

ВЫРАЩИВАНИЕ *Caenorhabditis elegans* НА ГАЗОНЕ БАКТЕРИЙ *Escherichia coli*, ДЕФЕКТНЫХ ПО СИНТЕЗУ ТЕРМИНАЛЬНЫХ ОКСИДАЗ bo' и bd-I, УВЕЛИЧИВАЕТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ НЕМАТОД

© 2019 г. О. А. Каткова-Жукоцкая¹, С. Ю. Еремина¹, Р. С. Шакулов², А. С. Миронов¹ *

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

*e-mail: alexmir_98@yahoo.com

Поступила в редакцию 04.03.2019 г.

После доработки 12.04.2019 г.

Принята к публикации 14.04.2019 г.

Исследован эффект мутаций *суoA* и *суdA* *E. coli*, нарушающих активность терминальных оксидаз bo' и bd-I соответственно, на продолжительность жизни нематод *C. elegans*. Показано, что средняя продолжительность жизни нематод при выращивании на мутантах *суoA* увеличивалась на 15.5%, а на мутантах *суdA* – на 12.8%. Известно, что мутанты *суoA* и *суdA* характеризуются повышенным уровнем генерации активных форм кислорода. Мы предполагаем, что увеличение продолжительности жизни *C. elegans* обусловлено умеренным окислительным стрессом, который возникает в организме нематод при культивировании на этих мутантных бактериях.

Ключевые слова: продолжительность жизни, терминальные оксидазы, окислительный стресс, *E. coli*, *Caenorhabditis elegans*.

DOI: 10.1134/S0016675819120063

Нематоды *Caenorhabditis elegans* являются одним из главных модельных организмов для изучения механизмов старения. Кишечный тракт нематод содержит микробиоту, состав которой зависит от видов бактерий, служащих источником их питания. С точки зрения исследования взаимодействия между организмом-хозяином и микробиотой, кишечный тракт нематод принципиально не отличается от человеческого и представляет собой первый эшелон защиты от неблагоприятных условий среды, а также играет важную роль в поддержании здоровья и продолжительности жизни [1]. Кроме того кишечный тракт нематод выполняет для других тканей функцию сигнального центра, реагирующего на продукты бактериального метаболизма. Имеющиеся данные позволяют заключить, что эволюция нематод, протекающая в постоянном симбиотическом контакте с бактериями, принципиально сходна с таковой у других эукариот, содержащих микробные сообщества в кишечном тракте [2].

В последнее время появились сообщения о том, что метаболические процессы, протекающие в бактериях, оказывают прямое влияние на продолжительность жизни нематод [3–8]. На протяжении многих лет считалось общепризнанным, что энергетический метаболизм, сопровождаю-

щийся формированием активных форм кислорода (АФК), играет ключевую роль в регуляции процесса старения [9]. Однако в последнее время традиционный взгляд на АФК как агентов, ответственных за процесс старения, подвергся ревизии [10, 11], и получены доказательства, что некоторый уровень АФК необходим для нормальной жизнедеятельности, а также увеличивает продолжительность жизни [12–18]. Таким образом, взаимосвязь между продолжительностью жизни и окислительным стрессом противоречива и требует дальнейших исследований.

Целью настоящей работы является изучение влияния мутаций в генах *суoA* и *суdA*, кодирующих цитохромоксидазы bo' и bd-I [19–21] соответственно, на продолжительность жизни нематод *C. elegans*. Известно, что из-за нарушения процесса аэробного дыхания у этих мутантов наблюдается повышенный уровень генерации АФК [22].

В качестве газона для выращивания нематод использовали бактерии *E. coli* – производных штамма MG1655 дикого типа. В геном этого штамма с помощью трансдукции фагом P1 переносили инсерции *суoA::kan* и *суdA::kan* из штаммов коллекции Keio [23]. Трансдукцию проводили по стандартной методике [24].

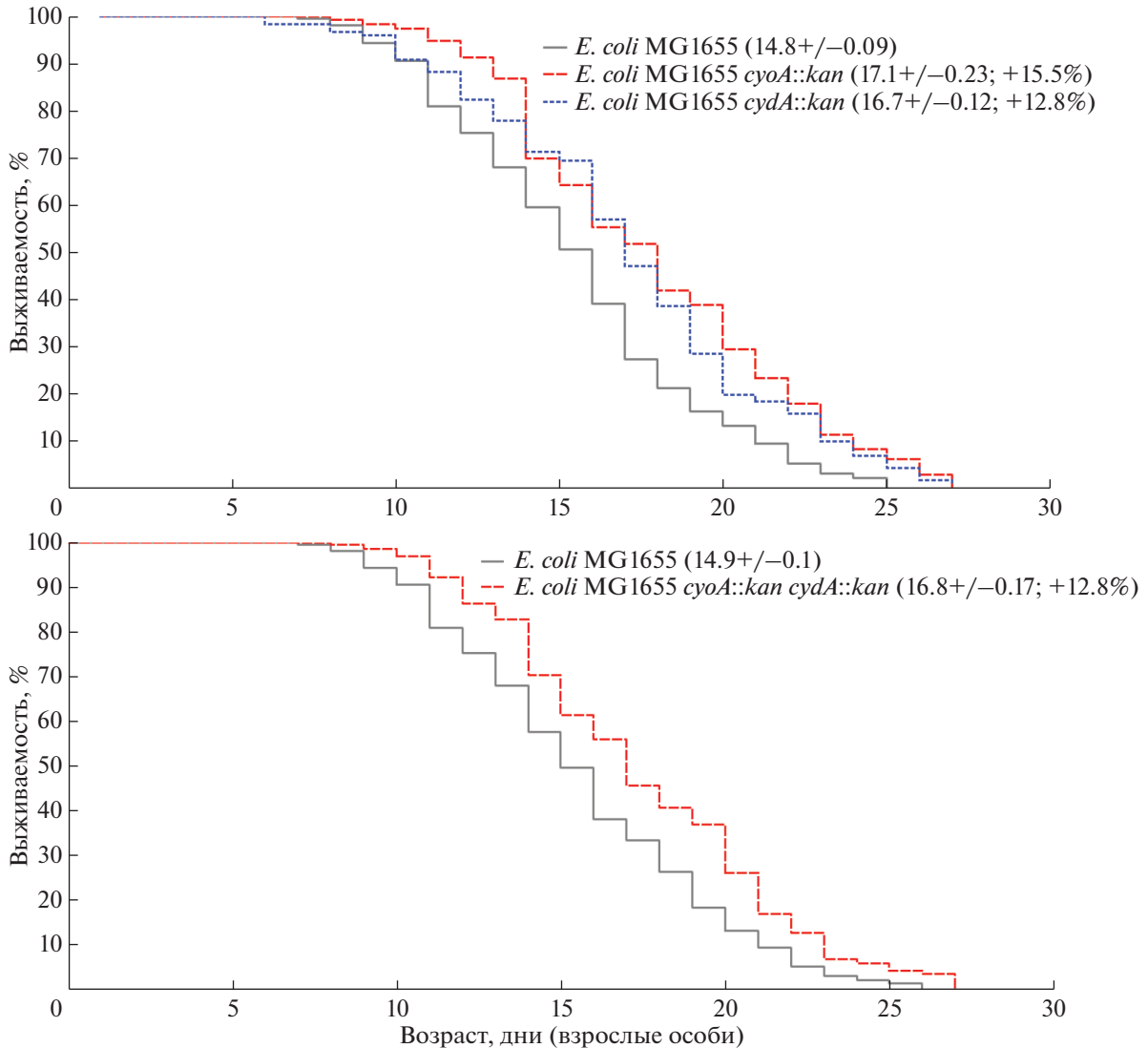


Рис. 1. Графики выживаемости *Caenorhabditis elegans* N2 при выращивании на газоне штаммов *E. coli* MG1655 дикого типа и мутантов *cyoA::kan* и *cydA::kan* (верхний график) и *cyoA::kan cydA::kan* (нижний график). В скобках указаны значения СПЖ. Приведенные на рисунке цифровые значения в процентах отражают увеличение средней продолжительности жизни нематод на мутантных бактериях относительно нематод, выращенных на штамме MG1655 дикого типа. Графики выживаемости построены с использованием программы SciDAVis 0.2.1.

Культивирование бактериальных штаммов осуществляли на полноценной среде LB (pH 7.0) [24], либо на твердых средах такого же состава с добавлением 2%-ного бакто-агара (фирма “Difco”). Для обеспечения селективного роста клеток использовали канамицин – 40 мкг/мл.

Для экспериментов с нематодами микроорганизмы выращивали в жидкой среде LB с необходимыми добавками при температуре 37°C на качалке $n = 220$ об/мин в течение 16 ч. Далее засеивали по 20 мкл (MG1655) и 40 мкл (мутанты *cyoA::kan* и *cydA::kan*) ночной культуры чашки со стандартной нематодной средой (NGM) и выращивали в термостате при температуре 37°C в течение

16 ч. Перед посадкой нематод чашки с питательной подложкой охлаждали до 20°C.

В работе использовались *Caenorhabditis elegans* N2 Bristol (дикий тип). Культивирование нематод проводили при температуре 20°C. Для экспериментов животных выращивали из отмытых от посторонней микрофлоры яиц на среде NGM с необходимым бактериальным газоном в течение 2-х генераций [25]. Для установления возрастной синхронизации взрослых особей отсаживали на чашки Петри с NGM-средой и соответствующим бактериальным газоном для откладывания яиц. После 3–4 ч инкубации при температуре 20°C взрослых нематод убирали и выращивали личинки из яиц до возраста L4. Затем вручную переса-

живали на чашки Петри с NGM-средой и бактериальным газоном. Численность нематод контролировали ежедневно. Количество нематод в опыте было не менее 100 особей на точку. Пересадку нематод осуществляли через день на аналогичные среды в течение всего эксперимента. Животные считались мертвыми, когда они прекращали глоточную перекачку и не реагировали на дотрагивание платиновой проволочкой. За начальную точку $t = 0$ принимали возраст нематод L4. Продолжительность жизни нематод оценивалась путем определения временного интервала, который соответствует выживаемости 50% популяции (СПЖ – средняя продолжительность жизни). Все эксперименты повторяли три раза. Построение графиков и их обработка методом сигмоидальной аппроксимации экспериментальных данных проводились с использованием программы SciDAVis 0.2.1.

Результаты экспериментов по выращиванию *C. elegans* на газоне исследуемых штаммов показали, что несмотря на задержку в развитии нематод до стадии L4, СПЖ взрослых червей на мутанте *суоA::kan* увеличивалась на 15.5% по сравнению с таковой на контрольном штамме MG1655 дикого типа (рис. 1, верхний график). Культивирование нематод на газоне мутанта *суоA::kan* также приводило к положительному эффекту на выживаемость червей: по сравнению с контрольным штаммом СПЖ возрастала на 12.8% (рис. 1, верхний график). Комбинация мутаций *суоA::kan* и *судаA::kan* в одном геноме не приводила к дальнейшему повышению СПЖ нематод (рис. 1, нижний график). Отсутствие кумулятивного эффекта мутаций *суоA::kan* и *судаA::kan* на СПЖ нематод, возможно, связано с существенным замедлением роста таких бактерий и, вследствие этого, снижением их способности служить эффективным источником питания для нематод. Мы предполагаем, что увеличение продолжительности жизни нематод, наблюдаемое при их культивировании на газоне бактерий, дефектных по терминальным оксидазам, обусловлено повышенным уровнем генерации АФК в клетках этих мутантов.

Полученные результаты подтверждают данные работы [26], демонстрирующей существенную задержку развития личинок нематод, а также активацию генов нематод, вовлеченных в митохондриальную защиту от окислительного стресса при их культивировании на мутантах *суо E. coli*. Однако эффект мутации *суо* на продолжительность жизни *C. elegans* в цитируемой работе не изучался. Таким образом, выявленный нами позитивный эффект культивирования нематод на мутантах *E. coli*, дефектных по синтезу терминальных оксидаз *bo'* и *bd-I*, на продолжительность их жизни может быть интерпретирован в рамках концепции “митохондриального гормона”. Согласно этой концепции умеренные дозы

АФК приводят к усилению аэробного дыхания, индукции защитных механизмов организма от окислительного стресса и в конечном счете к увеличению продолжительности жизни [27–29].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 17-74-30030.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clark L.C., Hodgkin J. Commensals in the *C. elegans* model // Cell. Microbiol. 2014. V. 16. P. 27–38. <https://doi.org/10.1111/cmi.12234>
2. Zhang J., Holdorf A.D., Walhout A.J.M. *C. elegans* and its bacterial diet as a model for systems-level understanding of host–microbiota interactions // Cur. Opin. in Biotechn. 2017. V. 46. P. 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.01.008>
3. Saiki R., Lunceford A.L., Bixler T. et al. Altered bacterial metabolism, not coenzyme Q content, is responsible for the lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* fed an *Escherichia coli* diet lacking coenzyme Q // Aging Cell. 2008. V. 7. P. 291–304. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00378.x>
4. Virk B., Correia G., Dixon D.P. et al. Excessive folate synthesis limits lifespan in the *C. elegans E. coli* aging model // BMC Biol. 2012. V. 10:67. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-67>
5. Cabreiro F., Au C., Leung K.-Y. et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism // Cell. 2013. V. 153. P. 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.035>
6. Gusarov I., Gautier L., Smolentseva O. et al. Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans* // Cell. 2013. V. 152. P. 818–830. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.043>
7. Han B., Sivaramakrishnan P., Lin C.J. et al. Microbial genetic composition tunes host longevity // Cell. 2018. V. 173. P. 1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.026>
8. Hoang K.L., Gerardo N.M., Morran L.T. The effects of *Bacillus subtilis* on *Caenorhabditis elegans* fitness after heat stress // Ecol. Evol. 2019. V. 9. P. 3491–3499. <https://doi.org/10.1002/ece3.4983>
9. Artal-Sanz M., Tavernarakis N. Mechanisms of aging and energy metabolism in *Caenorhabditis elegans* // IUBMB Life. 2008. V. 60. P. 315–322. <https://doi.org/10.1002/iub.66>
10. Back P., Braeckman B.P., Matthijssens F. ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling? // Oxid. Med. Cell Longev. 2012. P. 608478. <https://doi.org/10.1155/2012/608478>
11. Scudellari M. The science myths that will not die // Nature. 2015. V. 528. P. 322–325. <https://doi.org/10.1038/528322a>

12. Shore D.E., Ruvkun G. A cytoprotective perspective on longevity regulation // Trends Cell Biol. 2013. V. 23. P. 409–420.
https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.04.007
13. Ristow M., Zarse K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: the concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis) // Exp. Gerontol. 2010. V. 45. P. 410–418.
https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.014
14. Lee S.J., Hwang A.B., Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity // Curr. Biol. 2010. V. 20. P. 2131–2136.
https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.057
15. Schmeisser S., Schmeisser K., Weimer S. et al. Mitochondrial hormesis links low-dose arsenite exposure to lifespan extension // Aging Cell. 2013. V. 12. P. 508–517.
https://doi.org/10.1111/acel.12076
16. Van Raamsdonk J.M., Hekimi S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan // PNAS USA. 2012. V. 109. P. 5785–5790.
https://doi.org/10.1073/pnas.1116158109
17. Yang W., Hekimi S. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans* // PLoS Biol. 2010. V. 8. P. e1000556.
https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000556
18. Bjelakovic G., Nikolova D., Gludet L.L. et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis // JAMA. 2007. V. 297. P. 842–857.
https://doi.org/10.1001/jama.297.8.842
19. García-Horsman J.A., Barquera B., Rumbley J. et al. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 5587–5600.
https://doi.org/10.1128/jb.176.18.5587-5600.1994
20. Cotter P.A., Chepuri V., Gennis R.B., Gunsalus R.P. Cytochrome *(cyoABCDE)* and *(cydAB)* oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 6333–6338.
https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6333-6338.1990
21. Lindqvist A., Membrillo-Hernandez J., Poole R.K., Cook G.M. Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress // Antonievan Leeuwenhoek 2000. V. 78. P. 23–31.
https://doi.org/10.1023/A:1002779201379
22. Brynildsen M.P., Winkler J.A., Spina C.S. et al. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. P. 160–165.
https://doi.org/10.1038/nbt.2458
23. Baba T., Ara T., Hasegawa M. et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection // Mol. Syst. Biol. 2006. V. 2. P. 2006–2008.
https://doi.org/10.1038/msb4100050
24. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1972. 311 p.
25. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* // Worm Book: The Online Review of *C. elegans* Biology, 2006. February 11.
https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1
26. Govindan J.A., Jayamani E., Zhang X. et al. Dialogue between *E. coli* free radical pathways and the mitochondria of *C. elegans* // PNAS USA. 2015. V. 112. P. 12456–12461.
https://doi.org/10.1073/pnas.1517448112
27. Tapia P.C. Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: “Mitohormesis” for health and vitality // Med. Hypotheses. 2006. V. 66. P. 832–843.
https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.09.009
28. Schulz T.J., Zarse K., Voigt A. et al. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress // Cell Metab. 2007. V. 6. P. 280–293.
https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.011
29. Ristow M., Schmeisser K. Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased level of reactive gene species (ROS) // Dose-Response. 2014. V. 12. P. 288–341.
https://doi.org/10.2203/dose-response.13-035.Ristow

***Caenorhabditis elegans* Cultured on *Escherichia coli* Strains Lacking bo' and bd-I Terminal Oxidases Exhibit Extended Lifespan**

O. A. Katkova-Zhukotskaya^a, S. Yu. Eremina^a, R. S. Shakulov^b, and A. S. Mironov^{a,*}

^aEngelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bState Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

*e-mail: alexmir_98@yahoo.com

The effect of *E. coli cyoA* and *cydA* mutations with abolished bo' and bd-I terminal oxidase activity on *C. elegans* lifespan was investigated. We have shown that the mean lifespan of worms feeding on *cyoA* and *cydA* mutants was increased by 15.5% and 12.8%, correspondingly. It is known that *cyoA* and *cydA* mutants are characterized by increased level of reactive oxygen species generation. We suggest that extended lifespan of *C. elegans* observed during feeding worms on these mutants caused by moderate oxidative stress.

Keywords: lifespan, terminal oxidases, oxidative stress, *E. coli*, *Caenorhabditis elegans*.