



Активация рецепторов прорастания спор *B. anthracis*

М.Ю. Озеров¹, В.Г. Попов¹, Н.Н. Каркищенко², Д.В. Попов¹,
С.Ю. Пчелинцев¹, В.Н. Каркищенко²

¹ — Институт инженерной иммунологии, Московская область

² — Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: М.Ю. Озеров «Институт инженерной иммунологии»,
142380, Московская обл., Чеховский р-н, Любучаны, Науки 1

Общеизвестно, что бактериофаги не действуют на споры *B. anthracis*, но способны лизировать прорастающие споры и вегетативные клетки. Поэтому одной из задач при разработке биологического дезинфицирующего препарата против сибирской язвы является подбор эффективного активатора прорастания спор. Нами было выявлено, что наилучшим активатором прорастания спор *B. anthracis* является L-аланин, который способствует прорастанию более 90% спор за короткое время. Оптимальная концентрация L-аланина для запуска триггерных механизмов прорастания составляет 50-100 мМ.

Ключевые слова: *B. anthracis*, активаторы прорастания спор, L-аланин

Покоящиеся споры *B. anthracis*, образующиеся внутри цитоплазмы вегетативных клеток в неблагоприятных условиях, отличаются репрессией генома, почти полным отсутствием обмена веществ, малым количеством свободной воды, повышенной концентрацией ионов кальция, дипиколиновой кислоты, с которыми связывают термоустойчивость спор, образованием дополнительных оболочек, препятствующих осуществлению диффузии и проникновению веществ из внешней среды, большой устойчивостью к повреждающим факторам и способностью очень долго сохранять жизнеспособность. При попадании в благоприятные условия, а также под влиянием физико-химических факторов происходит активация спор (1-2 минуты) с последующей инициацией и прорастанием (20-30 минут), и вы-

растанием в вегетативные клетки (60-90 минут). Активация заключается в мобилизации метаболических процессов. Прорастание характеризуется удалением дипиколиновой кислоты, ионов кальция, разрушением пептидогликана кортекса. Прорастание регулируется специальными веществами — аминокислотами-активаторами прорастания, ионами магния, п-додециамином, глюкозой, нуклеозидами, ПАВ и др. Также прорастанию способствует механическое воздействие на споры. Давление 100 МПа инициирует прорастание спор посредством активации рецепторов прорастания, а давление 550 МПа открывает каналы для выхода дипиколиновой кислоты из спорового кортекса. Обработка давлением от 60 до 500 МПа и температурой 60°C благоприятна для прорастания покоящихся спор и,

таким образом для их инактивации [1-6]. В целом прорастание — это процесс, сопровождающийся сложными физиологическими и биохимическими изменениями, который приводит к потере спороспецифических свойств. Начинается он с интенсивного поглощения спорой воды и набухания. Специфические химические вещества взаимодействуют с соответствующими рецепторами [7]. Идентификация молекул для запуска процессов прорастания эндоспор *B. anthracis* и чувствительных к ним рецепторов прорастания является важным в процессе прорастания спор. Для каждого из известных путей прорастания спор *B. anthracis* необходимы, по крайней мере, два отдельных рецептора, взаимодействие между которыми обеспечивает покоящееся состояние эндоспор. Однако, еще не полностью детализирована функция некоторых рецепторных белков прорастания, которые являются мембранными белками [7].

Активация рецепторов прорастания инициирует серию комплексных биохимических процессов, которые последовательно активируют внутриклеточные протеазы и внеклеточные гидролазы, способствующие клеточной дифференциации в вегетативную форму. Механизмы сигнальной трансдукции от рецепторов прорастания к ферментам остаются до сих пор непонятыми [8].

На первом этапе прорастания происходит активация ферментов, которые находятся в поверхностных структурах (и в первую очередь, литических), необходимых для разрушения кортекса [8]. Происходят изменения в химическом составе, идет активный синтез белка и РНК.

Генетические локусы, кодирующие рецепторы прорастания были найдены и типизированы в локусе *gerA* у *B. subtilis* [8, 9]. Эти локусы функциони-

руют при запуске простого ответа на активацию прорастания. Локусы являются трицистроновыми оперонами, которые проявляют активность в развитии предспоры при спорообразовании сигма-G-зависимым способом [10,11]. Было показано, что мутации в семействе оперонов *gerA* вызывают инактивацию прорастания в ответ на воздействие специфическими молекулами активаторов прорастания спор [12-17].

На настоящий момент, в геноме *B. anthracis* идентифицировано семь *gerA*-подобных локусов [18]. Шесть из них (*gerA*, *gerH*, *gerK*, *gerL*, *gerS* и *gerY*) локализованы на хромосоме, тогда как седьмой локус, *gerX*, расположен внутри островка патогенности на вирулентной плазмиде *pXO1* [19]. Два хромосомных оперона *gerS* и *gerH* совместно обуславливают прорастание споры в ответ на воздействие инозином, или аланином в комбинации с ароматическими компонентами [12, 20]. При моделировании инфекции на животных было показано, что локус *gerX* участвует в прорастании спор *in vivo*, а также кодирует вирулентность [19]. Совместно локусы *gerK* и *gerL* требуются для активации аланин-зависимого пути прорастания споры, а также по отдельности для распознавания пролина и метионина (*gerK*) или серина и валина (*gerL*), как коактиваторов прорастания в комбинации с инозином [7]. Локус *gerS* требуется для активации прорастания в ответ на воздействие ароматическими аминокислотами — коактиваторами прорастания спор. Функция рецепторов, кодируемых локусами *gerA* и *gerY*, была незначительной при распознавании всех известных молекул активаторов прорастания спор [7]. Также выяснено, что промотер каждого предполагаемого оперона рецептора прорастания,

за исключением локуса *gerA*, активен во время спорообразования [7].

Общеизвестно, что бактериофаги не действуют на споры *B. anthracis*, но способны лизировать прорастающие споры и вегетативные клетки. Поэтому одной из задач при разработке биологического дезинфицирующего препарата является подбор эффективного активатора прорастания спор. Проводилась оценка воздействия активаторов прорастания на разных этапах развития спор в вегетативные клетки. Основное внимание уделялось веществам, которые не только способствуют прорастанию, но и делают этот процесс необратимым, запуская триггерные механизмы. Кроме того, выбирались активаторы прорастания, способствующие прорастанию наибольшего количества спор за короткое время.

Материал и методы

Суспензия спор *B. anthracis* (вакцинный штамм СТИ-1) готовилась в физиологическом растворе (рН 7,0). Концентрация спор в суспензии составляла 10^6 спор/см³, что корректировалось по стандарту мутности и биологической концентрации.

В кюветы с суспензией спор добавляли L-аланин в концентрациях 50 мМ или 100 мМ.

С целью снижения расхода L-аланина и выявления влияния на скорость прорастания спор *B. anthracis* комбинации L-аланина с другими аминокислотами была проведена серия опытов в комбинации с L-валином,

L-аспарагином и L-изолейцином в концентрациях 50 мМ или 100 мМ. Концентрация L-аланина, при этом была снижена до 10 мМ. Скорость прорастания определяли путем измерения снижения оптической плотности системы в течение 20 минут (длина волны 600 нм) на биофотометре Eppendorf, с интервалом 2 минуты, при комнатной температуре ($+22\pm 2^\circ\text{C}$).

Для определения эффективности действия активаторов прорастания спор, определяли количество непроросших спор в тестируемых системах по биологической концентрации после их прогревания при 70°C в течение 30 минут.

Результаты и их обсуждение

На рисунках 1 и 2 приведены средние результаты двух независимых опытов взаимодействия спор *B. anthracis* и активаторов прорастания. При использовании L-аланина в качестве активатора прорастания (концентрация 50 мМ), оптическая концентрация суспензии спор снизилась в более чем в два раза в течение 10 минут (рис. 1).

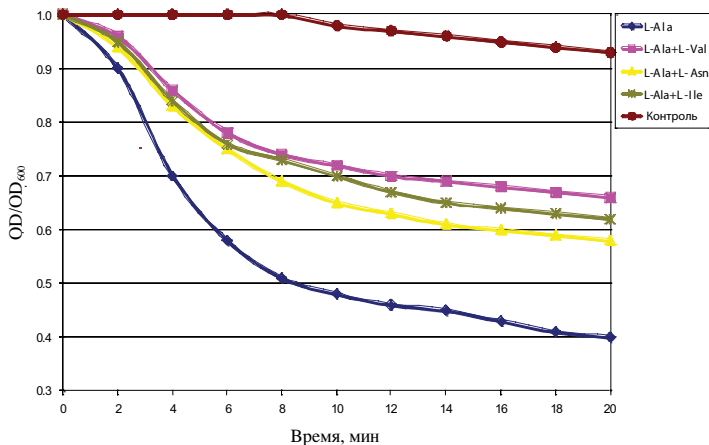


Рис. 1. Прорастание спор *B. anthracis* *in vitro*. L-аланин (L-Ala) применялся в концентрации 50 мМ. При применении комбинации L-аланина с другими аминокислотами, использовались концентрации 10 мМ для L-аланина и по 50 мМ каждой из аминокислот: L-валин (L-Val), L-аспарагин (L-Asn), L-изолейцин (L-Ile).

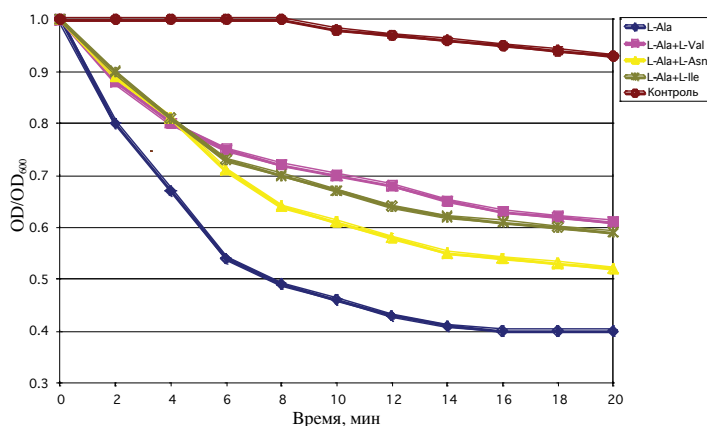


Рис. 2. Прорастание спор *B. anthracis* in vitro. L-аланин (L-Ala) применялся в концентрации 100 мМ. При применении комбинации L-аланина с другими аминокислотами, использовались концентрации 10 мМ для L-валина и по 100 мМ каждой из аминокислот: L-валин (L-Val), L-аспарагин (L-Asn), L-изолейцин (L-Ile).

При использовании L-аланина в концентрациях 100 мМ начальная скорость прорастания покоящихся спор *B. anthracis* была немного выше, чем при концентрации 50 мМ (рис. 2). Несмотря на то, что при применении L-аланина (L-Ala) в концентрации 50 мМ начальный этап прорастания происходит медленнее, процент проросших спор через 20 минут инкубации системы практически равен показателям, полученным при использовании L-аланина в концентрации 100 мМ (рис. 3).

При добавлении к 10 мМ L-аланина других аминокислот (L-валина (L-Val), L-аспарагина (L-Asn) и L-изолейцина (L-Ile)), в качестве ко-активаторов прорастания, в концентрациях 50 мМ или 100 мМ, не ускорило процесс прорастания. Оптиче-

ская плотность суспензии спор при добавлении ко-активаторов прорастания снижалась на 30-40% от исходной в течение 10 минут, при этом использование ко-активаторов в концентрации 100 мМ незначительно ускоряло процесс прорастания (рис. 2). Процент проросших спор при добавлении ко-активаторов составил только 46,7-53,8%, что в почти в 2 раза ниже, чем при использовании L-аланина без ко-активаторов (рис 3). Следовательно, использование L-валина, L-аспарагина и L-изолейцина, как ко-активаторов прорастания спор *B. anthracis* с целью снижения расхода L-аланина оказалось не эффективным.

Таким образом, исходя из полученных результатов, наилучшим активатором прорастания спор *B. anthracis* является

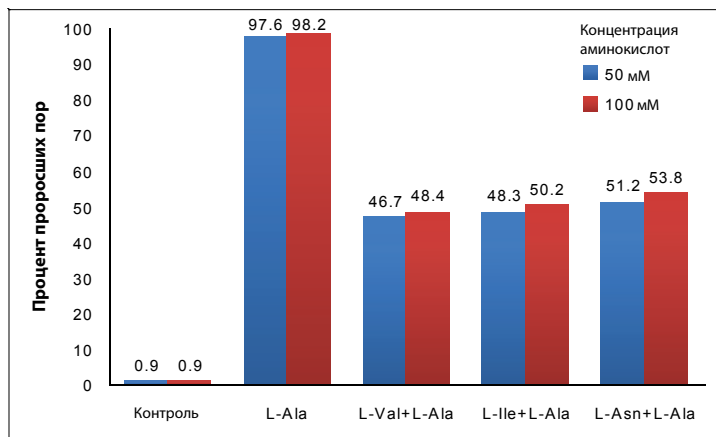


Рис. 3. Процент проросших спор *B. anthracis* через 20 минут воздействия активаторов, в зависимости от их концентрации активаторов прорастания. Концентрация L-аланина в сочетании с другими аминокислотами составляла 10 мМ.

ся L-аланин, который способствует прорастанию более 90% спор за 20 минут. Оптимальная концентрация L-аланина для запуска триггерных механизмов прорастания составляет 50-100 мМ.

Список литературы

1. *Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P.* Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2000. — V. 64. — № 3. — p. 548-572.
2. *Paidhungat M., Setlow P.* Isolation and characterization of mutations in *Bacillus subtilis* that allow spore germination in the novel germinant D-alanine. *Journal of Bacteriology*. — 1999. — V. 181. — № 11. — p. 3341-3350.
3. *Paidhungat M., Setlow P.* Spore germination and outgrowth. *Bacillus Subtilis and its Relatives: From Genes to Cells*. — 2002. — p. 537-548.
4. *Paidhungat M., Setlow B., Driks A., Setlow P.* Characterization of spores of *Bacillus subtilis* which lack dipicolinic acid. *Journal of Bacteriology*. — 2000. — V. 182. — № 19. — p. 5505-5512.
5. *Paidhungat M., Setlow B., Daniels W.B., Hoover D., Papafragkou E., Setlow P.* Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. — 2002. — V. 68. — № 6. — p. — 3172-3175.
6. *Setlow P.* Resistance of bacterial spores *Bacterial Stress Responses*. — 2000. — p. 217-230.
7. *Fisher N., Hanna P.* Characterization of *Bacillus anthracis* Germinant Receptors In Vitro. *J. Bacteriol.* — 2005. — V. 187. — p. 8055-8062.
8. *Setlow P.* Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*. — 2003. — V.6. — № 6. — p. 550-556.
9. *Moir A., Kemp E. H., Robinson C., and Corfe B. M.* The genetic analysis of bacterial spore germination. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* — 1994. — V. 23. — p. 9-16.
10. *Feavers I. M., Foulkes J., Setlow B., Sun D., Nicholson W., Setlow P., and Moir A.* The regulation of transcription of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* — 1990. — V. 4. — p. 275-282.
11. *Corfe B. M., Moir A., Popham D., and Setlow P.* Analysis of the expression and regulation of the *gerB* spore germination operon of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology*. — 1994. — V. 140. — p. 3079-3083.
12. *Clements M. O., and Moir A.* Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants. *J. Bacteriol.* — 1998. — V. 180. — p. 6729-6735.
13. *Paidhungat M., and Setlow P.* Role of *ger* proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* — 2000. — V. 182. — p. 2513-2519.
14. *Barlass P. J., Houston C. W., Clements M. O., and Moir A.* Germination of *Bacillus cereus* spores in response to L-alanine and to inosine: the roles of *gerL* and *gerQ* operons. *Microbiology*. — 2002. — V. 148. — p. 2089-2095.
15. *Ireland J. A., and Hanna P. C.* Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* Sterne endospores: *gerS* mediates responses to aromatic ring structures. *J. Bacteriol.* — 2002. — V. 184. — p. 1296-1303.
16. *Weiner M.A., Read T.D., and Hanna P. C.* Identification and characterization

of the *gerH* operon of *Bacillus anthracis* endospores: a differential role for purine nucleosides in germination. *J. Bacteriol.* — 2003. — V. 185. — p. 1462-1464.

17. *Hornstra L. M., de Vries Y. P., de Vos W. M., Abee T., and Wells-Bennik M. H.* *gerR*, a novel *ger* operon involved in L-alanine- and inosineinitiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — V. 71. — p. 774-781.

18. *Read, T. D., S. N. Peterson, et al.* The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames

and comparison to closely related bacteria. *Nature.* — 2003. — V. 423. — p. 81-86.

19. *Guidi-Rontani C., Weber-Levy M., Labruyere E., and Mock M.* Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol. Microbiol.* — 1999. — V. 31. — p. 9-17.

20. *Ireland, J. A., and Hanna P. C.* Macrophage-enhanced germination of *Bacillus anthracis* endospores requires *gerS*. *Infect. Immun.* — 2002. — V. 70. — p. 5870-5872.

Activation of receptors for *B. anthracis* spore germination

M.U. Ozerov, V.G. Popov, N.N. Karkischenko, D.V. Popov, S.U. Pchelincev,
V.N. Karkischenko

It is generally known, that bacteriophages do not interact with *B. anthracis* spores but able to lyse germinating spores and vegetative cells. Therefore, one of the steps in developing of biological disinfectant against anthrax is selection of the effective spore germinant. We have revealed that L-alanine is the best germinant which assists the germination of more than 90% of spores during the short period. The optimal L-alanine concentration to run trigger mechanisms of germination is 50-100 mM.

Key words: *B. anthracis*, spore germinants, L-alanine