

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ

УДК 579.842.11:579.22

### ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ СИСТЕМ *Escherichia coli* ПРИ ФОСФАТНОМ ГОЛОДАНИИ

© 2023 г. Г. В. Смирнова<sup>а</sup>, А. В. Тюленев<sup>а</sup>, Н. Г. Музыка<sup>а</sup>,  
Л. В. Сутормина<sup>а</sup>, О. Н. Октябрьский<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов, “Пермский федеральный исследовательский центр”  
Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614081 Россия

\*e-mail: oktyabr@iegm.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 02.06.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

Изучены изменения активности антиоксидантных систем у бактерий *Escherichia coli* при фосфатном голодании. Показано, что голодание сопровождалось снижением интенсивности дыхания, увеличением скорости продукции супероксида и падением уровня АТФ. Одновременно наблюдалось снижение  $H_2O_2$  в среде и значительное увеличение экспрессии генов *katG* и *katE*, кодирующих соответственно каталазы НРІ и НРІІ. В то же время не отмечено падения мембранного потенциала, что может свидетельствовать о сохранении нормальной активности мембран в голодающих клетках. Впервые показано, что переход *E. coli* к голоданию по фосфату сопровождается значительными изменениями статуса глутатиона. Наиболее важные из них связаны со снижением уровня восстановленного глутатиона (GSH) в среде и с одновременным увеличением его содержания в цитоплазме, а также сдвигом соотношения восстановленный/окисленный глутатион в цитоплазме ( $GSH_{in}/GSSG_{in}$ ) в сторону редуктивных значений, а в культуральной среде ( $GSH_{out}/GSSG_{out}$ ) – в сторону окислительных значений. Среди используемых в работе мутантов выделялся двойной мутант *gor trxB*, дефицитный по синтезу глутатионредуктазы и тиоредоксинредуктазы. По сравнению с родительским штаммом этот мутант показывал многократно более высокую экспрессию *katG::lacZ*, наибольший уровень окисленного внутри- и внеклеточного глутатиона и соответственно самое низкое соотношение GSH/GSSG в обоих компартментах. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что при фосфатном голодании взаимодействие редокс-системы глутатиона и регулонов, контролирующей защиту от активных форм кислорода (АФК), создает условия, позволяющие поддерживать концентрацию последних ниже токсического уровня. В результате голодающие по фосфату клетки *E. coli* могут длительное время сохранять высокую жизнеспособность, позволяющую им быстро возобновлять рост после добавления фосфата.

**Ключевые слова:** антиоксидантная система, *Escherichia coli*, фосфатное голодание

**DOI:** 10.31857/S0026898423060198, **EDN:** QKQOQF

В естественной среде обитания бактерии сталкиваются с различными стрессами, в том числе вызванными истощением основных субстратов. Большинство стрессов сопровождается торможением роста, поэтому клетки располагают универсальными механизмами для борьбы с негативными последствиями резкого замедления обменных процессов. Эти последствия могут включать увеличение продукции активных форм кислорода (АФК), таких как анион супероксида ( $O_2^-$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксильный радикал

( $HO^*$ ), которые могут повредить ДНК, белки и клеточные мембраны. Во избежание повреждающего действия возможного окислительного стресса, клетки стремятся поддерживать АФК на безопасном уровне. Бактерии обладают набором ферментов, нейтрализующих АФК и восстанавливающих поврежденные макромолекулы, а также сенсоров и сигнальных путей, воспринимающих изменения редокс-состояния и активирующих механизмы его гомеостаза [1].

*Escherichia coli* содержит три супероксиддисмутазы (SOD): цитоплазматические MnSOD (*sodA*) и Fe-SOD (*sodB*) и периплазматическую Cu-Zn-SOD (*sodC*). К основным ферментам, удаляющим  $H_2O_2$  *in vivo*, относятся алкилгидропероксидредуктаза *Ahp* (*ahpCF*) и каталазы НРІ (*katG*) и НРІІ

Сокращения. АФК – активные формы кислорода; GSH (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) – восстановленная форма глутатиона; GSSG – окисленная форма глутатиона; in/out – в цитоплазме/в культуральной среде; SOD (superoxide dismutase) – супероксиддисмутаза.

(*katE*), экспрессия генов которых находится под контролем транскрипционных регуляторов OxyR и RpoS [2].

Кроме того, в поддержании внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза участвуют низкомолекулярные тиолы. Цитозоль *E. coli* содержит две основные редокс-системы на основе тиолов, функции которых значительно перекрываются: систему глутатион-глутаредоксины и тиоредоксиновую систему [3, 4]. Глутатион представляет собой главный тиоловый окислительно-восстановительный буфер. В цитоплазме глутатион находится преимущественно в восстановленном состоянии и его внутриклеточная концентрация составляет приблизительно 5 мМ. Окисленный глутатион (GSSG) восстанавливается глутатионредуктазой (GOR), которая кодируется геном *gor* и входит в состав регулона OxyR [3]. При экспоненциальном росте в аэробных условиях глутатион может накапливаться в среде на микромолярном уровне и подвергаться непрерывной трансмембранной циркуляции [5].

Тиоредоксиновая система *E. coli* состоит из двух тиоредоксинов (Trx1 и Trx2), кодируемых генами *trxA* и *trxC*, и тиоредоксинредуктазы (TrxR), кодируемой геном *trxB* [3, 4, 6]. *E. coli* содержит также три глутаредоксина (Grx1, Grx2 и Grx3), кодируемых генами *grxA*, *grxB* и *grxC* соответственно, и два глутаредоксиноподобных белка Grx4 (*grxD*) и NrdH (*nrdH*). Окисленные глутаредоксины, за исключением Grx4 и NrdH, неферментативно восстанавливаются глутатионом [4, 6].

Одна из стрессовых ситуаций, которая потенциально может сопровождаться нарушением редокс-гомеостаза и продукцией АФК, — голодание по фосфату (P<sub>i</sub>). Фосфат необходим клеткам всех живых организмов для структурных и энергетических целей. В естественных условиях содержание фосфата может изменяться в значительном диапазоне — вплоть до его полного отсутствия. Когда фосфат отсутствует в среде, *E. coli* активирует адаптивный ответ, который включает синтез нескольких десятков белков, часть из которых входит в регулон Pho, представляющий глобальную регуляторную сеть, взаимодействующую с биосинтезом полифосфатов, RpoS и ppGpp [7, 8]. Протеомный анализ показал, что общий ответ *E. coli* на голодание по фосфату может включать до 400 генов, составляющих почти 10% генома этой бактерии [9].

Ранее были представлены доказательства того, что клетки *E. coli*, растущие на среде MOPS с глюкозой и шестью аминокислотами, поддерживают активный метаболизм в течение примерно 3 суток голодания по фосфату. Отмечено, что голодающие по фосфату клетки утилизируют не только глюкозу, но и присутствующие в питательной среде аминокислоты, продуцируя такие метабо-

литы, как путресцин и спермидин, которые принимают участие в защите нуклеиновых кислот от окислительного повреждения [10–12]. На основании экспериментов с мутантами было предположено, что регулоны RpoS и LexA, а также белок H-NS важны для сохранения жизнеспособности бактерий [10]. Известно, что экспрессия *katG* и *katE* возрастает при вступлении *E. coli* в стационарную фазу [2]. Учитывая, что фосфатное голодание вызывает остановку роста бактерий и переход в стационарную фазу, логично было ожидать индукции KatG и KatE в таких клетках. Однако R. VanBogelen и соавт. [9] не обнаружили индукции этих каталаз в ответ на голодание *E. coli* по фосфату. А Р. Moreau и соавт. [11] обнаружили, что дефицит по синтезу алкилгидропероксидредуктазы (Ahp) и каталазы HPI (KatG) значительно снижал выживаемость голодающих по фосфату клеток, однако инактивация генов *oxyR* и *rpoS* оказывала лишь небольшой эффект на выживаемость. О продукции АФК авторы судили косвенно, измеряя концентрации соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Этот метод часто критикуют за недостаточную специфичность.

В экспериментах с другой бактерией, *Sinorhizobium meliloti*, показано, что фосфатное голодание стимулировало в клетках экспрессию гена H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцибельной каталазы (*katA*). Обнаружено, что для транскрипции гена *katA* был необходим регулятор PhoB, а инициация происходила на промоторе, отличном от OxyR-зависимого — активирующего транскрипцию *katA* в ответ на добавление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [13]. Подобный эффект авторы наблюдали и для голодающих по фосфату клеток *Agrobacterium tumefaciens* и *Pseudomonas aeruginosa*. На основании того, что *phoB*-мутанты были более чувствительны к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, чем мутанты *katA*, Z. Yuan и соавт. [13] предположили, что помимо *katA* при фосфатном голодании индуцируются другие PhoB-регулируемые гены, играющие важную роль в защите клеток от H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

В целом, полученные ранее данные оставляют открытым вопрос о продукции АФК и роли окислительного стресса у бактерий, голодающих по фосфату.

Недавно мы показали, что при аминокислотном голодании клеток *E. coli*, растущих в аэробных условиях, важную роль в ответе на стресс играет глутатион [14]. Бактерии поддерживают низкий уровень внутриклеточного свободного цистеина из-за его высокой восстанавливающей активности по отношению к ионам Fe<sup>3+</sup>, что способствует реакции Фентона [15, 16]. В отличие от цистеина, GSH — слабый восстановитель железа в высшей степени окисления [15], поэтому включение цистеина в глутатион служит эффективным механизмом поддержания гомеостаза цистеина при повышении его внутриклеточной концентрации,

**Таблица 1.** Штаммы *Escherichia coli* и плазмиды, использованные в работе

Название	Генотип	Источник
BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3), \lambda^{-}, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$	CGSC <sup>a</sup>
JW2663	как BW25113, но <i>gshA</i>	CGSC
JW3467	как BW25113, но <i>gor</i>	CGSC
JW5856	как BW25113, но <i>trxA</i>	CGSC
JW0871	как BW25113, но <i>trxB</i>	CGSC
DM4000	<i>hisG4 argE3 thr-1<sup>-</sup> ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 ilv TS rpsL31 sulA::Mud1(bla lac)cam</i>	VMR <sup>b</sup>
NM3655	<i>gshA trxA</i>	ИЭГМ <sup>c</sup>
NM3761	<i>gor trxB</i>	ИЭГМ
pKT1033	<i>katG::lacZ</i>	ТК <sup>d</sup>
pRS katE16	<i>katE::lacZ</i>	LPC <sup>e</sup>
pColV-K30	<i>iucC::lacZ</i>	ИЖА <sup>f</sup>

<sup>a</sup> *E. coli* Genetic Stock Center.

<sup>b</sup> Материал любезно предоставлен проф. Volkert M.R. (University of Massachusetts Medical School, Worcester, США).

<sup>c</sup> Музей лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов (Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь, Россия).

<sup>d</sup> Материал любезно предоставлен проф. Тао К. (Laboratory of Radiation Biology, Kyoto University, Kyoto, Япония).

<sup>e</sup> Материал любезно предоставлен проф. Loewen P.C. (Department of Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Канада).

<sup>f</sup> Материал любезно предоставлен проф. Imlay J.A. (Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana, Illinois, США).

наблюдаемой при остановке синтеза белка [14]. Снижение избытка цистеина в клетках достигается также его экспортом в среду и десульфуризацией с образованием H<sub>2</sub>S [14, 16, 17]. Ранее нами показано, что аминокислотное голодание стимулирует увеличение внутри- и внеклеточного пула глутатиона, а также изменение соотношения восстановленного/окисленного глутатион в цитоплазме (GSH<sub>in</sub>/GSSG<sub>in</sub>) [14]. Известно, что редокс-статус глутатиона и других тиоловых редокс-систем тесно взаимосвязаны как друг с другом, так и с экспрессией ферментов, нейтрализующих АФК [3].

На основании приведенных данных можно заключить, что понимание динамики изменения редокс-статуса глутатиона расширит наши знания по механизмам ответа бактерий на стрессы, индуцируемые голоданием. В этой работе нами изучены изменения активности антиоксидантных систем при фосфатном голодании бактерий *E. coli*. Оценивали такие показатели, как редокс-статус глутатиона, продукция H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и экспрессия антиоксидантных ферментов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы и реагенты.** В работе использовали реагенты фирмы “Sigma Chemical Co.”: 3-[N-морфолин]пропансульфокислота (MOPS), 2-нитрофенил-β-D-галактопиранозид, дезоксихолат, меркаптоэтанол, пероксидаза хрена (Horseradish peroxidase; HRP), Amplex Red, DiBAC<sub>4</sub>(3), феррицитохром с,

супероксиддисмутаза, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота, глутатионредуктаза; а также агар (“Fluka”, США), среда LB (“Amresco”, США), диметилсульфоксид (DMSO) (“Scharlau”, Испания) и этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) (BioFroх, ФРГ); остальные реагенты были квалификации “чда” российских производителей.

**Бактериальные штаммы и условия роста.** Родительский штамм *Escherichia coli* BW25113 (wt) и одиночные мутанты: *gshA*, *gor*, *trxA* и *trxB* — были из коллекции Keio [18] (табл. 1). Двойные мутанты: *gshA trxA* и *gor trxB* — были сконструированы путем трансдукции фагом P1 с использованием соответствующих штаммов Keio. Родительский штамм и перечисленные выше мутанты, несущие транскрипционные генные слияния *katG::lacZ* [19], *katE::lacZ* [20], *sulA(sfiA)::lacZ* [21] и *iucC::lacZ* [22], были созданы методами трансформации и трансдукции.

Клетки выращивали в среде MOPS с добавлением 8.5 мМ глюкозы и 2 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (или 2 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> при использовании среды с низким содержанием К<sup>+</sup>) [23]. Ночные культуры центрифугировали и разводили в 50 мл свежей среды до оптической плотности 0.1 при 600 нм (OD<sub>600</sub>), а затем выращивали до OD<sub>600</sub> 0.6 при 37°C в колбах на 250 мл, встряхивая при 150 об./мин. После центрифугирования клетки разводили до OD<sub>600</sub> 0.25 в 100 мл предварительно нагретой свежей среды с фосфатом (контроль) или без фосфата (P<sub>i</sub>-голодание) и выращивали от 2 до 48 ч, как указано выше.

Удельную скорость роста ( $\mu$ ) рассчитывали по уравнению  $\mu = \Delta \ln OD_{600} / \Delta t$ , где  $t$  – время (ч).

**Измерение кислорода ( $pO_2$ ) и калия ( $K^+$ ).** Мониторинг растворенного кислорода ( $pO_2$ ) выполняли в режиме реального времени непосредственно в колбах с помощью кислородного электрода Кларка InPro 6800 (“Mettler Toledo”, Швейцария). Изменения уровня внеклеточного калия регистрировали с помощью  $K^+$ -селективного электрода ЭЛИС-121К (“ИТ”, Россия) непосредственно в колбах в среде с низкой концентрацией  $K^+$  (0.2 мМ), куда вносили клетки *E. coli*, подготовленные, как указано выше. Синхронную обработку всех первичных данных от сенсоров вели по протоколам RS-232 и Modbus программного комплекса Advantech OPC Server v3.0 (<https://advantech-modbus-opc-server.software.informer.com/3.0/>).

**Определение АТФ и мембранного потенциала.** Концентрацию АТФ измеряли люциферин-люциферазным методом, используя АТФ Determination Kit (“Molecular Probes”, США). Для экстракции АТФ 50 мкл клеточной суспензии смешивали с 450 мкл DMSO. Экстракцию проводили в течение 5 мин и определяли концентрацию АТФ в соответствии с протоколом производителя.

Изменения мембранного потенциала оценивали с использованием  $\Delta\psi$ -чувствительного флуоресцентного красителя DiBAC<sub>4</sub>(3) [24, 25]. Образцы клеток, обработанные протонофором карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразоном (20 мкМ), использовали в качестве положительного контроля. Флуоресцирующие клетки подсчитывали на флуоресцентном микроскопе Leica DM2000 (“Leica”, Германия), как описано ранее [25]. Общее число клеток подсчитывали в проходящем свете. Для каждой пробы подсчитывали около 1000 клеток. Все эксперименты проводили 3–6 раз независимо друг от друга.

**Измерение внеклеточного супероксида и  $H_2O_2$ .** Внеклеточный супероксид определяли, используя его способность восстанавливать цитохром *c* [26]. Для определения  $H_2O_2$  клетки выращивали, как описано выше. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты культуры объемом 2 мл, пропускали через мембранные фильтры и измеряли концентрацию  $H_2O_2$  в фильтрах с помощью системы Amplex Red–Horseradish peroxidase [27] с использованием спектрофлуориметра Shimadzu RF-1501 (“Shimadzu”, Япония) ( $\lambda_{ex}$  563 нм и  $\lambda_{em}$  587 нм). Концентрацию  $H_2O_2$  в пробах рассчитывали по калибровочной кривой.

**Измерение глутатиона и экспрессии генов.** Внеклеточный и внутриклеточный глутатион определяли спектрофотометрически циклическим методом с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) и глутатионредуктазой [28], модифицированным,

как описано ранее [5]. Для определения внеклеточного глутатиона образцы клеточных суспензий пропускали через мембранные фильтры (0.45 мкм). Одну часть фильтрата анализировали на общий глутатион, другую – на содержание GSSG. Для определения внутриклеточного глутатиона 10 мл культуры центрифугировали при 8000 *g* в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 5 мл холодного водного раствора 20 мМ EDTA и разрушали ультразвуком при 0°C. Осаждение белка и определение GSH и GSSG проводили, как описано ранее [5]. Калибровочные кривые строили по известным концентрациям GSH и GSSG, которые обрабатывали как образцы клеточных суспензий. Концентрацию глутатиона выражали как отношение величины, полученной по калибровочным кривым к значению  $OD_{600}$  в момент отбора пробы.

Изменения в экспрессии анализируемых генов оценивали путем определения активности  $\beta$ -галактозидазы [29] штаммов *E. coli*, несущих соответствующие генные слияния.

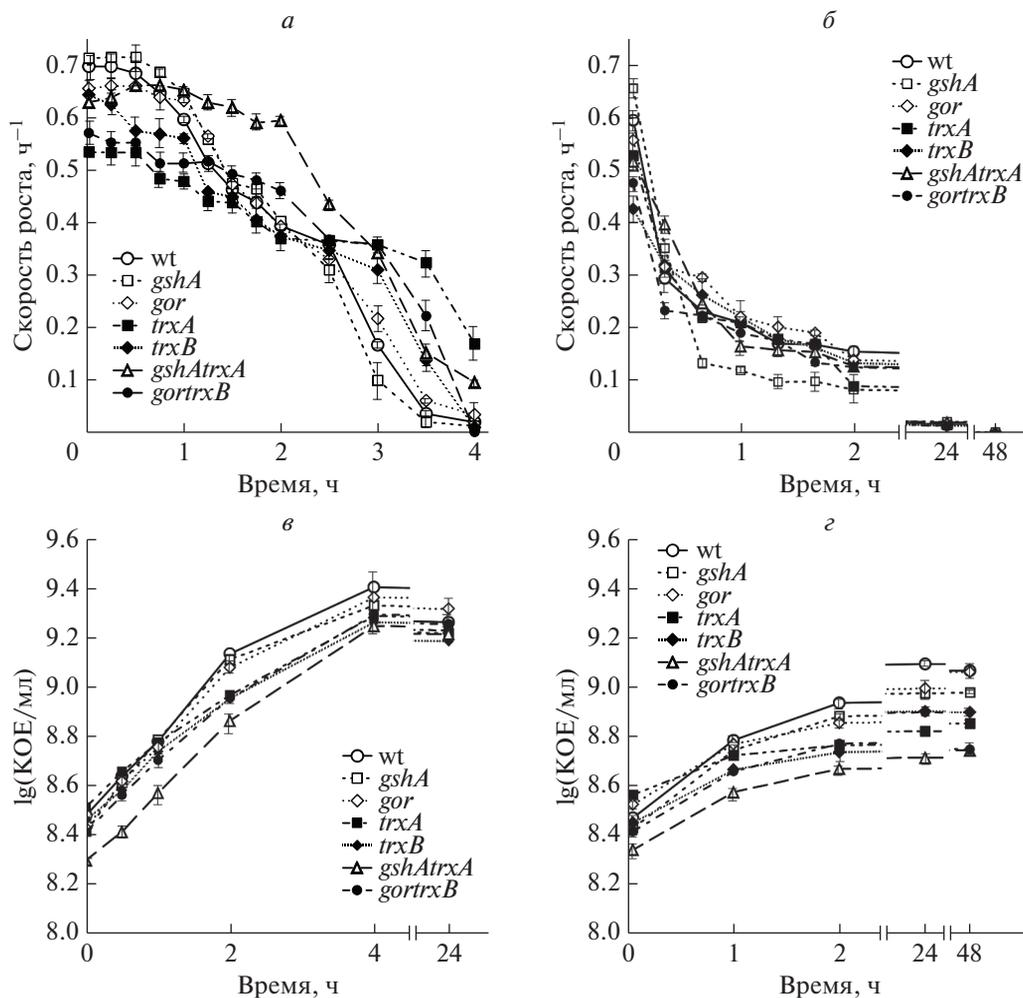
**Определение колониеобразующих единиц (КОЕ).** Для подсчета КОЕ готовили серийные разведения (от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ ) каждой пробы в 0.9%-ном стерильном NaCl. Один миллилитр разведенной культуры (обычно  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$ , чтобы получить отдельные колонии) смешивали с 3 мл расплавленного мягкого LB-агара (0.8%) при 42°C и выливали на чашки Петри с твердым LB-агаром (1.5%). Число колоний на чашках подсчитывали после 24-часовой инкубации при 37°C.

**Статистический анализ.** Каждый результат представлен как среднее значение (не менее 3 независимых экспериментов)  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для анализа использовали *t*-критерий Стьюдента. Значения  $p < 0.05$  рассматривали как статистически значимые. Результаты проанализированы с помощью программы Statistica 8.0.360 (Statsoft Inc. 2007).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Влияние фосфатного голодания на ростовые и энергетические параметры E. coli*

В отсутствие лимитации по фосфату максимальная удельная скорость роста ( $\mu_{max}$ ) экспоненциально растущих культур *E. coli* родительского штамма (wt) и мутантов *gshA*, *gor*, *trxA*, *trxB*, *gshA* *trxA* и *gor* *trxB* составляла  $0.69 \pm 0.02$ ,  $0.71 \pm 0.01$ ,  $0.65 \pm 0.01$ ,  $0.54 \pm 0.01$ ,  $0.63 \pm 0.01$ ,  $0.63 \pm 0.01$  и  $0.57 \pm 0.01$  ч<sup>-1</sup> соответственно (рис. 1а). При достижении плотности  $\sim 1$  о.е. при длине волны 600 нм скорость роста постепенно снижалась у всех штаммов вследствие падения концентрации кислорода и накопления кислых продуктов метаболизма.



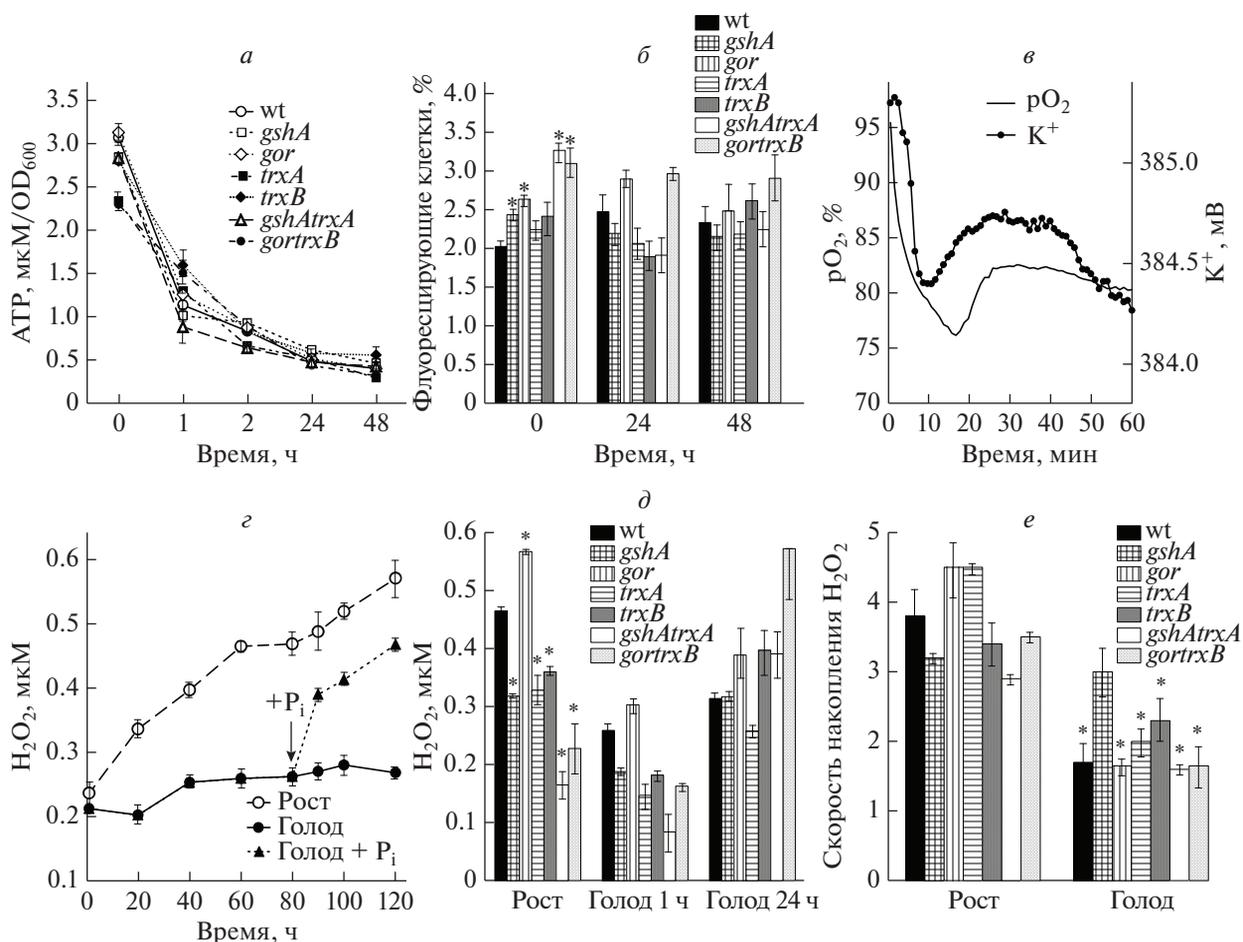
**Рис. 1.** Изменения скорости роста и числа КОЕ в растущих и голодающих по фосфату культурах *E. coli*. Удельная скорость роста в среде с фосфатом (а) и без фосфата (б); КОЕ в среде с фосфатом (в) и без фосфата (г).

После переноса бактерий из растущей культуры на среду без фосфата скорость роста быстро снижалась, достигая через 20–40 мин значения около 0.25 ч<sup>-1</sup>, после чего у всех штаммов (включая родительский) наблюдалась фаза более медленного снижения скорости роста (рис. 1б). Наблюдаемый на первой фазе рост, по-видимому, был связан с потреблением следовых количеств P<sub>i</sub>, поступивших в среду вместе с центрифугируемыми клетками. Через 24 ч рост прекращался у всех штаммов. Добавление фосфата приводило к возобновлению роста со скоростью, наблюдаемой в растущей культуре (данные не приведены). Замедление роста в культурах, растущих в условиях голодания по фосфату, регистрировали также по снижению КОЕ при сравнении с культурой, потребляющей фосфат (рис. 1в, г). За первые 2 ч инкубации в клетках родительского штамма на среде с фосфатом число КОЕ увеличивалось в 4.5 раза, в то время как в голодающей культуре этот показатель возрастал в 2.9, а у мутантов — в

среднем в 2.1 раза. Наименьшее повышение КОЕ (в 1.5 раза) наблюдалось для мутанта *trxA*, дефектного по синтезу тиоредоксина-1.

Родительский штамм и мутанты *gshA*, *gor*, *trxA*, *trxB*, *gshAtrxA* и *gortrxB*, экспоненциально растущие на среде с фосфатом, содержали 3.07 ± 0.08, 2.85 ± 0.06, 3.13 ± 0.1, 2.34 ± 0.11, 2.80 ± 0.1, 2.84 ± 0.06 и 2.3 ± 0.06 мкМ АТФ/OD<sub>600</sub> соответственно (нулевое время на рис. 2а). При истощении фосфата синхронно с падением скорости роста уровень АТФ снижался у всех штаммов в среднем в 2.3 раза через 1 ч и в 5.3 раза через 24 ч (рис. 2а).

Во всех штаммах, включая родительский, при росте в присутствии фосфата доля клеток, окрашенных флуоресцентным красителем DiBAC<sub>4</sub>(3), варьировала от 2.0 до 3.2% и мало изменялась в течение роста (нулевое время на рис. 2б). Обработка протонифором карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразоном (20 мкМ CCCP) увеличивала количество клеток, проницаемых для DiBAC<sub>4</sub>(3),



**Рис. 2.** Изменения физиологических параметров *E. coli* при голодании по фосфату. *a* – Уровень АТФ; *б* – процент клеток, утративших мембранный потенциал (окрашенных флуоресцентным красителем DiBAC<sub>4</sub>(3)); *в* – содержание растворенного кислорода ( $pO_2$ ) и внеклеточного калия ( $K^+$ ) в культуре *E. coli* BW25113 (wt), 0.5 мВ соответствует 8 мкМ  $K^+$ ; *г* – внеклеточная концентрация  $H_2O_2$  в культуре *E. coli* BW25113 (wt); *д* – накопление  $H_2O_2$  в культуральной среде мутантов по тиоловым редокс-системам; *е* – скорость накопления  $H_2O_2$  в среде исследуемых штаммов в течение 2 ч роста или голодания (нмоль ·  $OD_{600}^{-1}$  мин<sup>-1</sup>). \* $p < 0.05$  между значениями параметров, полученных для мутантов, относительно родительского штамма (*б*, *д*) или между значениями в растущей и голодающей культурах для каждого штамма (*е*).

до 54% в течение 20 мин (не показано). В течение 48 ч голодания по фосфату не наблюдалось увеличения числа окрашенных клеток у всех штаммов, что свидетельствует о том, что голодающие клетки сохраняли мембранный потенциал.

Снижение скорости роста на начальной фазе инкубации в культуральной среде без фосфата сопровождалось падением уровня кислорода в ней (рис. 2*в*). Мы предполагаем, что это может быть следствием аэробного метаболизма глюкозы. Скорость падения  $pO_2$  для родительского штамма на этой фазе составляла 4.3%  $OD_{600}^{-1}$  мин<sup>-1</sup> по сравнению с 6.3%  $OD_{600}^{-1}$  мин<sup>-1</sup> за аналогичный период после переноса бактерий в среду с фосфатом. У всех штаммов, включая родительский, через 10–20 мин от начала инкубации, истощение фосфата приводило к резкому повышению  $pO_2$  и

уровня  $K^+$  в среде, что свидетельствует о снижении потребления кислорода и выходу части  $K^+$  из клеток (рис. 2*в*). Далее возобновлялось медленное потребление кислорода и  $K^+$ , соответствующее росту бактерий с низкой скоростью. Скорость снижения  $pO_2$  на этой фазе (через 40–60 мин после переноса в среду без фосфата) составляла 0.27%  $OD_{600}^{-1}$  мин<sup>-1</sup>, что было почти в 5 раз ниже соответствующей скорости в среде с фосфатом (1.28%  $OD_{600}^{-1}$  мин<sup>-1</sup>).

#### Влияние фосфатного голодания на продукцию оксидантов и экспрессию антиоксидантных генов *E. coli*

Рост бактерий в присутствии фосфата сопровождался накоплением  $H_2O_2$  в среде. В голодаю-

шей культуре концентрация внеклеточной перекиси водорода удерживалась на низком уровне, при добавлении фосфата возобновление роста сопровождалось быстрым повышением  $H_2O_2$  в среде (рис. 2а). В присутствии фосфата у всех мутантов (кроме *gor*) внеклеточная концентрация  $H_2O_2$  была ниже, чем у родительского штамма. Наиболее низкий уровень  $H_2O_2$  был у двойного мутанта *gshA trxA* и составлял 35% от родительского показателя. У мутанта *gor*, дефицитного по глутатионредуктазе, внеклеточная концентрация  $H_2O_2$  было на 12% выше, чем у родительского штамма (рис. 2д). Скорость накопления  $H_2O_2$  в среде, рассчитанная как  $\text{нмоль} \cdot \text{OD}_{600}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ , была минимальна у мутантов *gshA* и *gshA trxA*. В остальных случаях достоверная разница с родителем отсутствовала (рис. 2е). Через 1 ч от начала голодания уровень  $H_2O_2$  у всех штаммов был в среднем на 44% ниже, чем в растущей культуре. Степень снижения в целом была пропорциональна содержанию  $H_2O_2$  до начала голодания, за исключением двойного мутанта *gor trxB*, у которого уровень  $H_2O_2$  снизился на 29% от исходного. Скорость накопления  $H_2O_2$  в голодающей культуре также была ниже, чем в растущей, у всех штаммов, кроме *gshA* (рис. 2е). При дальнейшем наблюдении выявлено, что через 24 ч голодания внеклеточный уровень  $H_2O_2$  у мутантов *gshA* и *trxB* восстанавливался до значений, близких к таковым в растущей культуре, а у родительского штамма и мутантов *gor* и *trxA* несколько повышался, но не достигал значений в растущей культуре. Обращает внимание резкое увеличение (более чем в 2 раза) продукции  $H_2O_2$  у двойных мутантов (рис. 2д).

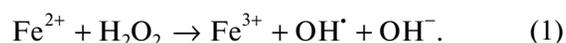
В противоположность  $H_2O_2$ , продукция супероксида при голодании по фосфату не только не уменьшалась, но даже увеличивалась в 2–3 раза по сравнению с культурой, не лимитированной по фосфату (рис. 3а). Этот эффект в равной степени наблюдался как в родительском штамме, так и у мутантов *gshA* и *gshA trxA*. Увеличению продукции супероксида соответствовало замедление дыхания при голодании (рис. 2в). Добавление фосфата приводило к снижению образования супероксида до уровня, наблюдаемого в культуре с фосфатом (рис. 3а).

Снижение внеклеточных уровней  $H_2O_2$ , наблюдаемое при голодании по фосфату, может быть результатом как снижения продукции перекиси, так и повышения активности ферментов, разрушающих перекись водорода, таких как каталазы G и E. Экспрессия гена *katG*, кодирующего каталазу G, регулируется транскрипционным фактором OxyR, который активируется при повышении  $H_2O_2$ , и регулятором общего стрессового ответа RpoS при переходе в стационарную фазу [30]. Ген *katE*, кодирующий каталазу E, экспрессируется

под контролем RpoS, уровень которого обратно пропорционален удельной скорости роста [31].

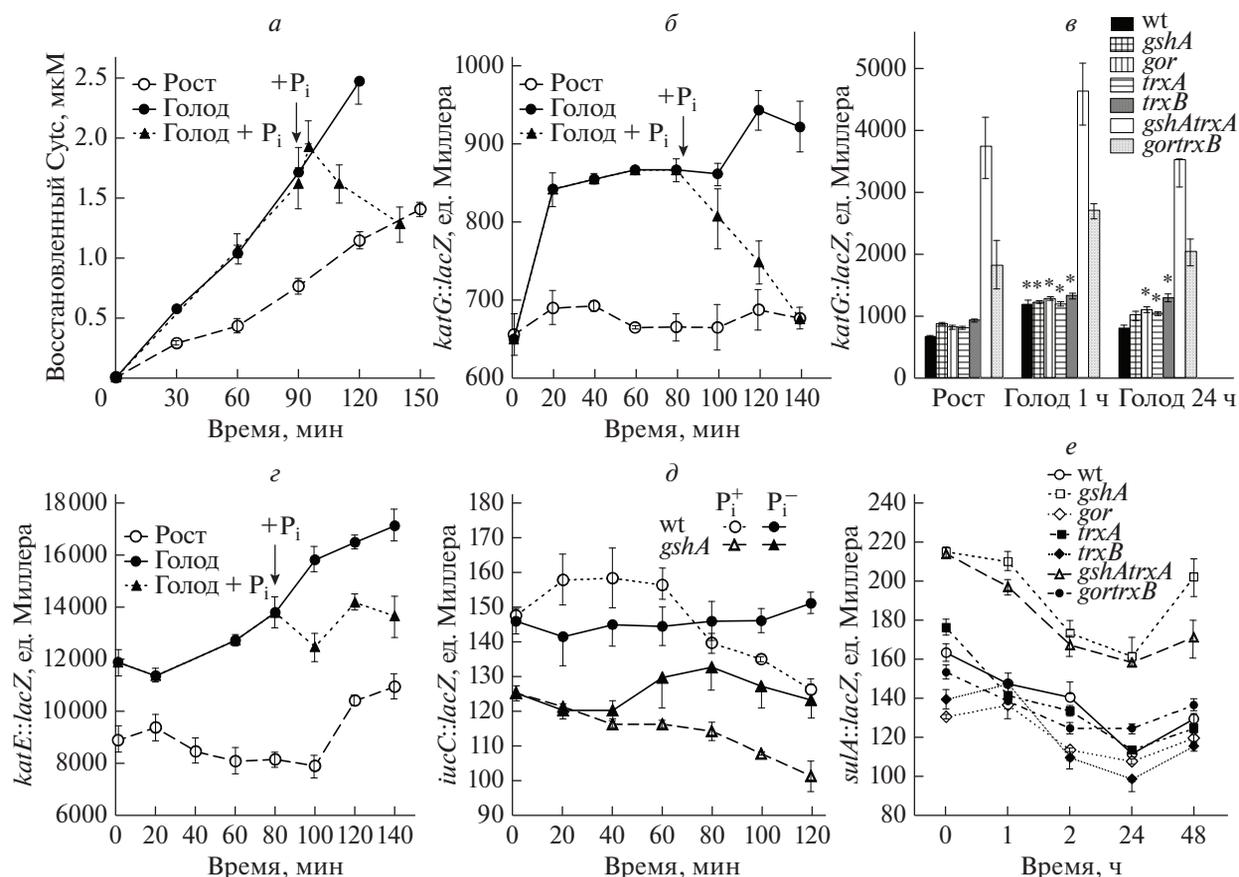
При росте на фосфате экспрессия *katG::lacZ* поддерживалась на постоянном уровне, но быстро увеличивалась с началом голодания (рис. 3б). Добавление фосфата снижало экспрессию гена *katG* до уровня, наблюдаемого в растущей культуре. В растущей культуре экспрессия *katG::lacZ* у одиночных мутантов была выше, чем у родительского штамма в среднем на 25%, а у двойных мутантов *gshA trxA* и *gor trxB* – в 5.6 и 2.7 раза соответственно (рис. 3в). Голодание в течение 1 ч приводило к повышению экспрессии *katG::lacZ* у всех штаммов, в том числе у родительского на 76%, у одиночных мутантов в среднем на 47%. Двойные мутанты сохраняли высокий уровень экспрессии *katG::lacZ*. Примечательно, что у двойных мутантов, растущих с фосфатом и голодающих в течение 1 ч, низким уровням  $H_2O_2$  соответствовала самая высокая экспрессии *katG::lacZ*. Хотя через 24 ч от начала голодания уровень экспрессии *katG::lacZ* у всех штаммов несколько снижался по сравнению со значениями, наблюдаемыми после 1 ч голодания, он все еще оставался выше, чем у бактерий, растущих на среде с фосфатом (рис. 3в). Также зарегистрировано индуцируемое голоданием повышение экспрессии *katE::lacZ* (рис. 3г). В фосфатсодержащей культуре родительского штамма *E. coli* экспрессия этого слияния за 2 ч увеличивалась на 17% (с  $8852 \pm 851$  до  $10377 \pm 72$  единиц Миллера), в то время как в голодающей культуре на 86% (до  $16486 \pm 220$ ).

Основная причина повреждения ДНК и гибели *E. coli* при пероксидном стрессе – образование высокотоксичных гидроксильных радикалов в реакции Фентона [32]:



Пул свободного железа в *E. coli* поддерживается на низком уровне и строго контролируется транскрипционным регулятором Fur [33]. Один из членов регулона Fur – ген *iucC*, кодирующий белок, участвующий в синтезе сидерофора аэробактерии. Снижение содержания внутриклеточного свободного железа стимулирует экспрессию *iucC*. Использование слияния *iucC::lacZ* [22] позволяет отследить степень индукции регулона Fur и получить косвенную оценку состояния пула свободного железа. Как видно из рис. 3д, у родительского штамма *E. coli* и мутанта *gshA* через 2 ч голодания экспрессия *iucC::lacZ* повышалась на 21% по сравнению с клетками, растущими на фосфате ( $p < 0.05$ ). Это может свидетельствовать о некотором снижении содержания свободного железа в цитоплазме.

В ответ на повреждение ДНК клетки *E. coli* индуцируют SOS-регулон, контролирующий гены,



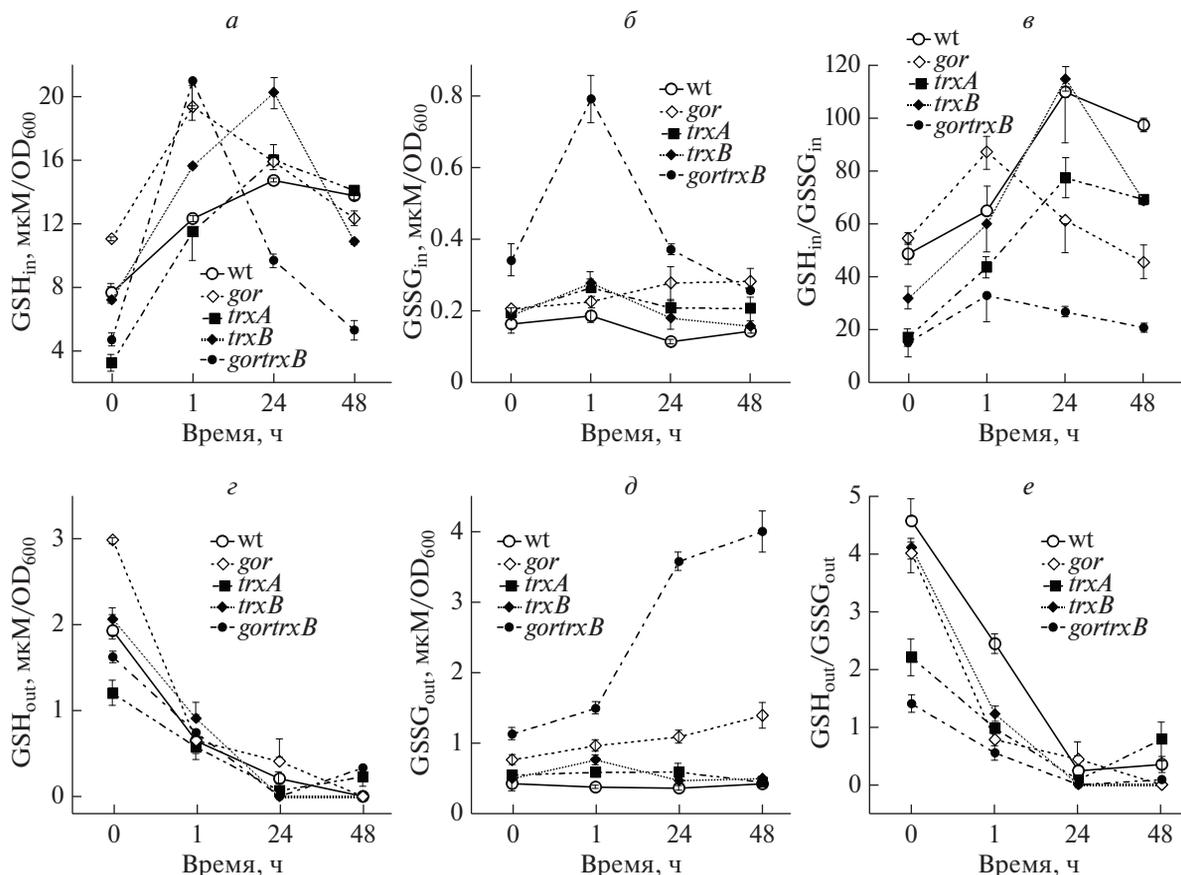
**Рис. 3.** Продукция супероксида и экспрессия антиоксидантных генов в растущих и голодающих по фосфату культурах *E. coli*. *a* – Продукция супероксида в штамме BW25113 (wt), измеренная по методу [26] как концентрация восстановленного цитохрома с (Сутс); *б* – экспрессия *katG::lacZ* в штамме BW25113 (wt); *в* – экспрессия *katG::lacZ* у мутантов по тиоловым редокс-системам (\* $p < 0.01$  между значениями параметров в растущей и голодающей культурах для каждого штамма); *г* – экспрессия *katE::lacZ* в штамме BW25113 (wt); *д* – экспрессия *iucS::lacZ* в штаммах BW25113 (wt) и JW2663 (*gshA*); *е* – экспрессия *sulA::lacZ* у исследуемых мутантов при голодании по фосфату.

участвующие в репарации ДНК [34]. Для исследования экспрессии генов SOS мы использовали транскрипционное слияние гена *sulA*, медиатора филаментации в ответе SOS, с геном *lacZ* [21]. В культурах *E. coli*, растущих на среде с фосфатом, наиболее высокий уровень экспрессии *sulA::lacZ* был у штаммов *gshA* и *gshA trxA* ( $215 \pm 4$  единиц Миллера), что на 32% выше, чем в родительском штамме ( $163 \pm 4$ ) (рис. 3е). Наиболее низкая экспрессия была у штамма *gor* ( $130 \pm 1$ ). У всех штаммов (включая родительский) в течение 24 ч голодания по фосфату наблюдалось статистически достоверное снижение экспрессии *sulA::lacZ* – в среднем на 26%, что может свидетельствовать об уменьшении повреждения ДНК. Через 48 ч голодания у всех исследованных штаммов уровень экспрессии *sulA::lacZ* несколько повышался по сравнению с 24-часовой точкой (максимально на 25% у мутанта *gshA*), но не достигал значений, характерных для растущей культуры.

#### Влияние фосфатного голодания на уровень и редокс-статус глутатиона в клетках *E. coli*

Ранее нами показано, что уровни внутриклеточного ( $GSH_{in}$ ) и внеклеточного ( $GSH_{out}$ ) глутатиона, а также редокс-статус глутатиона значительно изменяются при различных стрессах [3, 5, 14, 35, 36]. Представляло интерес проверить влияние голодания по фосфату на указанные параметры.

В растущих на фосфате клетках *E. coli* наибольшая концентрация  $GSH_{in}$  выявлена в мутанте *gor* ( $11.1 \pm 0.07$  мкМ/OD<sub>600</sub>), наименьшая – в мутанте *trxA* ( $3.3 \pm 0.6$ ). В мутантах *gor trxB*, *trxB* и родительском штамме содержалось соответственно  $4.7 \pm 0.4$ ,  $7.2 \pm 0.2$  и  $7.7 \pm 0.3$  мкМ/OD<sub>600</sub>. Через 1 ч культивирования в среде без фосфата у всех штаммов наблюдалось статистически достоверное ( $p < 0.05$ ) повышение уровня  $GSH_{in}$ . Наименьшее увеличение (в 1.6 раза) было у родитель-



**Рис. 4.** Изменение статуса глутатиона в голодающих по фосфату культурах *E. coli*. *a* – Внутриклеточный восстановленный глутатион ( $GSH_{in}$ ); *b* – внутриклеточный окисленный глутатион ( $GSSG_{in}$ ); *c* – внеклеточный восстановленный глутатион ( $GSH_{out}$ ); *d* – внеклеточный окисленный глутатион ( $GSSG_{out}$ ), *e* – соотношение  $GSH_{out}/GSSG_{out}$ .

ского штамма, наибольшее – у *gor trxB* (в 4.4 раза) (рис. 4*a*). Повышенный уровень  $GSH_{in}$  сохранялся у всех штаммов после 24 ч голодания. К 48 ч голодания у всех штаммов наблюдалась тенденция к снижению внутриклеточного GSH, хотя и в разной степени. У родительского штамма, а также у мутантов *trxA* и *trxB* уровень  $GSH_{in}$  оставался все еще выше, чем в культурах, растущих на фосфате, а у *gor* и *gor trxB* приблизился к этому значению (рис. 4*a*).

Известно, что клетки *E. coli* аккумулируют в среде глутатион в микромолярных концентрациях [37]. Уровень внеклеточного глутатиона зависит от условий культивирования и может значительно изменяться в стрессовых ситуациях [3]. Нами показано, что в течение роста на среде с фосфатом уровень  $GSH_{out}$  поддерживался в диапазоне от  $1.2 \pm 0.15$  (*trxA*) до  $3.0 \pm 0.03$  (*gor*)  $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$  и коррелировал со значениями  $GSH_{in}$  ( $r = 0.95$ ). Голодание по фосфату у всех штаммов сопровождалось снижением уровня  $GSH_{out}$ , более быстрым в течение первого часа (рис. 4*c*). К

этому времени и далее, до конца культивирования, различия в значениях  $GSH_{out}$  между штаммами резко уменьшались. Через 48 ч голодания уровень  $GSH_{out}$  приближался к следовым количествам (рис. 4*c*). Как следует из сравнения данных, представленных на рис. 4*a* и 4*c*, существенный вклад в увеличение пула  $GSH_{in}$  в процессе голодания может вносить его импорт из среды.

Уровень внутриклеточного окисленного глутатиона ( $GSSG_{in}$ ) в среде с фосфатом у родительского штамма составлял  $0.16 \pm 0.02$   $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$  (рис. 4*b*). Близкие к этому значению концентрации  $GSSG_{in}$  обнаружены у штаммов *gor*, *trxA* и *trxB*:  $0.20 \pm 0.06$ ,  $0.19 \pm 0.04$  и  $0.19 \pm 0.01$  соответственно. Лишенный обоих редуктаз мутант *gor trxB* заметно отличался от остальных штаммов, показывая уровень  $GSSG_{in}$  в два раза более высокий, чем у родительского штамма ( $p < 0.05$ ). Не выявлено статистически достоверного изменения концентрации  $GSSG_{in}$  в процессе голодания у всех штаммов, кроме *gor trxB*. В этом штамме через 1 ч после начала голодания уровень  $GSSG_{in}$

увеличился в 2.3 раза ( $p < 0.05$ ), а затем, в течение дальнейшего культивирования, снизился до уровня, близкого к начальному значению (рис. 4б).

У штаммов, растущих в присутствии фосфата, концентрация окисленного внеклеточного глутатиона ( $GSSG_{out}$ ) была в среднем в 3 раза ниже, чем  $GSH_{out}$  (рис. 4д). У родительского штамма и у мутантов *trxA* и *trxB* низкий уровень  $GSSG_{out}$  сохранялся и при голодании. Исключение составлял мутант *gor trxB*, у которого концентрация  $GSSG_{out}$  в растущих на фосфате клетках была только в 1.5 раза ниже, чем  $GSH_{out}$ , а при голодании увеличивалась 3.6 раза, достигая уровня  $GSH_{in}$ , который наблюдался в растущей культуре и через 48 ч голодания. У мутанта *gor* при голодании уровень  $GSSG_{out}$  увеличивался почти в два раза (рис. 4д).

Редокс-статус глутатиона хорошо отражает соотношение  $GSH/GSSG$ . В связи с тем, что начальные уровни  $GSSG_{in}$  у всех штаммов изменялись в узком диапазоне, различия в  $GSH_{in}/GSSG_{in}$  коррелировали со значениями  $GSH_{in}$ , которые варьировали в более широком диапазоне (рис. 4е). В проведенных нами экспериментах в среде с фосфатом значение  $GSH_{in}/GSSG_{in}$  для родительского штамма составляло  $48.6 \pm 3.9$ . Отсутствие обеих редуктаз у штамма *gor trxB* резко снижало этот показатель более чем в три раза. В течение голодания по фосфату отмечалось значительное увеличение соотношения  $GSH_{in}/GSSG_{in}$  в сторону редуцированных значений и достигало максимума для *gor* через 1 ч ( $87 \pm 6$ ), а для *trxA*, *trxB* и родительского штамма ( $77 \pm 13$ ,  $114 \pm 6$  и  $110 \pm 19$  соответственно) — через 24 ч от начала культивирования (рис. 4е). Наименьшее увеличение наблюдалось у *gor trxB* ( $32 \pm 10$ ), что связано с наименьшим среди других штаммов содержанием  $GSH_{in}$  и наибольшим  $GSSG_{in}$ . У всех штаммов, растущих на фосфате, соотношение  $GSH_{out}/GSSG_{out}$  изменялось от  $1.4 \pm 0.16$  у *gor trxB* до  $4.6 \pm 0.3$  у родительского штамма, составляя в среднем около 3.3, что в 10 раз меньше, чем соотношение  $GSH_{in}/GSSG_{in}$ . В противоположность  $GSH_{in}/GSSG_{in}$ , соотношение  $GSH_{out}/GSSG_{out}$  у всех штаммов при голодании значительно снижалось в сторону окислительных значений (рис. 4е).

Следует отметить, что полученные в этой работе значения  $GSH_{in}/GSSG_{in}$  значительно ниже тех, которые наблюдались ранее при выращивании *E. coli* BW25113 на среде M9, где в нормальных ростовых условиях это соотношение варьировало от 330 до 500 [14]. В проведенной нами работе у тех же бактерий, растущих на среде MOPS, соотношение  $GSH_{in}/GSSG_{in}$  было примерно в 5 раз ниже, что связано с увеличением уровня  $GSSG_{in}$ . Это увеличение  $GSSG_{in}$  может свидетельствовать о большей интенсивности окислительных про-

цессов в среде MOPS, где концентрация ионов  $Fe^{2+}$  в 5 раз больше, чем в M9.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В качестве показателей, свидетельствующих о наличии окислительного стресса при ответе бактерий на стрессы, прямо не связанные с действием АФК, обычно рассматривают увеличение продукции АФК, активацию компонентов антиоксидантных систем и окислительное повреждение биомолекул — в совокупности со снижением выживаемости или скорости роста. В результате исследования динамики изменения содержания кислорода в среде нами показано, что после истощения фосфата в присутствии глюкозы бактерии сохраняли дыхательную активность, хотя и на более низком уровне, чем растущие с фосфатом.

В аэробных условиях клетки *E. coli* продуцируют супероксид и  $H_2O_2$ , когда молекулярный кислород случайно получает электроны от восстановленных кофакторов флавопротеинов. Возможны и другие, в том числе внеклеточные, источники АФК [38]. В выбранных нами условиях переход к голоданию по фосфату сопровождался снижением накопления  $H_2O_2$  в среде у всех изученных штаммов. Это могло быть следствием понижения интенсивности дыхания, о чем свидетельствовало повышение содержания кислорода. Однако увеличение скорости продукции супероксида и экспрессии генов *katG* и *katE* при переходе к голоданию свидетельствует о повышении продукции АФК. Экспрессия обоих генов находится под контролем RpoS, реагирующего на снижение скорости роста и переход в стационарную фазу [30]. Экспрессия *katG* может контролироваться также транскрипционным регулятором OxyR, который откликается на повышение внутриклеточного  $H_2O_2$  и помимо *katG* активирует транскрипцию и других генов (*ahpFC*, *gorA* и др.), участвующих в защите *E. coli* от пероксидного стресса [39]. Таким образом, наблюдаемое при голодании по фосфату снижение накопления  $H_2O_2$  в среде может быть следствием индукции антиоксидантных ферментов.

Особый интерес представляют обнаруженные при фосфатном голодании значительные изменения редокс-статуса глутатиона. Наиболее важные из них связаны со снижением уровня  $GSH$  в среде и с увеличением его содержания в цитоплазме, а также со сдвигом соотношения  $GSH_{in}/GSSG_{in}$  в сторону редуцированных значений, а  $GSH_{out}/GSSG_{out}$  — в сторону окислительных значений.

Ранее увеличение  $GSH_{in}$  было обнаружено у *E. coli*, растущих в аэробных условиях на среде M9, при действии ципрофлоксацина [40, 41] и хлорамфеникола [14], при аминокислотном голодании [14] и при истощении глюкозы [35]. Кроме

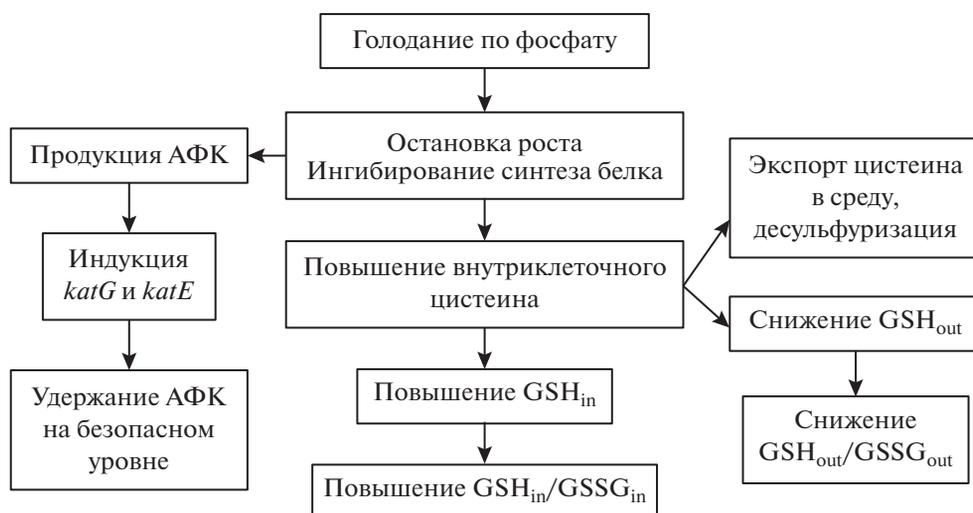


Рис. 5. Предполагаемая схема ответа антиоксидантных систем *E. coli* на голодание по фосфату.

того, при действии ципрофлоксацина и хлорамфеникола одновременно наблюдалось увеличение  $GSH_{out}$ , тогда как при аминокислотном голодании изменения в  $GSH_{out}$  отсутствовали. Выявленные нами изменения статуса глутатиона при фосфатном голодании аналогичны тем, которые происходили при остановке роста *E. coli* вследствие истощения глюкозы – когда одновременно происходило увеличение  $GSH_{in}$  и снижение  $GSH_{out}$  [35]. Ранее было показано, что факторы, снижающие энергетический статус клеток, ингибируют трансмембранный цикл GSH и стимулируют импорт GSH из среды [5]. Это может объяснить одинаковые изменения статуса глутатиона внутри и снаружи клетки при истощении глюкозы и фосфата. В обоих случаях голодание сопровождалось значительным снижением уровня ATP [35, и эта работа]. Повышение уровня ATP отмечено при действии ципрофлоксацина [41] и хлорамфеникола [42].

В цитируемых выше работах установлено, что индуцируемые стрессом изменения статуса глутатиона связаны с его участием в гомеостазе цистеина. Бактерии поддерживают низкий уровень внутриклеточного свободного цистеина из-за его высокой редокс-активности и способности восстанавливать внутриклеточное железо, тем самым поставляя субстрат для реакции Фентона [15, 16]. GSH относится к слабым восстановителям железа [15], поэтому включение цистеина в молекулу глутатиона служит одним из эффективных механизмов поддержания гомеостаза цистеина при повышении его внутриклеточной концентрации, наблюдаемой при остановке синтеза белка [14]. Снижение избытка цистеина в клетках достигается также его экспортом в среду и десульфуризацией с образованием  $H_2S$  [14, 16, 17]. На-

блюдаемое нами повышение уровня  $GSH_{in}$  при фосфатном голодании также может быть следствием интенсификации синтеза глутатиона при возникновении избытка цистеина вследствие торможения синтеза белка и других метаболических процессов, потребляющих цистеин.

Известно, что редокс-системы глутатиона и тиоредоксина в функциональном отношении в значительной мере перекрываются и дублируют друг друга. Вследствие этого отсутствие компонентов одной из систем часто не проявляется фенотипически и только множественные мутации, затрагивающие обе системы, ведут к существенным нарушениям метаболизма. Кроме того, редокс-системы глутатиона и тиоредоксина тесно взаимодействуют с регулоном OxyR, активируемым  $H_2O_2$ . Так, при пероксидном стрессе потеря глутатионредуктазы или тиоредоксинредуктазы может компенсироваться увеличением экспрессии *katG* (и синтеза GSH в первом случае) [6].

Поведение одиночных мутантов при фосфатном голодании в целом соответствует тому, что наблюдалось ранее при пероксидном стрессе. По такому интегральному показателю как скорость роста мутанты (за исключением *gshA*) незначительно отличались от родительского штамма и друг от друга. Особый интерес представляют данные по двойному мутанту *gor trxB*. По сравнению с родительским и одиночными мутантами этот штамм характеризовался многократно более высокой экспрессией *katG::lacZ*, наибольшим уровнем окисленного внутри- и внеклеточного глутатиона и соответственно самым низким соотношением  $GSH/GSSG$  в обоих компартментах. Через 48 ч голодания по фосфату у этого штамма (как и у *gshA trxA*) было самое низкое значение КОЕ. Близкие свойства были у двойного мутанта

*gshA trxA* (исключая показатели, относящиеся к статусу глутатиона). Данные о поведении мутанта *gor trxB* дают дополнительные доказательства о наличии окислительного стресса при фосфатном голодании. Учитывая все перечисленные свойства, двойной мутант *gor trxB* можно рассматривать как удобную модель для изучения ответа бактерий на стрессы, не связанные с прямым действием АФК.

Полученные результаты суммированы на рис. 5.

На основании полученных результатов можно говорить о том, что при фосфатном голодании у *E. coli* увеличивается скорость продукции АФК, однако индукция каталаз предотвращает накопление  $H_2O_2$  выше токсического уровня. В сочетании с низким уровнем свободного железа это позволяет бактериям поддерживать условия, снижающие риск повреждения ДНК, о чем свидетельствует отсутствие в голодающих клетках повышения экспрессии гена *sulA*, входящего в SOS-регулон. Примечательно также, что значительное снижение пула АТР, наблюдаемое по мере падения скорости роста клеток, не сопровождается адекватным падением мембранного потенциала и полным вытеканием калия, что может свидетельствовать о сохранении нормальной активности мембран в голодающих клетках. Фосфатное голодание вызывает значительный сдвиг статуса глутатиона внутри и снаружи клеток, что, по-видимому, отражает работу механизмов гомеостаза внутриклеточного цистеина. Совокупность происходящих изменений приводит к тому, что в описываемых условиях клетки *E. coli* могут длительное время поддерживать высокую жизнеспособность, позволяющую им быстро возобновлять рост после введения фосфата в среду. Мутации по отдельным компонентам тиоловых редокс-систем не приводят к критическим нарушениям, вызывающим гибель клеток, благодаря координированным изменениям активности других антиоксидантных систем.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-14-00093).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sevilla E., Bes M.T., Gonzalez A., Peleato M.L., Fillat M.F. (2019) Redox-based transcriptional regulation in prokaryotes: revisiting model mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **30**, 1651–1696. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7442>
- Imlay J.A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Ann. Rev. Biochem.* **77**, 755–776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>
- Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н. (2005) Глутатион у бактерий. *Биохимия.* **70**, 1459–1473.
- Vlamiš-Gardikas A. (2008) The multiple functions of the thiol-based electron flow pathways of *Escherichia coli*: eternal concepts revised. *Biochim. Biophys. Acta.* **1780**, 1170–1200. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.013>
- Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. (2012) Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells. *Microbiol. Res.* **167**, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.005>
- Carmel-Harel O., Storz G. (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 439–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.439>
- Wanner B.L. (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Eds Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umbrager H.E. Washington DC: Am. Soc. Microbiol., pp. 1357–1381.
- Lamarche M.G., Wanner B.L., Crepin S., Harel J. (2008) The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**(3), 461–473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>
- VanBogelen R.A., Olson E.R., Wanner B.L., Neidhardt F.C. (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**(15), 4344–4366. <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4344-4366.1996>
- Gerard F., Dri A.M., Moreau P.L. (1999) Role of *Escherichia coli* RpoS, LexA and H-NS global regulators in metabolism and survival under aerobic, phosphate-starvation conditions. *Microbiology.* **145**, 1547–1562. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-7-1547>
- Moreau P.L., Gerard F., Lutz N.W., Cozzone P. (2001) Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **39**, 1048–1060. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02303.x>
- Moreau P.L. (2004) Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions. *J. Bacteriol.* **186**, 7364–7368. <https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7364-7368.2004>
- Yuan Z.C., Zaheer R., Finan T.M. (2005) Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* **58**(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04874.x>

14. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. (2019) Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells. *Amino Acids*. **51**, 1577–1592.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-019-02795-2>
15. Park S., Imlay, J.A. (2003) High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**, 1942–1950.  
<https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1942-1950.2003>
16. Imlay K.R.C., Korshunov S., Imlay J.A. (2015) The physiological roles and adverse effects of the two cysteine importers of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**, 3629–3644.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00277-15>
17. Korshunov S., Imlay K.R.C., Imlay J.A. (2020) Cysteine import is a valuable but risky process whose hazards *Escherichia coli* minimizes by inducing a cysteine exporter. *Mol. Microbiol.* **113**, 22–39.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.14403>
18. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.  
<https://doi.org/10.1038/msb4100050>
19. Tao K., Makino K., Yonei S., Nacata A., Shinagawa H. (1989) Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 371–376.  
<https://doi.org/10.1007/bf00332397>
20. Mulvey M.R., Switala J., Borys A., Loewen P.C. (1990) Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 6713–6720.  
<https://doi.org/10.1128/jb.172.12.6713-6720.1990>
21. Volkert M.R., Gately F.H., Hajec L.I. (1989) Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. *Mutation. Res.* **217**, 109–115.  
[https://doi.org/10.1016/0921-8777\(89\)90062-1](https://doi.org/10.1016/0921-8777(89)90062-1)
22. Maringanti S., Imlay J.A. (1999) An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 3792–3802.  
<https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3792-3802.1999>
23. Neidhardt F.C., Bloch P.L., Smith D.F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.* **119**, 736–747.  
<https://doi.org/10.1128/jb.119.3.736-747.1974>
24. Wickens H.J., Pinney R.J., Mason D.J., Gant V.A. (2000) Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 682–687.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.676-681.2000>
25. Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Tyulenev A.V., Oktyabrsky O.N. (2015) Extracellular superoxide provokes glutathione efflux from *Escherichia coli* cells. *Res. Microbiol.* **166**, 609–617.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.07.007>
26. Korshunov S., Imlay J.A. (2006) Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 6326–6334.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00554-06>
27. Seaver L.C., Imlay J.A. (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 7173–7181.  
<https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001>
28. Tietze F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**, 502–522.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5)
29. Miller J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.
30. Ivanova A., Miller C., Glinsky G., Eisenstark A. (1994) Role of the *rpoS(katF)* in *oxyR* independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**, 571–578.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01043.x>
31. Ihssen J., Egli T. (2004) Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*. *Microbiology*. **150**, 1637–1648.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.26849-0>
32. Imlay J.A., Linn S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science*. **240**, 640–642.  
<https://doi.org/10.1126/science.2834821>
33. Hantke K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 172–177.  
[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00184-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00184-3)
34. Masłowska K.H., Makiela-Dzbenka K., Fijalkowska I.J. (2019) The SOS system: a complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* **60**, 368–384.  
<https://doi.org/10.1002/em.22267>
35. Tyulenev A.V., Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. (2018) The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures. *Bioelectrochemistry*. **121**, 11–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.12.012>
36. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. (2018) The sharp phase of respiratory inhibition during amino acid starvation in *Escherichia coli* is RelA-dependent and associated with regulation of ATP synthase activity. *Res. Microbiol.* **169**, 157–165.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.02.003>
37. Owens R.A., Hartman P.E. (1986) Export of glutathione by some widely used *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* **168**, 109–114.  
<https://doi.org/10.1128/jb.168.1.109-114.1986>
38. Imlay J.A. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 443–454.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>
39. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 6161–6165.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6161>

40. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Peters M.A., Oktyabrsky O.N. (2017) Ciprofloxacin provokes SOS-dependent changes in respiration and membrane potential and causes alterations in the redox status of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **168**, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.008>
41. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. (2022) Study of the contribution of active defense mechanisms to ciprofloxacin tolerance in *Escherichia coli* growing at different rates. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **115**, 233–251. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01693-6>
42. Smirnova G., Tyulenev A., Muzyka N., Ushakov V., Samoiloza Z., Oktyabrsky O. (2023) Influence of growth medium composition on physiological responses of *Escherichia coli* to the action of chloramphenicol and ciprofloxacin. *BioTech.* **12**, 43. <https://doi.org/10.3390/biotech12020043>

## Changes in Activity of Antioxidant Systems of *Escherichia coli* under Phosphate Starvation

G. V. Smirnova<sup>1</sup>, A. V. Tyulenev<sup>1</sup>, N. G. Muzyka<sup>1</sup>, L. V. Sutormina<sup>1</sup>, and O. N. Oktyabrsky<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, "Perm Federal Research Center", Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia*

\*e-mail: oktyabr@iegm.ru

Changes in the activity of antioxidant systems in *Escherichia coli* during phosphate starvation were studied. It was shown that starvation was accompanied by a decrease in the intensity of respiration, an increase in the rate of superoxide production, and a decrease in the level of ATP. Simultaneously, there was a decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the medium and a significant increase in the expression of the *katG* and *katE* genes encoding the HPI and HPII catalases, respectively. At the same time, there was no drop in the membrane potential, which may indicate the retention of normal membrane activity in starving cells. It has been shown for the first time that the transition of *E. coli* to phosphate starvation is accompanied by significant changes in the status of glutathione. The most important of them are associated with a decrease in the level of glutathione reductive form (GSH) in the medium (GSH<sub>out</sub>) and with a simultaneous increase in its content in the cytoplasm (GSH<sub>in</sub>), as well as a shift in the GSH<sub>in</sub> to oxidized glutathione form (GSSG<sub>in</sub>) ratio towards reductive values, and GSH<sub>out</sub>/GSSG<sub>out</sub> towards oxidative values. Among the mutants used in the work, the double mutant *gor trxB*, deficient in the synthesis of glutathione reductase and thioredoxin reductase, showed the most pronounced distinctive features. Compared to the parental strain, this mutant showed a multiple higher expression of *katG::lacZ*, the highest level of oxidized intra- and extracellular glutathione, and, accordingly, the lowest GSH/GSSG ratio in both compartments. In general, the data obtained indicate that during phosphate starvation the interaction of the glutathione redox-system and regulons that control protection against reactive oxygen species creates conditions that allow maintaining the concentration of ROS below the toxic level. As a result, phosphate-starved *E. coli* cells can maintain a high viability for a long time that allows them quickly to resume growth after the addition of phosphate.

**Keywords:** antioxidant systems, *Escherichia coli*, phosphate starvation