

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.121.9

**МЕТИЛИРОВАНИЕ КОПРОПОРФИРИНА КАК МЕХАНИЗМ ЗАЩИТЫ  
МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЯХ**

Дарья Игорьевна Багаева<sup>1</sup>, Галина Рудольфовна Демина<sup>1</sup>, Михаил Олегович Агафонов<sup>1</sup>, Александр Павлович Савицкий<sup>1</sup>, Арсений Сумбатович Капрельянц<sup>1</sup>, Маргарита Олеговна Шлеева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

**Автор, ответственный за переписку:** Дарья Игорьевна Багаева, [bagaeva115@mail.ru](mailto:bagaeva115@mail.ru)

**Аннотация.** Переход активных клеток *Mycolicibacterium smegmatis* в покоящееся состояние в условиях закисления среды сопровождается внутриклеточным накоплением тетраметилового эфира копропорфирина (ТМК). При этом покоящиеся формы микобактерий развивают устойчивость к ряду повреждающих факторов. Введение в среду культивирования бактерий 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), предшественника синтеза порфиринов, приводит к накоплению ТМК в активно растущих клетках, что моделирует ситуацию с покоящимися микобактериями. При увеличении концентрации ТМК в 3 раза бактерии становятся в 7 раз устойчивее к действию 40 мМ пероксида водорода и в 90 раз устойчивее к нагреванию до 80 °С. В то же время в клетках *M. smegmatis* с увеличенным содержанием ТМК на 18% снижается активность дихлорфенолиндофенол редуктазы – маркера активности дыхательной цепи. Обнаруженное ингибирование активности может приводить к снижению побочных окислительных реакций в клетке. Таким образом, накопление метилированного копропорфирина, возможно, является одним из механизмов развития резистентности микобактерий в покое.

**Ключевые слова:** микобактерии, тетраметиловый эфир копропорфирина, окислительный стресс, 5-аминолевулиновая кислота

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-2-121-127

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 19-15-00324).

**Для цитирования:** Багаева Д.И., Демина Г.Р., Агафонов М.О., Савицкий А.П., Капрельянц А.С., Шлеева М.О. Метилирование копропорфирина как механизм защиты микобактерий при неблагоприятных условиях // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 65. № 2. С. 121–127.

## ORIGINAL ARTICLE

**METHYLATION OF COPROPORPHYRIN AS A PROTECTIVE MECHANISM IN MYCOBACTERIA UNDER ADVERSE CONDITIONS****Daria I. Bagaeva<sup>1</sup>, Galina R. Demina<sup>1</sup>, Mikhail O. Agaphonov<sup>1</sup>, Alexander P. Savitsky<sup>1</sup>, Arseny S. Kaprelyants<sup>1</sup>, Margarita O. Shleeva<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation**Corresponding author:** Daria I. Bagaeva, bagaeva115@mail.ru

**Abstract.** The transition of active *Mycobacterium smegmatis* cells to a dormant state under acidification conditions is associated with intracellular accumulation of coproporphyrin tetramethyl ether (TMC). At the same time, dormant forms of mycobacteria develop resistance to a number of damaging factors. The addition of 5-aminolevulinic acid (ALA), a precursor of porphyrin synthesis, into the bacterial culture medium leads to the accumulation of TMC in actively growing cells, that simulates the situation with dormant mycobacteria. With an increase in the concentration of TMC by 3 times, the bacteria become 7 times more resistant to the action of 40 mM hydrogen peroxide and 90 times more resistant to heating up to 80 °C. At the same time, in *M. smegmatis* cells with an increased content of TMC, the activity of dichlorophenolindophenol reductase, which is a marker of respiratory chain activity, decreases by 18%. The detected inhibition of activity can lead to a decrease in side oxidative reactions in the cell. Thus, the accumulation of methylated coproporphyrin is possible to be one of the mechanisms for the development of mycobacterium resistance at dormancy.

**Keywords:** mycobacteria, tetramethyl ether of coproporphyrin, oxidative stress, 5-aminolevulinic acid

**Financial support:** The work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 19-15-00324).

**For citation:** Bagaeva D.I., Demina G.R., Agaphonov M.O., Savitsky A.P., Kaprelyants A.S., Shleeva M.O. Methylation of coproporphyrin as a protective mechanism in mycobacteria under adverse conditions // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 2. S. 121–127.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), туберкулез остается одной из лидирующих причин смерти от инфекции одним патогеном, уступая только коронавирусной инфекции [1]. Его возбудитель, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), может годами оставаться в покое в организме и сохраняться в организме без каких-либо признаков заболевания, при этом многие люди становятся бессимптомными носителями туберкулеза [2]. Согласно отчету ВОЗ за 2022 г. [3], около четверти населения мира (2 млрд) латентно инфицированы *Mtb*, в 5–10% этих случаев инфекция переходит в активную фазу [4]. Изучение физиологии и биохимии покоящихся микобактерий имеет первостепенное значение для понимания механизмов, лежащих в основе покоя и персистенции *Mtb*, а также развития латентного туберкулеза.

Настоящая работа опирается на исследование перехода в состояние покоя близкого гене-

тического родственника возбудителя туберкулеза – *Mycobacterium* (базонум: *Mycobacterium*) *smegmatis*, имеющего более 2000 гомологичных генов с *Mtb* и ту же специфическую структуру клеточной стенки. Ранее было установлено, что при переходе *M. smegmatis* в состояние покоя происходит активный синтез копропорфирина III, уропорфирина III и их метиловых эфиров [5]. Мы предположили, что накопление этих пигментов способствует устойчивости покоящихся клеток микобактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды, а обнаружение гидрофобной, полностью метилированной формы порфирина у покоящихся микобактерий означает наличие специфической реакции метилирования, происходящей при переходе в состояние покоя.

Порфирины представляют собой уникальный структурный класс соединений, выполняющих множество функций в природе, начиная от

транспорта кислорода и переноса электронов до метаногенеза и фотосинтеза. В медицине порфирины часто используют в качестве препаратов для фотодинамической терапии. В настоящее время хорошо известна их роль в возникновении таких заболеваний, как малярия, порфирия и различные нервно-психические расстройства [6]. Комплексы порфиринов с металлами обладают широким спектром антиоксидантных свойств [7].

Как известно, микобактерии, попадая в организм хозяина, подвергаются множеству различных стрессов, в том числе воздействию сниженных значений pH внутри макрофагов и активных форм кислорода [8, 9]. В связи с этим мы оценили жизнеспособность бактериальных клеток с повышенным содержанием ТМК как в условиях окислительного стресса, так и при повышенных температурах в процессе роста в слабокислой (pH 6,0) среде.

### Экспериментальная часть

#### **Бактериальные штаммы, питательные среды и условия культивирования**

В работе использовали штамм *Mycolicibacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. Первоначально инокулят засеивали со стока, хранившегося при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  в 40%-м глицерине. Клетки выращивали в течение ночи в мясо-пептонном бульоне (МПБ) («HiMedia», Индия) с добавлением 0,05% Твин-80 («NeoFroxx», Германия). К 200 мл среды Миддлбрук («HiMedia», Индия) или Сотона (pH 6,0) [10], добавляли 1% исходной культуры и растили в течение 48 ч при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  с перемешиванием (200 об/мин). Для стимулирования синтеза порфиринов образцы культивировали с добавлением 5 мМ 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) («ABCR», Германия).

#### **Экстракция порфиринов**

Порфирины экстрагировали по методу Блая и Дайера [11]. К каждому образцу (500 мкл) добавляли 625 мкл хлороформа и 1,25 мл метанола (в присутствии 0,1%-й муравьиной кислоты). Для расслоения фаз к каждой смеси добавляли 1 часть хлороформа (625 мкл) и 1 часть воды (625 мкл), перемешивали и отбирали гидрофобную хлороформную фазу.

#### **ВЭЖХ-анализ порфиринов**

Образцы анализировали с использованием систем ВЭЖХ Стайер-М («Аквион», Россия) со спектрофотометрическим детектором (длина волны детектирования 400 нм) на обратно-фазовой колонке C18 (5 мкм, 250×4,6 мм) («Cosmosil»,

Япония) в градиенте ацетонитрила 30–100% в воде в присутствии 0,1%-й трифторуксусной кислоты (скорость потока 1 мл/мин). Объем пробы составлял 20 мкл.

#### **Активность дыхательной цепи**

Активность дыхательной цепи определяли спектрофотометрически (при длине волны 600 нм) по восстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДФИ) («AppliChem», Германия) в присутствии менадиона («Sigma», США). К 1 мл суспензии клеток ( $\text{ОП}_{600} = 1$ ) добавляли 0,05 мкмоль ДФИ и 0,15 мкмоль менадиона.

#### **Оценка чувствительности к повышенным температурам**

Термоустойчивость определяли подсчетом числа колониеобразующих единиц (КОЕ, кл/мл) после прогревания клеточных суспензий (1 мл) в термостате при температурах 50 и  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин. Бактериальные суспензии серийно разбавляли свежей средой Сотона, а затем в трех повторностях по 10 мкл каждого разведения наносили на агаризованную питательную среду МПБ. Затем инкубировали при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 3 дней, после чего подсчитывали КОЕ. Предел обнаружения КОЕ составляет 10 кл/мл.

#### **Оценка чувствительности к пероксиду водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

Чувствительность к  $\text{H}_2\text{O}_2$  определяли подсчетом КОЕ (как в вышеописанной методике) после добавления к клеточным суспензиям 20 и 40 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### Результаты и обсуждение

Для выяснения физиологического влияния метилированных копропорфиринов на метаболизм микобактерий и их устойчивость к повреждающим внешним факторам были подобраны условия, при которых происходило значительное накопление ТМК в вегетативных клетках *M. smegmatis* таким образом, что концентрация ТМК в них приблизилась к концентрации ТМК в покоящихся клетках. Для этого в культуру вносили 5 мМ АЛК – известного предшественника синтеза порфиринов в живой клетке. В процессе роста клеток в присутствии АЛК было выявлено образование значительного количества вещества (время выхода на хроматограмме 15 мин), поглощающего в области 400 нм (соответствует полосе Сорэ в спектре поглощения порфиринов) (рис. 1, А, Б). По данным спектра МАЛДИ, для этого вещества получен сигнал со

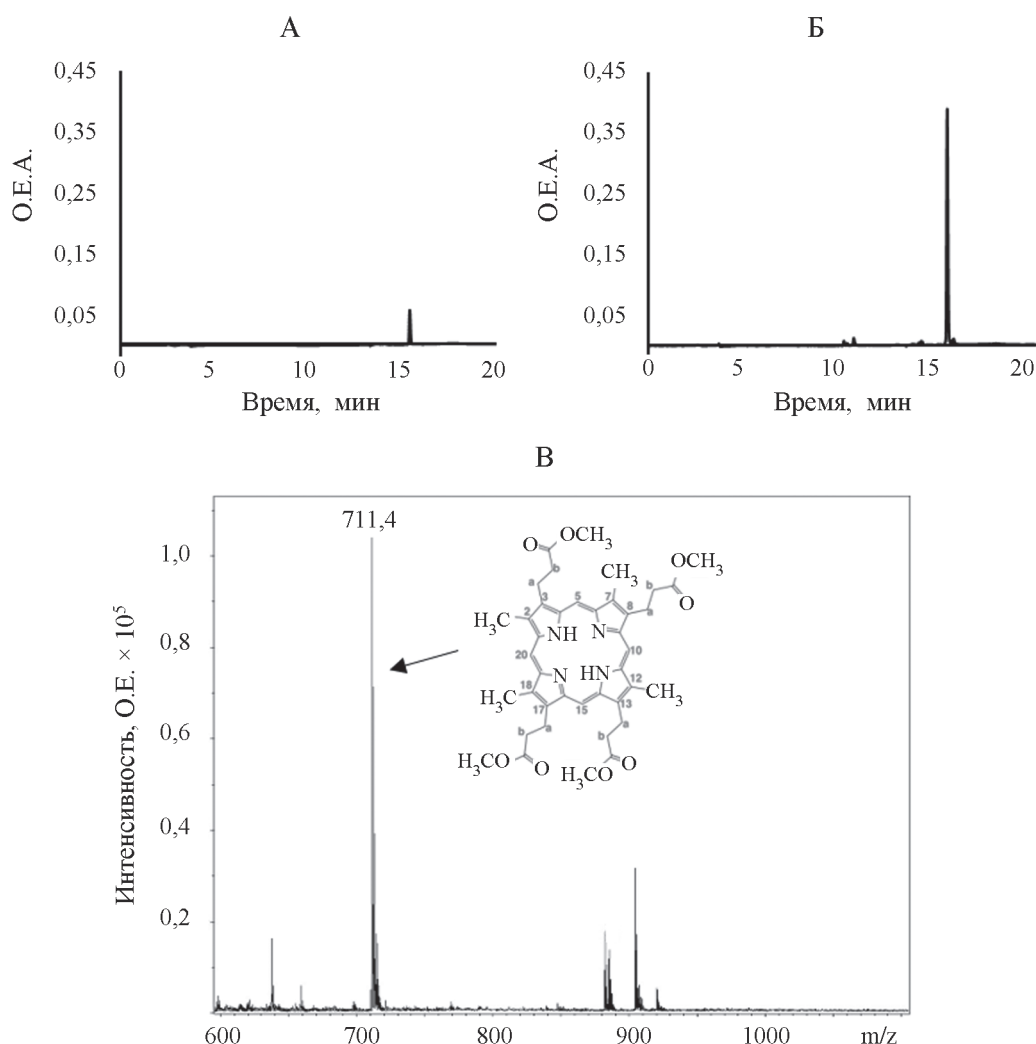


Рис. 1. Хроматограммы хлороформ-метанольных экстрактов из клеток *M. smegmatis*, выращенных в течение 48 ч без АЛК (А), в присутствии 5 мМ АЛК (Б) и спектр МАЛДИ вещества с временем выхода 15 мин (В)

значением 711,5 m/z (рис. 1, В), который соответствует тетраметилловому эфиру копропорфирина. Накопление ТМК увеличивалось через 48 ч роста в присутствии АЛК на разных средах (от 3 до 8 раз) по сравнению с количеством ТМК в клетках, выращенных без АЛК.

Мы оценили устойчивость бактерий с разным содержанием ТМК к окислительному стрессу и тепловому шоку. Для моделирования этого процесса был использован пероксид водорода – один из факторов, с которыми сталкивается микобактерия при попадании в организм хозяина [12–14]. Для этого двухсуточные суспензии бактериальных клеток с разным количеством внутриклеточного ТМК инкубировали при комнатной температуре с 20 и 40 мМ пероксида водорода и периодически высевали на плотную питательную среду МПБ для оценки жизнеспособности бактерий.

Воздействие 20 мМ пероксида водорода приводило к снижению количества жизнеспособных бактерий в контроле в 30 раз на седьмые сутки по сравнению с начальной точкой (с  $5,00 \cdot 10^8 \pm 1,5 \cdot 10^8$  кл/мл до  $1,67 \cdot 10^7 \pm 1,15 \cdot 10^7$  кл/мл), в то время как бактерии с повышенным содержанием ТМК демонстрировали большую устойчивость (жизнеспособность снижалась в 4 раза с  $8,67 \cdot 10^8 \pm 2,0 \cdot 10^8$  до  $2,0 \cdot 10^8 \pm 5,77 \cdot 10^7$  кл/мл). Воздействие 40 мМ пероксида водорода на контрольные клетки *M. smegmatis* привело к снижению жизнеспособности за тот же период времени (7 сут.) в 3760 раз (с  $5,00 \cdot 10^8 \pm 1,5 \cdot 10^8$  до  $1,33 \cdot 10^5 \pm 7,10 \cdot 10^4$  кл/мл), а в случае бактерий с увеличенной концентрацией ТМК жизнеспособность снизилась в 520 раз (с  $8,67 \cdot 10^8 \pm 2,0 \cdot 10^8$  до  $1,67 \cdot 10^6 \pm 1,15 \cdot 10^6$  кл/мл) (рис. 2, А). Добавление 40 мМ  $H_2O_2$  в начальный момент эксперимента привело к уменьшению

жизнеспособности бактерий в 2 раза (с  $5,0 \cdot 10^8$  до  $2,33 \cdot 10^8$  кл/мл) для *M. smegmatis*, выращенных без АЛК, при этом в этом случае не наблюдалось изменения числа жизнеспособных клеток штамма с повышенным содержанием ТМК.

Было также оценено влияние повышенной температуры на выживаемость бактерий с разным содержанием ТМК. Бактериальные суспензии подвергали нагреванию при 50 и 80 °С в течение 10 мин и высевали на плотную питательную среду для дальнейшего подсчета КОЕ. Анализ не выявил изменений в КОЕ при 50 °С по сравнению с контролем ( $1,33 \cdot 10^8$  кл/мл для контроля и  $7,67 \cdot 10^8$  кл/мл для клеток с увеличенным содержанием ТМК). При повышении температуры до 80 °С наблюдали существенное снижение КОЕ (в 13 000 раз) клеток, выращенных без АЛК, в то время как клетки с АЛК были более устойчивы к действию этой температуры.

В этом случае КОЕ снизилось только в 143 раза – до  $5,33 \cdot 10^6$  кл/мл (рис. 2, Б).

Таким образом, данные эксперименты продемонстрировали связь между содержанием ТМК и устойчивостью микобактерий к повреждающим факторам.

Поскольку наличие метиловых остатков на карбоксильных группах копропорфирина придает этому соединению гидрофобные свойства, ранее мы предположили, что ТМК накапливается в мембране микобактерий и таким образом участвует в стабилизации и защите компонентов мембран [5]. Известно, что порфирины благодаря своей структуре могут выступать в роли антиоксидантов, нейтрализуя свободные радикалы, и поддерживать баланс антиоксидантной защиты в организме [15]. Таким образом, порфирины могут играть важную роль в поддержании жизнеспособности бактериальных клеток.

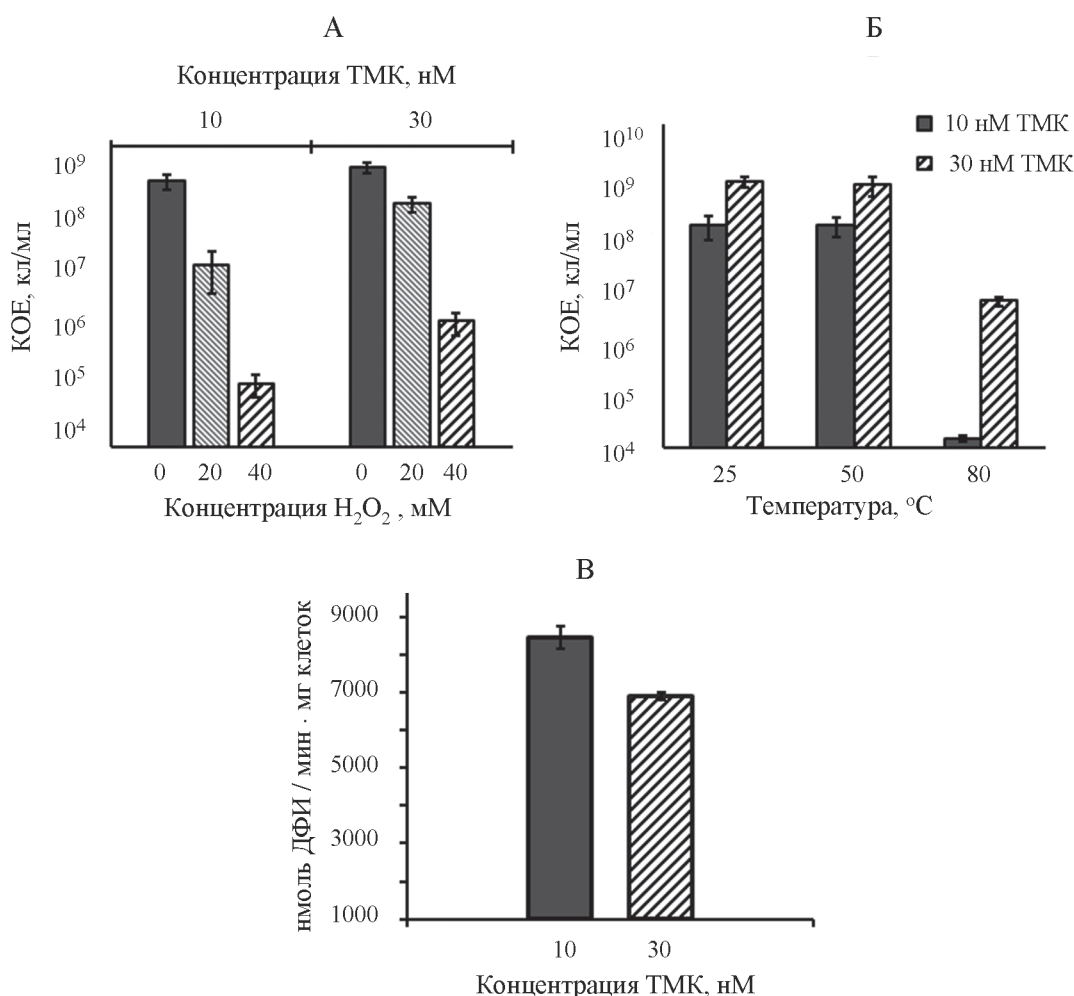


Рис. 2. Устойчивость клеток *M. smegmatis* (48 ч роста) к воздействию пероксида водорода (А) и повышенных температур (Б) и дыхательная активность ДФИ редуктазы этих клеток (В) в зависимости от различных концентраций эндогенного ТМК

С другой стороны, хорошо известно, что в развитии окислительного стресса в живой клетке может принимать участие дыхательная цепь, особенно в условиях дисбаланса в отдельных звеньях метаболизма, которые имеют место при переходе микобактериальной клетки в покой [16]. Для выяснения состояния дыхательной цепи в условиях накопления ТМК в вегетативных клетках, дыхательную активность определяли спектрофотометрически по восстановлению искусственного акцептора электронов ДФИ. В результате было выявлено достоверное снижение активности ДФИ редуктазы на 18% на вторые сутки роста у клеток с увеличенной концентрацией ТМК по сравнению с контролем (рис. 2, В).

Полученные данные позволяют сделать вывод о роли эндогенного накопления метилированного копропорфирина. С одной стороны, имея гидрофобную природу, ТМК может встраиваться в мембраны бактерий и замедлять работу функционирующих в них активных процессов, например активность дыхательной цепи, что важно для замедления метаболизма в условиях стресса и подавления окислительных процессов. С другой стороны, сами порфирины, особенно их комплексы с металлами, могут выполнять защитные функции, в частности, выступать в роли антиоксидантов [17]. Действительно, в покоящихся клетках *M. smegmatis* выявлен сигнал Zn-порфирина [18], что может повышать успешность выживания бактерий в условиях окислительного стресса.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shahinda S.R. Alsayed, Gunosewoyo H. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. N 6. P. 5202.
- Flynn Jo Anne L., Chan John. // Infect. Immun. 2001. Vol. 69. N 7. P. 4195.
- Global Tuberculosis Report 2022. WHO: Geneva, Switzerland. 2022 (<https://www.who.int/publications/item/>).
- Selwyn P.A., Hartel D., Lewis V.A. Schoenbaum E.E., Vermund S.H., Klein R.S., Walker A.T., Friedland G.H. // N Engl J Med. 1989. Vol. 320. N 9. P. 545.
- Nikitushkin V.D., Shleeva M.O., Zinin A.I., Trutneva K.A., Ostrovsky D.N., Kaprelyants A.S. // FEMS Microbiol Lett. 2016. Vol. 363. P. 206.
- Mathias O. Senge, Natalia N. S., Karl J. Hale. // Chem. Soc. Rev. 2021. Vol. 50. P. 4730.
- Day B.J., Batinic-Haberle I., Crapo J.D. // Free. Radic. Biol. Med. 1999. Vol. 26. P. 730.
- Ehrt S., Schnappinger D. // Cell Microbiol. 2009. Vol. 11. N 8. P. 1170.
- Gupta S., Chatterji D. IUBMB Life. 2005. Vol. 57. N 3. P. 149.
- Кудыкина Ю.К., Шлеева М.О., Арцатбанов В.Ю., Сюзина Н.Е., Капрельянц А.С. // Микробиология. 2011. Т. 80. N 5. С. 625.
- Bligh E.G., Dyer W.J. // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. Vol. 37. N 8. P. 911.
- Li X., Tao J., Han J., Hu X., Chen Y., Deng H., Zhang G., Hu X., Mi K. // Protein Cell. 2014. Vol. 5. N 3. P. 182.
- Ganief N., Sjouerman J., Albeldas C., Nakedi K.C., Hermann C., Calder B., Blackburn J.M., Soares N.C. // Emerg. Microbes. Infect. 2018. Vol. 7. N 1. P. 212.
- Ganguli G., Mukherjee U., Sonawane A. // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10. P. 1121.
- Cahyana A.H., Shuto Y., Kinoshita Y. // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 1993. Vol. 57. N 4. P. 680.
- Nikitushkin V.D., Trenkamp S., Demina G.R., Shleeva M.O., Kaprelyants A.S. // Metabolomics. 2020. Vol. 16. N 2. P. 24.
- Антонова Н.А., Осипова В.П., Коляда, М.Н., Мовчан Н.О., Милаева Е.Р., Пименова Ю.Т. // Макрогетероциклы. 2010. Т. 3. С. 139.
- Shashin D.M., Demina G.R., Linge I.A., Vostroknutova G.N., Kaprelyants A.S., Savitsky A.P., Shleeva M.O. // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24. P. 13968.

#### Информация об авторах

Дарья Игорьевна Багаева – аспирант, мл. науч. сотр. лаб. биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН (bagaeva115@mail.ru);

Галина Рудольфовна Демина – ст. науч. сотр. лаб. биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. биол. наук (galyademina@yandex.ru);

Михаил Олегович Агафонов – руководитель группы геномного редактирования промышленных микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН, докт. биол. наук (agaphonov@inbi.ras.ru);

Александр Павлович Савицкий – зав. лаб. физической биохимии ФИЦ Биотехнологии РАН, профессор, докт. хим. наук (apsavitsky@inbi.ras.ru);

Арсений Сумбатович Капрельянц – гл. науч. сотр. лаб. биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН, профессор, докт. биол. наук (arseny@inbi.ras.ru);

Маргарита Олеговна Шлеева – зав. лаб. биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН, вед. науч. сотр., докт. биол. наук (mshleeva@inbi.ras.ru).

#### **Соблюдение этических стандартов**

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

#### **Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

#### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 30.10.2023;  
одобрена после рецензирования 12.11.2023;  
принята к публикации 14.11.2023.