культивировали в описанных выше условиях. При оптической плотности культуры $A_{600} = 0.3$ вносили пероксид водорода/антибиотик. Добавку тиомочевины в культуру проводили за 10 мин до внесения пероксида водорода/антибиотика.

Определение оптической плотности культуры. Рост бактериальной культуры оценивали по изменению оптической плотности культуры при длине волны 600 нм (A_{600}) с использованием спектрофотометра UV-1280 (“Shimadzu”, Япония) и кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

Таблица 1. Минимальная подавляющая концентрация пероксида водорода (мкг/мл)

Генотип	Среда					
	LB	ДК	ДК + 10 г/л лизина	М9	М9 + 10 г/л лизина	М9 + 5/25/50 мМ кадаверина
<i>ldcC+cadA+</i>	14.6	7.3	14.6	7.3	7.3	7.3/7.3/7.3
<i>ldcC-cadA-</i>	14.6	14.6	14.6	7.3	7.3	7.3/7.3/7.3
<i>ldcC+cadA-</i>	14.6	7.3	14.6	7.3	7.3	7.3/7.3/7.3
<i>ldcC-cadA+</i>	14.6	14.6	14.6	7.3	7.3	7.3/7.3/7.3

Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) пероксида водорода. МПК определяли методом двукратных серийных разведений пероксида водорода в лунках 96-луночных планшетов. Суспензию бактериальных клеток для анализа готовили, как описано в Руководстве по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам [17] с некоторыми модификациями. Клетки предварительно культивировали в 5 мл среды М9 с добавкой 0.4% глюкозы, бульона LB или декарбоксилазного бульона при 37°C без перемешивания в течение 16–18 ч. В случае культивирования на М9 делали два пассажа культуры. Затем полученные культуры разводили до оптической плотности $A_{625} = 0.09$ и еще в 100 раз в среде соответствующего состава (указаны в табл. 1) и вносили 1 : 1 в лунки планшета, содержащие среду и пероксид водорода. Конечная концентрация бактерий в каждой лунке составляла примерно 5×10^5 КОЕ/мл. Далее планшеты инкубировали при 37°C в течение 18–20 ч. Минимальной подавляющей концентрацией считали наименьшую концентрацию, которая подавляла видимый рост бактерий.

Определение чувствительности бактериальных клеток к пероксиду водорода. Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали по изменению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в культуре. Для определения количества КОЕ культуру клеток разводили в физрастворе и 10 мкл полученной суспензии наносили на поверхность агара LB (“Sigma”, США). Выживаемость рассчитывали в процентах от количества КОЕ в момент добавления пероксида водорода.

В серии экспериментов клетки культивировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл бульона LB, при 37°C без перемешивания (0 об./мин) или с перемешиванием (100 об./мин) в течение 16–18 ч. Полученные культуры разводили в свежей питательной среде до оптической плотности $A_{600} = 0.1$ и культивировали в описанных выше условиях. После достижения оптической плотности $A_{600} = 0.3$, 4.5 мл культуры переносили в пробирки с 0.5 мл раствора пероксида водорода и продолжали культивирование.

В другой серии экспериментов клетки культивировали в пробирках, содержащих 5 мл декарбоксилазного бульона Мёллера (бульон ДК) (“Sigma”, США) без добавок, с добавкой 10 г/л лизина гидрохлорида или 10 мМ кадаверина дигидрохлорида при 37°C без перемешивания в течение 16–18 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (16000 g, 2 мин) и ресуспендировали в физрастворе, процедуру повторяли дважды. Отмытые сконцентрированные клетки переносили в пробирки со свежим ДК-бульоном для получения культур с примерно одинаковой плотностью ($5.2 \pm 2.4 \times 10^6$ КОЕ/мл, среднее \pm стандартное отклонение) и добавляли пероксид водорода (конечный объем культуры со всеми добавками составил 3 мл). В отмытых клетках до воздействия пероксида водорода определяли концентрацию внутриклеточных полиаминов.

Определение концентрации полиаминов в бактериальных клетках. 500 мкл суспензии клеток центрифугировали (16000 g, 2 мин), полученный осадок заливали 100 мкл 0.4 М хлорной кислоты. На этом этапе пробы замораживали и хранили при –20°C. Размороженные пробы интенсивно встряхивали на шейкере в течение 40 мин, после чего обломки клеток осаждали центрифугированием при 16000 g 5 мин. Надосадочную жидкость (клеточный экстракт) использовали для проведения реакции дансирования. Клеточный экстракт, насыщенный раствор карбоната натрия и раствор дансилхлорида (2.7 мг/мл ацетона) в соотношении 1 : 1 : 2 помещали в плотно закрывающиеся микропробирки и инкубировали 2 ч при 37°C. Затем содержимое микропробирок выпаривали, осадок заливали 50 мкл бензола. Бензольный экстракт (10 мкл) наносили на поверхность пластин для ТСХ с силикагелевым покрытием Sorbfil ПТ-СХ-АФ-В (Россия). Разделение проводили в двух последовательных системах: 1 – бензол : триэтиламин 10 : 1, 2 – бензол : карбинол 10 : 0.45. Пластины фотографировали в ультрафиолетовом свете (340 нм) и измеряли интенсивность свечения пятен дансил-полиаминов на цифровом изображении. Идентификацию веществ и расчет концентрации полиаминов проводили методом внешнего стандарта. В качестве стандарта использовали

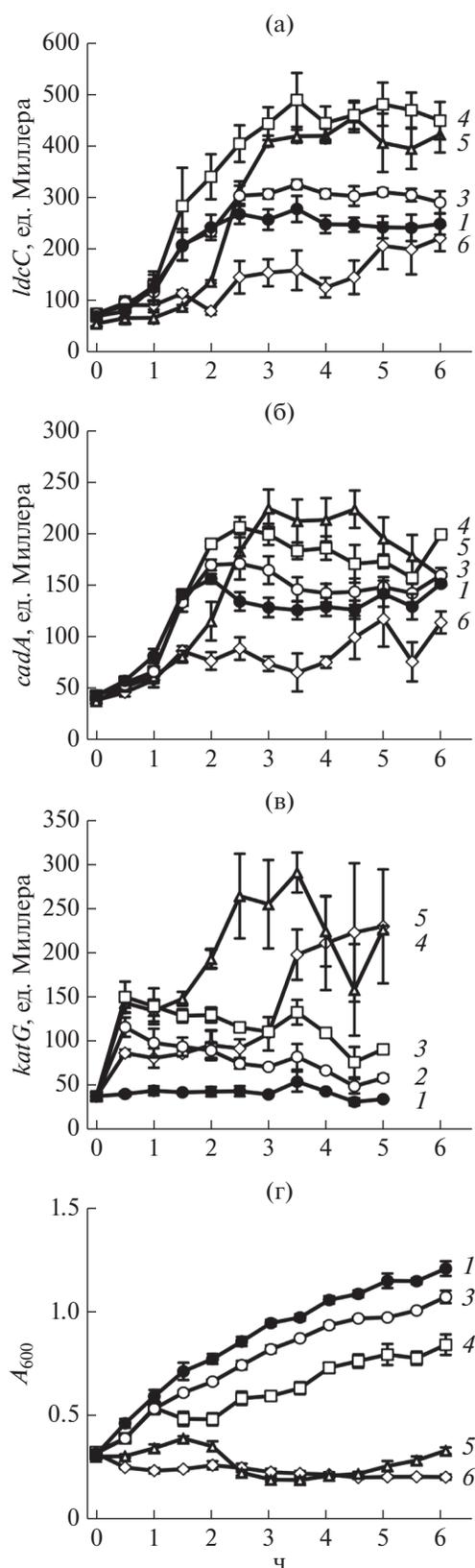


Рис. 1. Влияние пероксида водорода на экспрессию генов *ldcC* (а), *cadA* (б), *katG* (в) и оптическую плотность культуры *E. coli* (г): 1 – контроль без добавки H₂O₂, 2 – 0.1, 3 – 0.5, 4 – 1.0, 5 – 3.0 и 6 – 6.0 мМ H₂O₂.

растворы гидрохлоридов путресцина, кадаверина и спермидина, подвергнутые той же процедуре что и клеточные экстракты.

Статистическая обработка результатов. Обработка результатов проведена с использованием пакета программ Statistica 6.0 (“StatSoft Inc.”, США). Данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего, рассчитанные на основе результатов не менее трех отдельных экспериментов. Оценка статистической значимости различий средних сравниваемых групп произведена с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние пероксида водорода на экспрессию генов *ldcC* и *cadA*. В ранних исследованиях показано, что в клетках *E. coli*, подвергнутых действию H₂O₂, возрастала активность лизиндекарбоксилазы и, как следствие, наблюдалось накопление кадаверина [13]. Фермент, катализирующий синтез кадаверина – лизиндекарбоксилаза, у *E. coli* представлен двумя изоформами, которые кодируются генами *ldcC* и *cadA* [18]. С использованием метода генных слияний исследовали изменение уровня экспрессии этих генов в ответ на воздействие H₂O₂ в концентрации 0.1–6.0 мМ. Добавка в среду H₂O₂ в концентрации 0.5 мМ и выше вызывала повышение уровня экспрессии как гена *ldcC*, так и гена *cadA* (рис. 1а, 1б). Снижение экспрессии генов ниже уровня контроля в присутствии 6 мМ H₂O₂ связано с гибелью бактериальных клеток. Для сравнения в тех же условиях исследовали влияние H₂O₂ на экспрессию гена *katG*, кодирующего каталазу и входящего в *OxyR*-регулон защиты от пероксидного окислительного стресса (рис. 1в). Установлено, что для активации генов, кодирующих лизиндекарбоксилазы, требовались более высокие концентрации H₂O₂, и индукция их экспрессии происходила позднее по сравнению с геном *katG* (1.5–2.0 и 0.5 ч соответственно). Можно предположить, что регуляция экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина, в условиях воздействия пероксида водорода отличается от регуляции экспрессии генов, входящих в *oxyR*-регулон, и опосредована вторичными регуляторами. Тем не менее, увеличение концентрации H₂O₂ можно рассматривать как сигнал для повышения экспрессии генов синтеза кадаверина.

Влияние экзогенного кадаверина на чувствительность бактериальных клеток к пероксиду водорода. Присутствие в среде кадаверина в концентрации 5–50 мМ не оказывало влияния на ингибирующее бактериальный рост действие H₂O₂, как было установлено с применением метода двукратных серийных разведений (табл. 1).

Таблица 2. Влияние состава среды культивирования на содержание полиаминов в клетках *E. coli* в зависимости от их способности синтезировать кадаверин*

Среда	Генотип	Полиамины, нмоль/мг сухой биомассы		
		кадаверин	путресцин	спермидин
ДК	<i>ldcC+cadA+</i>	5.2 ± 0.5	7.7 ± 2.9	5.5 ± 1.5
	<i>ldcC-cadA-</i>	1.4 ± 0.4**	7.6 ± 2.1	4.6 ± 2.2
ДК + 10 г/л лизина	<i>ldcC+cadA+</i>	39.7 ± 3.7***	2.1 ± 0.2***	7.3 ± 3.9
	<i>ldcC-cadA-</i>	1.8 ± 0.1**	7.9 ± 4.2	5.2 ± 1.4
ДК + 10 мМ кадаверина	<i>ldcC+cadA+</i>	9.3 ± 1.3***	6.7 ± 1.1	4.5 ± 0.1
	<i>ldcC-cadA-</i>	8.3 ± 1.3***	5.6 ± 2.2	3.6 ± 1.6

* Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; ** статистически значимые отличия от кадаверин-профицитного штамма; *** статистически значимые отличия от культуры, выращенной на ДК-бульоне без добавок.

Накопление кадаверина в клетках кадаверин-дефицитного штамма за счет экспорта из среды способствовало снижению чувствительности к пероксиду водорода (табл. 2, рис. 2г). В тоже время, более высокий уровень кадаверина в клетках штамма дикого типа, выращенных на среде с добавкой экзогенного кадаверина, обуславливал повышение их чувствительности к H_2O_2 в сравнении с клетками, выращенными на среде, не содержащей кадаверин (табл. 2, рис. 2в). С чем связано повышение скорости отмирания клеток, выращенных в присутствии экзогенного кадаверина, на первых этапах воздействия H_2O_2 не ясно. Поскольку сравниваемые штаммы, в целом, изогенны и отличались лишь наличием генов *ldcC* и *cadA*, возможно, что эффект экзогенного кадаверина обусловлен его влиянием на активность системы биосинтеза кадаверина.

Вклад биосинтеза кадаверина в адаптацию бактериальных клеток к пероксидному окислительному стрессу. Для оценки вклада биосинтеза кадаверина в адаптацию бактерий к H_2O_2 проведено сравнение выживаемости штамма дикого типа и штаммов с делецией генов *ldcC* и *cadA*. Разница в чувствительности к H_2O_2 не была обнаружена при культивировании на полноценной среде в условиях микроаэрации (без перемешивания), тогда как в аэробных условиях скорость отмирания клеток способных к синтезу кадаверина была ниже по сравнению с бактериями, не способными синтезировать данный полиамин (рис. 3). Обе лизиндекарбоксилазы принимали участие в ответе на H_2O_2 , но больший вклад в выживаемость бактерий в данных условиях вносила лизиндекарбоксилаза *LdcC* (рис. 3в).

На бульоне ДК, не содержащем лизин, орнитин, аргинин и глутамат, скорость отмирания культуры микроорганизмов, неспособных синтезировать кадаверин была выше по сравнению со штаммом дикого типа в условиях микроаэрации (рис. 2). Поскольку известно, что аминокислоты

способны оказывать антиоксидантное действие [14, 19], отсутствие некоторых из них в составе среды позволило более ярко продемонстрировать эффект кадаверина, накопление которого в клетке наблюдалось и при культивировании в отсутствие экзогенного лизина (табл. 2).

Следует отметить, что клетки, выращенные в условиях низкой аэрации (без перемешивания) были более чувствительны к экзогенному H_2O_2 по сравнению с клетками, культивируемыми в условиях более высокой аэрации (перемешивание со скоростью вращения 100 об./мин) (рис. 3а, 3б).

Выживаемость бактерий также зависела от количества кадаверина в клетках в момент добавки H_2O_2 . Для получения бактерий с разным уровнем внутриклеточного кадаверина их выращивали на среде ДК с добавкой и без добавки лизина. Внутриклеточная концентрация кадаверина уменьшалась в ряду – *ldcC + cadA* (ДК + Лиз) > *ldcC + cadA* + (ДК) > *ldcC-cadA*-(ДК) и была обратно пропорциональна скорости отмирания культуры (табл. 2, рис. 2в, 2г).

Лизин сам по себе оказывал защитное действие в условиях пероксидного окислительного стресса, поскольку его наличие в среде увеличивало выживаемость бактериальных клеток, лишенных генов синтеза кадаверина (рис. 3г). Аналогичный эффект лизина был обнаружен на эукариотных микроорганизмах *Saccharomyces cerevisiae* [20]. Клетки дрожжей, выращенные на среде с добавкой лизина и характеризующиеся повышенным внутриклеточным содержанием данной аминокислоты, были менее чувствительны к H_2O_2 по сравнению с клетками, выращенными на среде без добавки лизина. Авторы статьи [20] исключили прямое антиоксидантное действие лизина (способность нейтрализовать H_2O_2) и предположили, что основной механизм защитного действия экзогенного лизина связан с экономией восстановленного НАДФН, вследствие снижения его расхода на био-

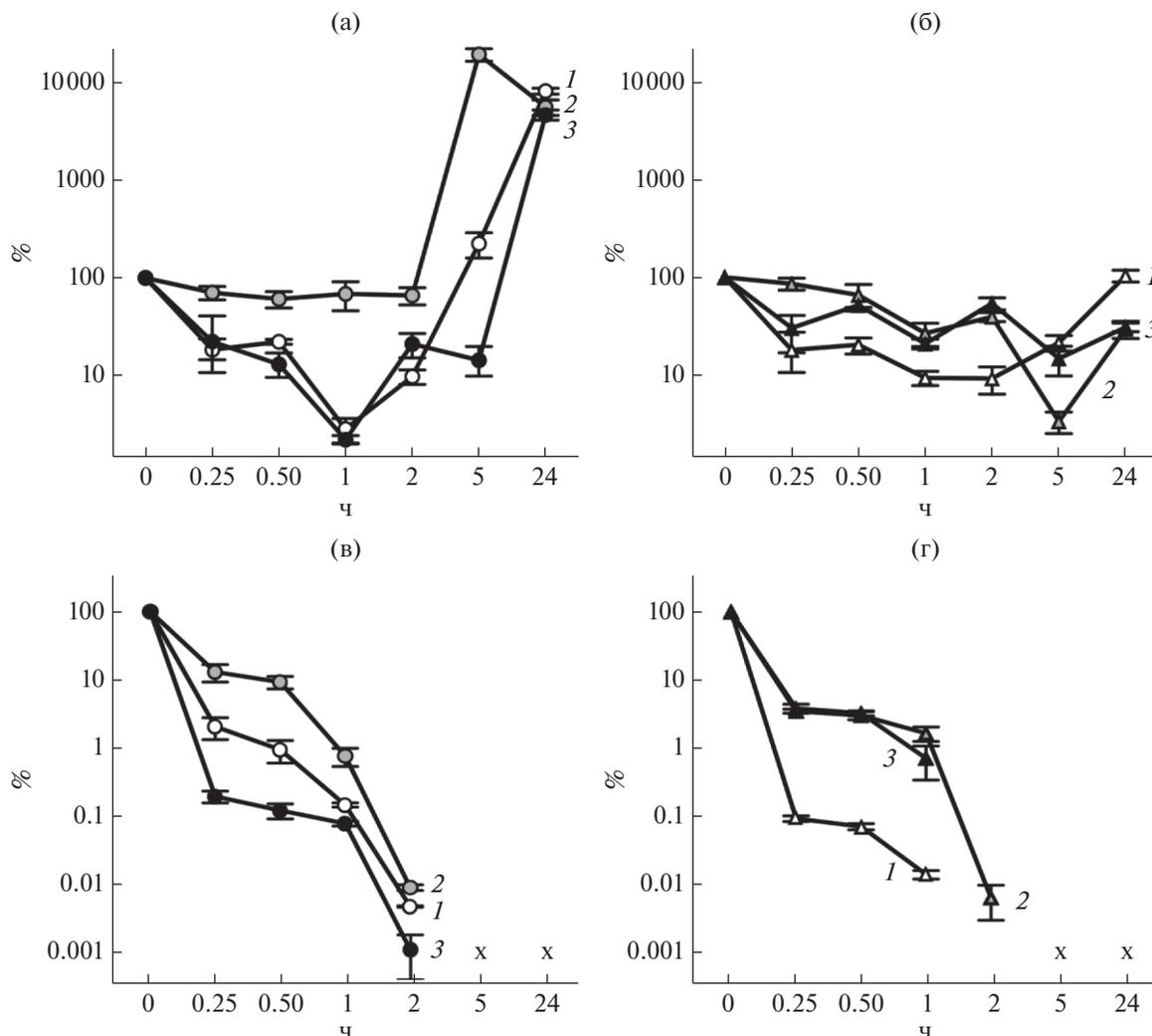


Рис. 2. Выживаемость (%) клеток *E. coli* штамма дикого типа BW25141 (а, в) и штамма BW25141 Δ *ldcC* Δ *cadA* (б, г) при воздействии 3 (а, б) и 6 мМ (в, г) H_2O_2 при культивировании в ДК-бульоне без добавок (1), с добавкой 10 г/л лизина (2) или 10 мМ кадаверина (3). Данные о внутриклеточной концентрации кадаверина в момент добавки H_2O_2 представлены в табл. 2.

синтез лизина и перенаправления на другие нужды, в том числе для восстановления глутатиона и усиления антиоксидантной защиты. Возможно, наблюдаемое снижение чувствительности к пероксиду водорода клеток, выращиваемых в условиях интенсивной аэрации, по сравнению с клетками, выращиваемыми в условиях микроаэрации, обусловлено более высоким соотношением НАДФН/НАДФ [21].

Также в работе [20] был сделан вывод, что защитный эффект экзогенного лизина, скорее всего, не связан с накоплением в клетках дрожжей кадаверина, поскольку внесение в среду кадаверина не влияло на уровень чувствительности к пероксиду водорода. Как показали исследования, проведенные в настоящей работе, эффекты экзогенного и эндогенного кадаверина в условиях пе-

роксидного окислительного стресса различны. Влияние уровня эндогенного кадаверина на устойчивость дрожжей к пероксиду водорода подробно не изучено, хотя показано, что клетки, обладающие активностью лизиндекарбоксилазы и практически ее лишенные, не отличались по уровню чувствительности. Такие эксперименты проведены в условиях культивирования в среде, не содержащей лизин. Возможно, при культивировании в среде, содержащей лизин, накапливались бы более значительные количества кадаверина, что позволило бы выявить его роль в адаптации к пероксидному стрессу у эукариотных микроорганизмов.

Роль эндогенного окислительного стресса в активации экспрессии генов *ldcC* и *cadA* в ответ на воздействие антибиотика. Известно, что воздей-

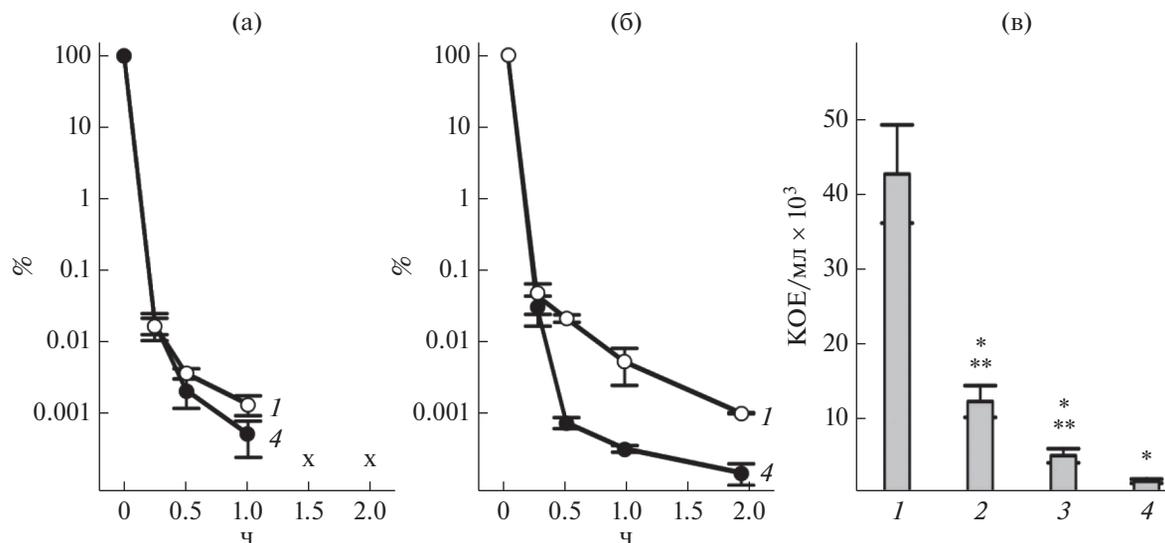


Рис. 3. Выживаемость (%; а, б) и количество КОЕ в культуре *E. coli* (в) штаммов дикого типа BW25141 (1), BW25141 $\Delta cadA$ (2), BW25141 $\Delta ldcC$ (3) и BW25141 $\Delta ldcC \Delta cadA$ (4) при воздействии 6 мМ H_2O_2 . Клетки культивировали в среде LB без перемешивания (а) и с перемешиванием (100 об./мин, б, в). Количество КОЕ (в) измеряли через 30 мин после воздействия H_2O_2 . (*Статистически значимые отличия от штамма дикого типа, **статистически значимые отличия от двойного нокаута, *t*-критерий, $p \leq 0.05$).

ствии антибиотиков сопровождается накоплением в бактериальных клетках АФК и активацией экспрессии генов антиоксидантной защиты, входящих в *oxyR*-регулон [22, 23]. Также показано, что в ответ на воздействие антибиотиков в клетках повышается уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина [15]. Можно предположить, что развитие эндогенного окислительного стресса, может быть сигналом для активации системы биосинтеза кадаверина в ответ на воздействие антибиотиков.

Для оценки вклада эндогенных АФК, в том числе H_2O_2 , в активацию генов *ldcC* и *cadA* был измерен уровень их экспрессии в клетках, подвергнутых действию фторхинолона левофлоксацина, в присутствии и в отсутствие антиоксиданта тиомочевина. Как было показано ранее, воздействие использованной в настоящей работе концентрации левофлоксацина вызывает повышение экспрессии гена *katG* [23]. Основное антиоксидантное действие тиомочевина связывают с нейтрализацией пероксида водорода и, как следствие, ингибированием реакции Фентона [24, 25]. Была подобрана концентрация тиомочевина, которая снижала до базового уровня экспрессию гена *katG*, индуцированную пероксидом водорода в концентрации, вызывавшей активацию генов синтеза кадаверина (рис. 4, рис. 1а, 1б). Добавка тиомочевина снижала как базовый уровень, так и индуцированный воздействием антибиотика уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина (рис. 4). В присутствии антиоксиданта индуцированный уровень экспрессии

гена *ldcC* значительно снижался, а экспрессия гена *cadA* в клетках, подвергнутых воздействию антибиотика, возвращалась к базовому уровню. Следовательно, уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина, частично зависел от интенсивности эндогенного окислительного стресса.

Таким образом, экзогенный пероксид водорода вызывал в клетках *E. coli* активацию генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина. Повышение внутриклеточного содержания АФК, в том числе пероксида водорода, за счет эндогенного образования, в частности, в результате воздействия фторхинолонового антибиотика, также являлось сигналом к повышению экспрессии генов *ldcC* и *cadA*. Накопление кадаверина в клетке являлось защитной реакцией на повышение концентрации H_2O_2 и вносило вклад в адаптацию бактерий к пероксидному окислительному стрессу и, возможно, обуславливало преадаптацию к другим стрессирующим воздействиям. В целом, бактерии, неспособные синтезировать кадаверин в результате декарбоксилирования лизина, были более чувствительны к H_2O_2 по сравнению с кадаверин-профицитными микроорганизмами. Жизнеспособность бактериальных клеток также напрямую зависела от уровня внутриклеточного кадаверина в момент начала воздействия пероксида водорода. Можно предположить, что защитное действие кадаверина может быть связано с прямым антиоксидантным действием, а также со стабилизацией и экранированием структур бактериальных клеток, таких как клеточная стенка и ри-

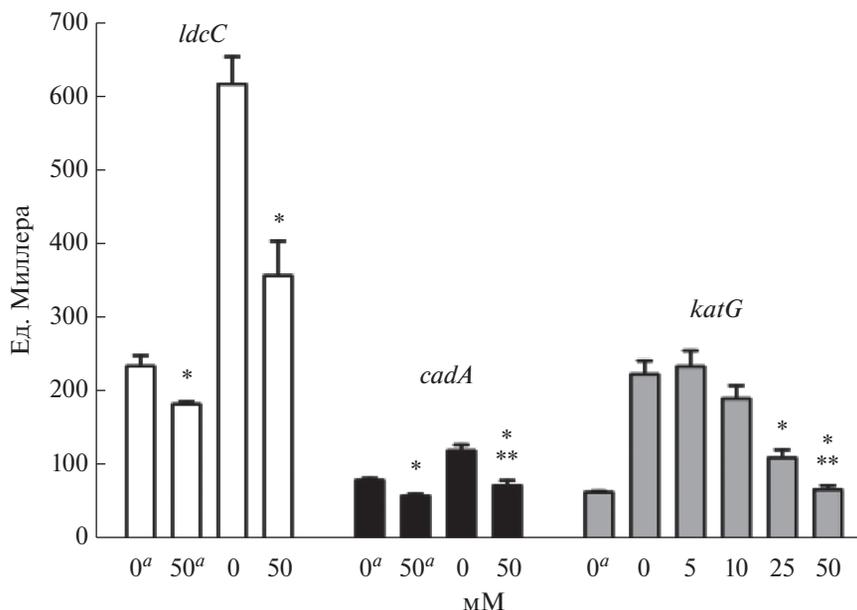


Рис. 4. Влияние тиомочевины на экспрессию генов *ldcC* и *cadA* в клетках *E. coli*, подвергнутых действию 0.1 мкг/мл левофлоксацина, экспрессию гена *katG* в клетках, подвергнутых действию 1 мМ пероксида водорода (*a* – без добавок контроль). Экспрессию измеряли через 3 ч после внесения антибиотика/H₂O₂. (* Статистически значимые отличия от культуры без добавки тиомочевины, ** отсутствие статистически значимых отличий от культуры без добавки тиомочевины и антибиотика/H₂O₂, *t*-критерий, *p* ≤ 0.05).

босомы [26–29]. Механизмы, лежащие в основе защитного действия кадаверина при адаптации к пероксидному окислительному стрессу, требуют дальнейшего изучения.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Брюсу Демплу (Stony Brook University Medical School, Stony Brook, NY) за предоставленные штаммы *E. coli*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (АААА-А19-119112290009-1).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Linley E., Denyer S.P., McDonnell G., Simons C., Moulden J.Y. // J. Antimicrob. Chemother. 2012. V. 67. № 7. P. 1589–1596.
2. McEvoy B., Rowan N.J. // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 127. № 5. P. 1403–1420.
3. McDonnell G., Russell A.D. // Clin. Microbiol. Rev. 1999. V. 12. № 1. P. 147–179.
4. Fichet G., Antloga K., Comoy E., Deslys J.P., McDonnell G. // J. Hosp. Infect. 2007. V. 67. № 3. P. 278–286.
5. Kislenco V.N., Berlin A.A. // Russ. Chem. Rev. 1991. V. 60. № 5. P. 470–488.
6. González-Flecha B., Demple B. // J. Biol. Chem. 1995. V. 70. № 23. P. 13681–13687.
7. Mols M., Abee T. // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. № 6. P. 1387–1394.
8. Akhova A.V., Sekatskaya P.A., Tkachenko, A.G. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. P. 582–587.
9. Gu M., Imlay J.A. // Mol. Microbiol. 2011. V. 79. № 5. P. 1136–1150.
10. Imlay J.A. // Environ. Microbiol. 2019. V. 21. № 2. P. 521–530.
11. Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Ажогина Т.Н., Сазыкина М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 327–335.
12. Sen A., Imlay J.A. // Front. Immunol. 2021. V. 12. 667343.
13. Tkachenko A.G., Nesterova L.Y. // Biochemistry (Mosc). 2003. V. 68. № 8. P. 850–856.
14. Chattopadhyay M.K., Tabor C.W., Tabor H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 5. P. 2261–2265.
15. Akhova A., Nesterova L., Shumkov M., Tkachenko A. // Res. Microbiol. 2021. V. 172. № 7–8. 103881.
16. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. 466 p.
17. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI Document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Ed. 30. 2014. V. 40. № 1. 226 p.
18. Kikuchi Y., Kurahashi O., Nagano T., Kamio Y. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998. V. 62. № 6. P. 1267–1270.
19. Wascher T.C., Posch K., Wallner S., Hermetter A., Kostner G.M., Graier W.F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 234. № 1. P. 35–38.

20. Olin-Sandoval V., Yu J.S.L., Miller-Fleming L., Alam M.T., Kamrad S., Correia-Melo C. et al. // Nature. 2019. V. 572. P. 249–253.
21. Godoy M.S., Nickel P.I., Cabrera Gomez J.G., Pettinari M.J. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 82. № 1. P. 244–254.
22. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. // Cell. 2007. V. 130. № 5. P. 797–810.
23. Akhova A.V., Tkachenko A.G. // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 353. № 1. P. 69–76.
24. Randall L.O. // J. Biol. Chem. 1946. V. 164. P. 521–527.
25. Anbar M., Neta P. // Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1967. V. 18. P. 493–523.
26. Gaboriau F., Vaultier M., Moulinoux J., Delcros J. // Redox Rep. 2005. V. 10. P. 9–18.
27. Spirin A., Gavrilova L. The ribosome. N.Y.: Springer-Verlag, 1969. 164 p.
28. Kojima S., Kaneko J., Abe N., Takatsuka Y., Kamio Y. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 2347–2350.
29. Akhova A.V., Tkachenko A.G. // Korean. J. Microbiol. 2020. V. 56. P. 103–110.

Cadaverine Biosynthesis in *Escherichia coli* Adaptation to Hydrogen Peroxide

A. V. Akhova^{a, *} and A. G. Tkachenko^a

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, 614081 Russia

*e-mail: akhovan@mail.ru

This study demonstrates the role of cadaverine in *Escherichia coli* adaptation to hydrogen peroxide. A dose-dependent increase in the expression of the *ldcC* and *cadA* genes encoding the cadaverine-synthesizing enzymes was shown in cells exposed to exogenous hydrogen peroxide. An inverse relation between the bacterial sensitivity and the level of intracellular cadaverine at the time of hydrogen peroxide addition was found. Sensitivity to hydrogen peroxide also depended on the ability to synthesize cadaverine (presence of the *ldcC* and *cadA* genes). In particular, the death rate of cells incapable of synthesizing cadaverine was higher compared to cadaverine-producing cells. Sensitivity to hydrogen peroxide increased in a series of isogenic strains with the genotype: wild type < $\Delta cadA$ < $\Delta ldcC$ < $\Delta ldcC \Delta cadA$. The role of the accumulation of reactive oxygen species, including hydrogen peroxide, in the activation of the *ldcC* and *cadA* genes in cells exposed to the antibiotic levofloxacin was also shown.

Keywords: oxidative stress, cadaverine, polyamines, lysine decarboxylase, hydrogen peroxide, reactive oxygen species