

УДК 581.1,633.358,577.13

НАРИНГЕНИН МОДУЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В ПЛАНКТОННОЙ КУЛЬТУРЕ И БИОПЛЕНКАХ *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

© 2023 г. А. М. Гончарова¹, *, Л. А. Ломоватская¹, А. С. Романенко¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения
Российской академии наук (СИФИБР СО РАН), Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: alvlad87@mail.ru

Поступила в редакцию 17.11.2022 г.

После доработки 30.12.2022 г.

Принята к публикации 09.01.2023 г.

Изучено влияние нарингенина на рост планктонной культуры, плотность биопленок и активность трансмембранной формы аденилатциклазы в клетках *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Исследования показали, что нарингенин практически не влиял на рост планктонной культуры этих бактерий, в то время как плотность биопленок снижалась по мере увеличения концентрации нарингенина. Показано, что в клетках планктонной культуры и в биопленках нарингенин активировал трансмембранную форму аденилатциклазы. Причем в планктонной культуре такое влияние было более выраженным. Предполагается, что активация нарингенином ризобияльной трансмембранной аденилатциклазы осуществляется с помощью рецепторного механизма.

Ключевые слова: нарингенин, цАМФ, аденилатциклаза, биопленка, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

DOI: 10.31857/S0555109923030078, **EDN:** AZRTOB

Известно, что фенольные соединения играют важную роль в жизнедеятельности различных организмов. Одним из таких является нарингенин, относящийся к классу флавононов. У растений это соединение выполняет роль антимикробного агента и антиоксиданта, а также является предшественником катехина [1]. Весьма важная роль принадлежит нарингенину как сигнальной молекуле при взаимодействии бобовых с ризобияльными бактериями. Так, нарингенин из корневых экссудатов гороха (*Pisum sativum*) индуцирует активацию *nod*-генов *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, направленную на синтез ризобияльных Nod-факторов (NF) — специфических молекул хитоолигосахаридной природы, играющих важную роль на начальных этапах бобово-ризобияльного симбиоза [2]. Также в молекулярном диалоге бобовых и ризобий существенное значение имеют сигнальные молекулы бактерий, в частности циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) — продукт функционирования аденилатциклазы и вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы [3]. Кроме хорошо известной роли этого вторичного мессенджера в регуляции генов катаболической репрессии [4], цАМФ ризобий принимает участие в становлении бобово-ризобияльного симбиоза. Показано, что в *Sinorhizobium meliloti* на ранних этапах взаимодействия с *Medicago sativa* дей-

ствует сигнальный регуляторный каскад, состоящий из трех рецепторо-подобных аденилатциклаз, Сгp-регулятора транскрипции и целевого гена. Каскад специфически активируется растительным сигналом в период органогенеза клубенька, а его инактивация приводит к гипернодуляции и абортации инфекционных нитей [5].

При этом остается неясным, может ли нарингенин выступать в роли растительного сигнального индуктора и активатора ризобияльной аденилатциклазы.

Как известно, предпочтительным способом существования бактерий, в том числе ризобий, в окружающей среде являются биопленки, так как именно такая форма организации обеспечивает им большую устойчивость, а также возможность коммуникации и обмен информацией между клетками бактерий, в том числе, при взаимодействии с организмом хозяина [6].

В настоящий момент отсутствуют сведения о влиянии нарингенина на численность *R. leguminosarum* bv. *viciae* в планктонной культуре и плотность формируемых ими биопленок.

Цель настоящей работы — изучение влияния нарингенина на динамику роста планктонной культуры и плотность биопленок, а также активность трансмембранной формы аденилатциклазы

(ТАЦ, КФ 4.6.1.1) и концентрацию цАМФ в клетках *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

МЕТОДИКА

В работе использовали бактерии *R. leguminosarum* bv. *viciae* — эффективный для азотфиксации штамм 1022, полученный из Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (ВКСМ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург, Россия).

Культивирование бактерий. Планктонную культуру бактерий выращивали в термостате при температуре 26°C в конических колбах объемом 100 мл на среде (рН 7.0), содержащей гороховый отвар (30 г сухого гороха/л), глюкозу — 15 г/л и CaCO_3 — 5 г/л. Титр бактерий определяли на планшетном спектрофотометре “АИФР-01 Униплан” (ВНИИ оптико-физических измерений, Москва, Россия) при 655 нм. В качестве контроля при измерении титра бактерий использовали питательную среду аналогичного состава, но без бактерий.

Для исследования использовали бактерии в стационарной фазе роста. Биопленки готовили в чашках Петри с полиэтиленовыми дисками. В чашки Петри вносили по 8 мл планктонной культуры бактерий с титром 0.3×10^8 кл./мл и культивировали на среде с гороховым отваром в течение 3 сут при 27°C. Затем среду удаляли, добавляли 8 мл такой же чистой среды и продолжали культивирование в тех же условиях еще в течение 3 сут. Для определения плотности биопленки среду удаляли, фиксировали 96%-ным этиловым спиртом на полиэтиленовом диске и окрашивали 0.1%-ным кристаллическим фиолетовым и трижды промывали дистиллированной водой. Далее добавляли 2 мл воды, инкубировали в течение 2 мин и измеряли интенсивность окраски полученного раствора на спектрофотометре при 495 нм. Плотность биопленки была пропорциональна интенсивности окраски раствора [7].

Нарингенин (“Sigma-Alcorich” США), растворенный в минимальном объеме метанола, добавляли в среду культивирования бактерий после автоклавирования. Использовали нарингенин в следующих конечных концентрациях: 500 пМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ. Контролем служила культура бактерий, выращенная без добавления нарингенина. Предварительные эксперименты показали, что сам по себе метанол в концентрации 10 мкл/30 мл среды не оказывал влияния на рост бактерий. Для искусственного снижения уровня цАМФ в клетках бактерий использовали сурамин — ингибитор трансмембранной аденилатциклазы. В работе 500 мкМ сурамина добавляли к среде, в

которой выращивали планктонную культуру и культивировали 5 сут. В отдельных экспериментах сурамин добавляли в среду вместе с нарингенином.

Определение активности трансмембранной аденилатциклазы и концентрации цАМФ. Активность ТАЦ определяли в мембранной фракции бактериальных клеток, как планктонной культуры, так и в биопленках, не фиксированных спиртом по методу, описанному в работе [8], и выражали в наномолях цАМФ/мг белка в мин.

Содержание цАМФ определяли методом иммуноферментного анализа в супернатанте, полученном в результате центрифугирования при 10500 g гомогената клеток бактерий отмытых и разрушенных на ультразвуковом соникаторе “Branson Ultrasonic corp” (США) [8]. Белок определяли по методу Брэдфорда [9].

Эксперименты проводили в трех биологических повторностях. При определении титра бактерий и плотности биопленок использовали восемь аналитических повторностей. В экспериментах по изучению активности компонентов аденилатциклазной сигнальной системы бактерий учитывали десять аналитических повторностей для каждой биологической. Для статистической обработки результатов использовали программу Sigma-Plot, с помощью которой вычисляли среднее арифметическое значение и среднее квадратическое отклонение. Достоверность различий между значениями вычисляли по критерию Дункана, критерию Даннета и двухвыборочному t-критерию Стьюдента при $P \leq 0.05$. На графиках приведены средние значения и среднее квадратическое отклонение. Достоверно различающиеся значения на графиках отмечены звездочками.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние нарингенина на динамику роста планктонной культуры и плотность биопленок *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Для исследования влияния нарингенина на рост планктонной культуры и биопленок использовали несколько концентраций нарингенина: 500 пМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ. Все испытанные концентрации почти не оказывали влияния на рост планктонной культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae* в течение 4 сут эксперимента, на пятые сут плотность ризобияльной культуры снижалась на 40–50% по сравнению с контролем (рис. 1).

В то же время на формирование биопленок нарингенин оказывал другой эффект: их плотность возрастала под действием самой низкой из испытанных концентраций, 500 пМ, но с увеличением концентрации этого соединения наблюдалось снижение плотности биопленок (рис. 2).

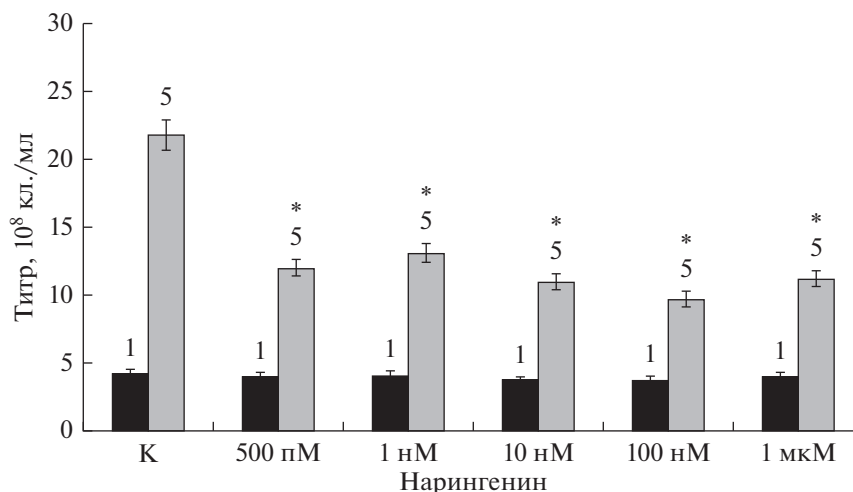


Рис. 1. Влияние нарингенина на рост планктонной культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae*: 1 – первые сут роста бактерий, 5 – 5 сут роста бактерий. Контроль (К) – планктонная культура без добавления нарингенина. *Различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) при сравнении вариантов опыта с нарингенином с контролем по критерию Стьюдента. Различия вариантов опыта с различными концентрациями нарингенина между собой по критерию Дункана ($P \leq 0.05$) статистически не значимы. ($n = 3$, $m \pm S.E$).

По данным литературы, нарингенин метаболизируется *R. leguminosarum* bv. *viciae* с образованием флороглюцина, *n*-кумаровой кислоты и *n*-гидроксibenзойной кислот [10]. Так как действующая концентрация нарингенина как сигнальной молекулы была мала, то содержание продуктов его метаболизма также было низким и не могло оказывать токсическое воздействие на бактерии.

Влияние нарингенина на активность аденилатциклазы и концентрацию цАМФ в планктонной культуре и биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Исследования показали, что уровень эндогенного цАМФ бактерий в планктонной культуре в стационарной стадии роста и в зрелых биопленках существенно различался, в последнем варианте концентрация этой сигнальной молекулы была в 4 раза ниже по сравнению с планктонной культурой (табл. 1). Добавление различных концентраций нарингенина к планктонной культуре и биопленкам приводило к повышению уровня эндогенного цАМФ (табл. 1).

Для изучения влияния нарингенина на активность тАЦ в планктонной культуре и биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae* использовали как самую низкую, 500 пМ, так и самую высокую – 1 мкМ концентрации нарингенина. Обе концентрации нарингенина активировали тАЦ как в клетках планктонной культуры, так и в биопленках. Однако в планктонной культуре такое влияние было более выраженным (рис. 3).

Для проверки гипотезы о лиганд-рецепторном механизме активации тАЦ нарингенином к планктонной культуре добавляли 500 мкМ сурамина [11]. Известно, что активация тАЦ от мембранных рецепторов происходит с участием

ГТФ-связывающих белков (G-белков). Сурамин разобщает связь мембранного рецептора с G-белком, таким образом ингибируя активность тАЦ [12].

Культивирование планктонной культуры бактерий с сурамином в течение 5 сут снижало активность этого фермента более чем на 70% (рис. 4). Однако инкубация с сурамином и 1 мкМ нарингенина также в течение 5 сут повышала активность тАЦ до 250% от контроля (рис. 4).

Растительно-бактериальный азотфиксирующий симбиоз начинается с обмена сигналами

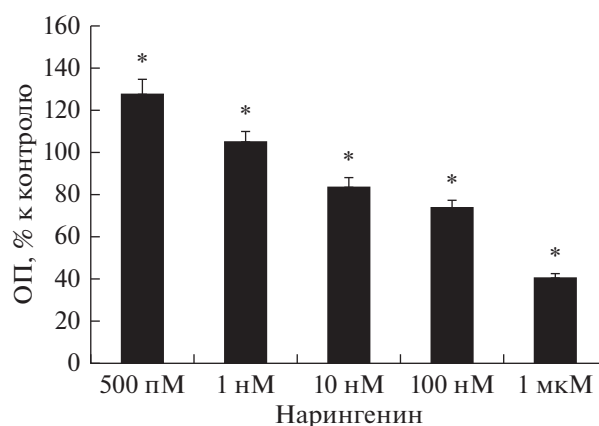


Рис. 2. Влияние нарингенина на плотность биопленок *R. leguminosarum* bv. *viciae* (оптическая плотность (ОП), % к контролю.). Контролем служили биопленки без добавления нарингенина. *Различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) при сравнении между собой вариантов опыта с различными концентрациями нарингенина по критерию Дункана. $n = 3$, $m \pm S.E$.

Таблица 1. Влияние нарингенина на концентрацию цАМФ в клетках *R. leguminosarum* bv. *viciae*

Нарингенин, концентрация	Формы организации бактерий			
	планктонная культура		биопленка	
	цАМФ, нМ/мг белка	% к контролю	цАМФ, нМ/мг белка	% к контролю
Контроль	23 ± 2.1	100	5.5 ± 0.9	100
500 пМ	38* ± 3.4	165	12.2* ± 1.2	222
1 нМ	45* ± 4.3	196	12.5* ± 1.2	227
10 нМ	50* ± 5.1	217	13* ± 1.2	236
100 нМ	73* ± 7.2	317	17.5* ± 1.8	318
1 мкМ	100* ± 9.6	435	19* ± 1.7	345

* Различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) по критерию Даннета при сравнении экспериментов с внесением всех концентраций нарингенина с контролем без нарингенина, $n = 3$, $m \pm S.E.$

между макро- и микросимбионтом. На ранних этапах взаимодействия растения выделяют в ризосферу флавоноиды, один из которых, нарингенин, необходим для индукции транскрипции генов ключевых факторов образования клубеньков у бактерий рода *Rhizobium* – Nod-факторов [13, 14]. Nod-факторы запускают комплекс специфических ответов в эпидерме, перицикле и коре корня растения, тем самым обеспечивая основу для последующего проникновения ризобий в клетки растений, развития инфекции и морфогенеза клубеньков [15].

Следует отметить, что в литературе нет однозначного мнения об оптимальных действующих концентрациях нарингенина. По некоторым дан-

ным, на индукцию *nod*-генов и рост культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae* наибольший активирующий эффект оказывает нарингенин в концентрации 0.5 мкМ [16]. В тоже время, по данным других авторов, различная степень активации этих же генов достигается в диапазоне концентраций нарингенина 2.5–100 нМ [17]. Экзогенный нарингенин в концентрации от 2 до 4 мМ стимулировал скручивание корневых волосков и увеличивал количество образовавшихся клубеньков у гороха. При добавлении 40 мМ нарингенина образование клубеньков ингибировалось [16, 18]. Одной из причин такого разброса данных могла служить способность нарингенина в значительных количествах накапливаться в цитоплазматической мембране *R. leguminosarum* bv. *viciae*, таким образом достигая необходимой эффективной концентрации [17]. В проведенных экспериментах все концентрации нарингенина (500 пМ–1 мкМ) почти не оказывали влияния на численность бактерий в планктонной культуре. Снижение титра *R. leguminosarum* bv. *viciae* на 5 сут, вероятно, связано с влиянием про-

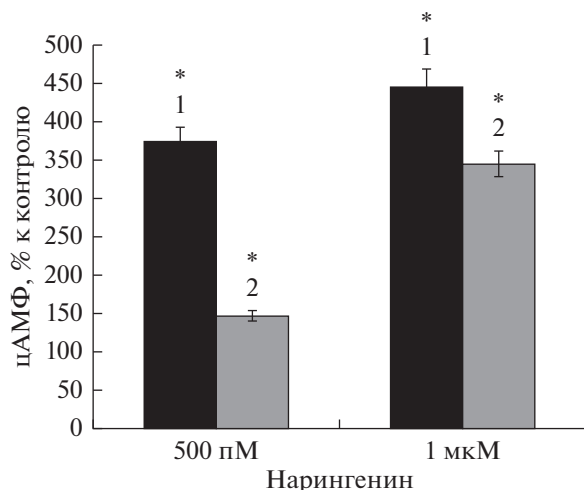


Рис. 3. Влияние нарингенина на активность тАЦ (цАМФ, % к контролю) в клетках планктонной культуры (1) и биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae* (2). Контролем служили планктонная культура/биопленки без добавления нарингенина. $n = 3$, $m \pm S.E.$ *Различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) по двухвыборочному *t*-критерию Стьюдента при сравнении между собой вариантов опыта: с планктонной культурой и биопленкой.

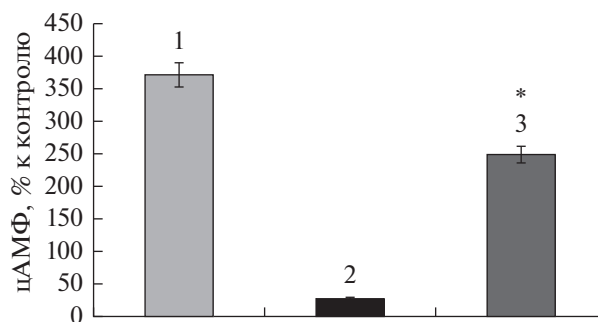


Рис. 4. Влияние нарингенина (1, 1 мкМ) и сурамина (2, 500 мкМ) и их смеси (3) на активность тАЦ (цАМФ, % к контролю) планктонной культуры *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Контролем служила планктонная культура без добавок. *Различия статистически значимы ($P \leq 0.05$) при сравнении вариантов 2 и 3 по *t*-критерию Стьюдента; $n = 3$, $m \pm S.E.$

дуктов распада нарингенина (рис. 1). В тоже время в биопленках самая низкая концентрация нарингенина (500 пМ) оказывала стимулирующий эффект, в результате чего повышалась плотность пленки, а высокая концентрация существенно снижала ее (рис. 2). Такое воздействие представляется вполне логичным, поскольку эффективность нарингенина как сигнальной молекулы, по-видимому, проявлялось уже в низких концентрациях.

Известно, что рост бактерий как в планктонной культуре, так и в биопленках регулируется различными аутоиндукторами [17]. Но кроме них, важная роль в развитии бактериального сообщества принадлежит и сигнальным молекулам, в том числе цАМФ [20, 21]. Судя по полученным данным, планктонная культура и биопленки значительно различались по концентрации эндогенного цАМФ и нарингенин оказывал определенное влияние на этот показатель. При этом в планктонной культуре под воздействием нарингенина уровень цАМФ возрастал, однако титр практически не менялся, тогда как в биопленках при увеличении концентрации нарингенина их плотность снижалась, а уровень цАМФ возрастал. Это подтверждает существование особенностей воздействия цАМФ на бактерии в различных формах культивирования [22]. Вероятно, нарушение оптимальной концентрации эндогенного цАМФ в биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae*, но не в планктонной культуре, оказывало негативный эффект на их плотность. Это подтверждается данными о влиянии цАМФ на синтез экзополисахаридов бактерий. Эти метаболиты являются неотъемлемой частью матрикса биопленок и нарушение их синтеза отрицательно сказывается на их формировании: цАМФ через ряд каскадных реакций оказывает влияние на индукцию генов *LuxS-AI*-синтазы, отвечающей за синтез аутоиндуктора — 2-диэфирифурозил-бората и гена *pssA*, кодирующего глюкозил-изопренилфосфаттрансферазу, участвующую в синтезе экзополисахаридов (ЭПС) и в формировании биопленок [20]. Особенно важна роль биопленок на ранних этапах взаимодействия с растениями, потому что в этой форме бактерии более эффективно могут избежать негативного влияния растительных метаболитов, в то же время повышается активность факторов вирулентности [23]. При этом показано, что переход обратимого прикрепления бактерий к необратимому за счет снижения гидрофобности клеток также связан с концентрацией эндогенного цАМФ [23].

Поскольку нарингенин активировал тАЦ, а сурамин, разобщающий связь рецептора с G-белком, ингибировал ее активность, можно предположить, что тАЦ может быть одним из компонентов рецептора к нарингенину у бактерий. Подтверждением этому могут служить данные литературы о том, что у *Sinorhizobium meliloti* при контакте с *Medicago sativa* активируются три рецептороподобные адени-

латциклазы, регулятор транскрипции и целевой ген [5]. Можно предположить, что у бактерий, так же как и у растений [24], тАЦ функционирует в виде многофункциональных молекулярных комплексов, в состав которых входит и рецепторный домен. Несмотря на то, что результаты по ингибированию/активации тАЦ были получены на планктонной культуре, можно считать, что такой же механизм функционирует и в биопленках, поскольку ранее его присутствие также было показано и в биопленках ризобий [25].

Таким образом, можно сделать вывод, что нарингенин через активацию рецептора способен стимулировать ризобияльную тАЦ и, соответственно, влиять на цАМФ-зависимые процессы в биопленках *R. leguminosarum* bv. *viciae*, что расширяет и углубляет современные представления о взаимодействиях между бобовыми и *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вейко А.Г. // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2020. Т. 19. № 5. С. 27–39.
2. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 3–14.
3. Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Рыкун О.В. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 4. С. 404–404.
4. Green J., Stapleton M.R., Smith L.J., Artymiuk P.J., Kahramanoglou C., Hunt D.M., Buxton R.S. // Microbiology. 2014. V. 18. P. 1–7.
5. Tian C.F., Garnerone A.M., Mathieu–Demazière C., Masson–Boivin C., Batut J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 17. P. 6751–6756.
6. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. // Annual Rev. Microbiol. 2002. V. 56. № 1. P. 187–209.
7. Плакунов В.К., Журина М.В., Беляев С.С. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 5. С. 581–589.
8. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. № 1. P. 125–132.
9. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
10. Rao J.R., Cooper J.E. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. № 17. P. 5409–5413.
11. Деркач К.В., Шнаков А.О., Кузнецова Л.А., Плеснева С.А., Успенская З.И., Перцева М.Н. // Цитология. 2002. Т. 44. С. 1129–1133.
12. Dessauer C.W. // Trends Pharmacol. Sci. 1999. V. 20. № 5. P. 205–210.
13. Bundles A.N.V. // Biology of the Rhizobiaceae: International Review Cytology. V. 13. 2013. P. 247.
14. Meneses N., Taboada H., Dunn M.F., Vargas M.D.C., Buchs N., Heller M., Encarnación S. // Archives Microbiol. 2017. V. 199. № 5. P. 737–755.
15. Овцына А.О., Тихонович И.А. // Экологическая генетика. 2004. Т. 2. № 3. С. 14–24.
16. Tsvetkova G., Teofilova T., Georgiev G.I. // Gen. Appl. Plant Physiol. 2006. Special is. P. 67–71.

17. Recourt K., Van Brussel A.A., Driessen A.J., Lugtenberg B.J. // J. Bacteriol. 1989. V. 171. № 8. P. 4370–4377.
18. Novak K., Chovanec P., Škrdleta V., Kropáčová M., Lisá L., Němcová M. // J. Exper. Bot. 2002. V. 53. № 375. P. 1735–1745.
19. Fuqua W.C., Parsec M.R., Greenberg E.P. // Annu. Rev. Gen. 2001. V. 35. P. 439–468.
20. Ono K., Oka R., Toyofuku M., Sakaguchi A., Hamada M., Yoshida S., Nomura N. // Microbes Environ. 2014. V. 29. № 1. P. 104–106.
21. Lory S., Wolfgang M., Lee V., Smith R. // International J. Medical Microbiology. 2004. V. 293. № 7–8. P. 479–482.
22. Waters C.M., Bassler B.L. // Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 2005. V. 21. № 1. P. 319–346.
23. Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Kuzakova O.V. // Yale Review Edification Sci. 2015. V. 6. P. 522–539.
24. Al-Younis I., Moosa B., Kwiatkowski M., Jaworski K., Wong A., Gehring C. // Frontiers Plant Science. 2021. P. 1709.
25. Ломоватская Л.А., Гончарова А.М., Макарова Л.Е., Филинова Н.В., Романенко А.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 313–319.

Naringenin Modulates Adenylate Cyclase Activity in Planktonic Culture and Biofilm *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

A. M. Goncharova^a, *, L. A. Lomovatskaya^a, and A. S. Romanenko^a

^a Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (SIFIBR SB RAS), Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: alvlad87@mail.ru

The effect of naringenin on the growth of plankton culture, biofilm density, and activity of the transmembrane form of adenylate cyclase in the cells of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* has been studied. The studies performed showed that naringenin had practically no effect on the growth of the planktonic culture of these bacteria, while the density of biofilms decreased as the concentration of naringenin increased. It was shown that naringenin activated the transmembrane form of adenylate cyclase in planktonic culture cells and biofilms. Moreover, in the planktonic culture, this effect was more significant. It is assumed that the activation of rhizobial transmembrane adenylate cyclase by naringenin is carried out using a receptor mechanism.

Keywords: naringenin, cAMP, adenylate cyclase, biofilm, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*