

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОГО КОМПЛЕКСА У БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA*, УСТОЙЧИВЫХ К ПЕРОКСИДУ ВОДОРОДА

С. А. Полевой

Белорусский государственный университет, г. Минск,
sergeyxxxneo@gmail.com;
науч. рук. – Е. Г. Веремеенко, канд. биол. наук, доц.

Феназиновые антибиотики – группа гетероциклических азотсодержащих соединений, являющихся вторичными метаболитами, продуцируемыми только бактериями и археями. Из-за своей ароматической структуры эти соединения могут выступать как доноры или акцепторы электронов, в зависимости от редокс-потенциала взаимодействующих с ними молекул других веществ. Согласно многочисленным исследованиям, феназины имеют очень широкий спектр действия. Показано, что эти соединения являются потенциальными антираковыми агентами, что обусловлено генерацией активных форм кислорода, ингибированием активности ферментов топоизомераз и ацетил-КоА-синтетаз [1–3].

Исходя из сведений о механизме действия феназиновых антибиотиков, было сделано предположение, что синтез этих соединений бактериями требует наличия развитых систем антиоксидантной защиты. Целью данной работы являлся анализ систем антиоксидантной защиты нескольких штаммов бактерии *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, являющихся продуцентами феназинов. В результате проделанной работы было выяснено, что у резистентных к пероксиду водорода штаммов устойчивость обуславливается либо увеличенным уровнем активности и каталазы, и супероксиддисмутазы, либо только повышенным уровнем удельной активности каталазы.

Ключевые слова: феназиновые антибиотики; активные формы кислорода; каталаза; супероксиддисмутаза.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование проводилось на нескольких штаммах бактерии *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: штамма дикого типа (В-162) и ряда полученных на его основе мутантных штаммов (В-162/255; В-162/2; В-162/255/15). Данные штаммы демонстрируют более высокий уровень продукции феназиновых антибиотиков. Штамм В-162/255 был получен путем ступенчатого мутагенеза и отбора на устойчивость к токсическим аналогам ароматических аминокислот. Штаммы В-162/2 и В-162/255/15 селектировались на устойчивость к пероксиду водорода, который был выбран в качестве селектирующего агента исходя из данных о схожести механизмов его действия и действия феназиновых антибиотиков.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Удельную активность супероксиддисмутазы определяли с использованием непрямого метода, предложенного в работе [4]. Удельную активность каталазы определяли спектрофотометрически по степени разрушения H_2O_2 за единицу времени [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Удельная активность каталазы

На первом этапе работы было проведено исследование удельной активности ключевого фермента антиоксидантной защиты про- и эукариотических клеток – каталазы (рис. 1). Как и ожидалось, удельная активность этого фермента у штаммов-продуцентов В-162/2 ($91,52 \pm 12,55$ мМ/мг×мин) и В-162/255/15 ($77,08 \pm 9,21$ мМ/мг×мин) оказалась существенно выше, чем у бактерий дикого типа (в 28,5 и 24 раза, соответственно).

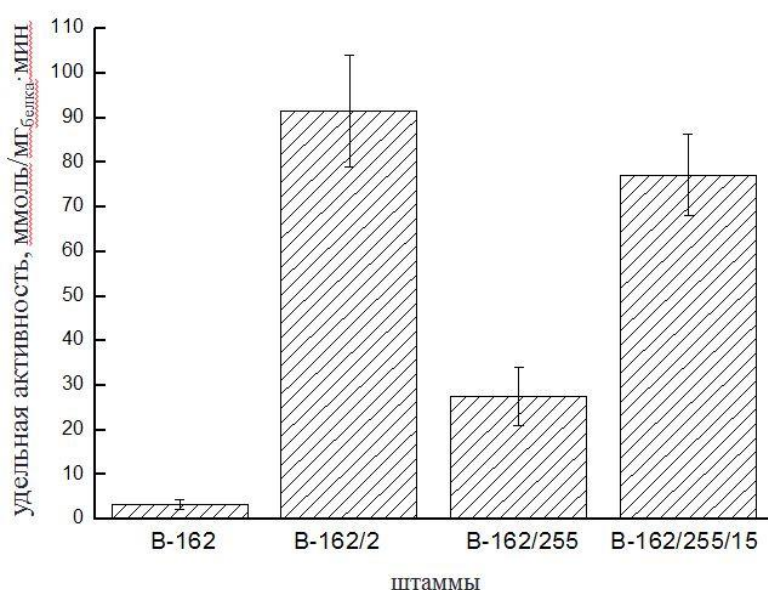


Рис. 1. Удельная активность каталазы у бактерий–продуцентов феназиновых антибиотиков

Следует отметить, что один из исходных штаммов (В-162/255), который не селектировался на устойчивость к перекиси, изначально демонстрировал высокие значения удельной активности каталазы ($23,3 \pm 6,48$ мМ/мг×мин). Однако данный показатель повысился у полученного на его основе штамма В-162/255/15 еще в 3.3 раза.

Удельная активность супероксиддисмутазы

Несколько иные результаты были получены при исследовании у мутантных штаммов удельной активности другого ключевого фермента антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (рис. 2).

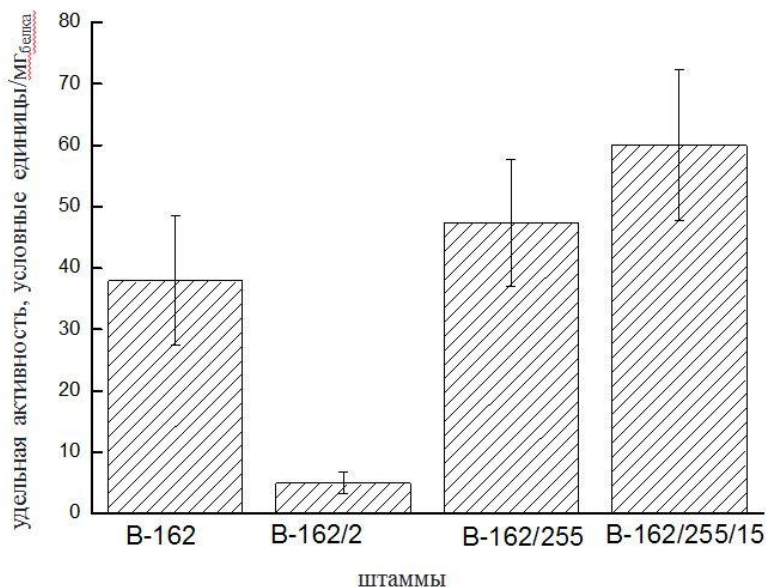


Рис. 2. Удельная активность супероксиддисмутазы у бактерий–продуцентов феназиновых антибиотиков

Известно, что этот фермент осуществляет трансформацию O_2^- в H_2O_2 , который затем превращается каталазой в H_2O и O_2 [6]. Также известно, что высокие концентрации H_2O_2 подавляют активность данного фермента [7]. Действительно, для штамма B-162/2 отмечено снижение удельной активности супероксиддисмутазы почти в 10 раз по сравнению с исходным штаммом дикого типа. Такой профиль снижения удельной активности указывает на то, что данный фермент способен обеспечивать только дополнительный уровень защиты от высоких концентраций активных форм кислорода, и, следовательно, не является основным в защите от окислительного стресса для этого штамма.

Иная картина наблюдалась для штамма B-162/255/15. В этом случае, наоборот, регистрировалось небольшое повышение удельной активности супероксиддисмутазы ($60,03 \pm 12,28$ у.е./мг_{белка}) по сравнению с исходным штаммом B-162/255 ($47,36 \pm 10,31$ у.е./мг_{белка}) – увеличение в 1,27 раза). B-162/255 – аналогорезистентный мутант [8]. Вероятно, что в результате мутагенеза в генах, кодирующих синтез супероксиддисмутазы, произошли изменения, которые сделали данный фермент менее чувствительным к ингибирующему действию активных форм кислорода, а именно к пероксиду водорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из представленных данных, можно заключить, что повышение продуктивности штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков может идти как минимум двумя разными путями: с помощью повышения активности только каталазы, или посредством увеличения активности обоих ферментов антиоксидантного комплекса.

Библиографические ссылки

1. *Pierson, L.S.* Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes / L.S. Pierson, E.A. Pierson // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 86, № 6 – P. 1659-1670.
2. *Patil, S.* Anti-melanoma and UV-B protective effect of microbial pigment produced by marine *Pseudomonas aeruginosa* GS-33 / S. Patil, J. Paradeshi, B. Chaudhari // *Nat. Prod. Res.* – 2016. – Vol. 30, № 24 – P. 2835–2839.
3. *Guttenberger, N.* Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products / N. Guttenberger, W. Blankenfeldt, R. Breinbauer // *Bioorg. Med. Chem.* – 2017.
4. *Kostiuk, V.A.* A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation / V.A. Kostiuk, A.I. Potapovich, Z.V. Kovaleva // *Vopr. Med. Khim.* – 1990. – Vol. 36, № 2 – P. 88–91.
5. *Aebi, H.* Catalase in vitro / H. Aebi // *Methods in Enzymology : Oxygen Radicals in Biological Systems.* – Academic Press, 1984. – Vol. 105. – P. 121–126.
6. *Shin, D.H.* Unusual properties of catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 are associated with its biofilm peroxide resistance., Unusual Properties of Catalase A (KatA) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Are Associated with Its Biofilm Peroxide Resistance / D.H. Shin, Y.S. Choi, Y.H. Cho // *J. Bacteriol. J. Bacteriol.* – 2008. – Vols. 190, 190, № 8, 8 – P. 2663, 2663–2670.
7. *Xianyong, M., Dun, D. Weidong, C.* Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT. // *Enzyme Inhibitors and Activators.* 2017. V. 9. P. 207–224
8. *Veremeenko E.G.* Creation and characterization of regulatory mutants of *Pseudomonas aurantiaca* B-162 resistant to toxic analogues of aromatic amino acids. Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution. III-d International Conference of young scientist. Odessa. Ukraine. 2007. P. 231–232.