

Полагают, что антиоксидантные свойства флавоноидов обусловлены их способностью хелатировать ионы переходных металлов. Поэтому на следующем этапе была изучена способность флавоноидов хелатировать ионы Cu (II). При образовании комплексов наблюдается смещение характерных для исходного флавоноида максимумов поглощения в длинноволновую область, внесение же в среду хелатора (ЭДТА) приводит к восстановлению исходных спектров (данные не представлены). Это также доказывает, что наблюдаемые спектральные изменения обусловлены образованием комплекса флавоноид-медь. Таким образом, антиоксидантные свойства изученных в работе флавоноидов могут быть во многом обусловлены их способностью хелатировать медь.

4. ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что избыточное накопление в печени меди и билирубина может инициировать процессы ПОЛ. Созданная модель может быть эффективно использована для поиска потенциальных антиоксидантов гепатопротекторного профиля.

Литература

1. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей / М., «Медицина», 859 с., 1999
2. Farhan Asad S et al Bilirubin-Cu (II) complex degrades DNA // Biochem. Biophys. Acta., 1428; 1999, 201–208;
3. Gille G., Sigler K Oxidative stress and living cells // Folia Microbiol. 40 (2), (1995), 131–152
4. Guetens G. et al. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis // Critical reviews in laboratory sciences, 39(4&5): 2002, 331–457
5. Heinecke Jay W. Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress // Free Radical Biology & Medicine, Vol 32, No 11, 2002, 1090–1101

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ВЛИЯНИЯ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *PELW* НА ПРОДУКЦИЮ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ПАТОГЕННОСТИ У БАКТЕРИЙ *ERWINIA* *CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA*

С. А. Скобляков

Фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) при взаимодействия с хозяйским организмом (растения картофеля) секретируют в окружающую среду ряд ферментов (пектиназы, целлюлазы, протеазы и др.), разрушающих ткани растения, что приводит к развитию симптомов заболевания «черная ножка» [5].

Ген *pelW* кодирует внутриклеточную экзопектатлиазу, предпочтительным субстратом для которой являются олигогалактурониды, образующиеся под действием внеклеточных пектиназ и поступающие в цитоплазму клетки из периплазматического пространства. Ранее было показано, что инактивация гена *pelW* приводит к снижению вирулентных свойств патогена [1].

Среди известных регуляторов, контролирующих продукцию факторов вирулентности и патогенности у бактерий *Eca*, в роли наиболее вероятного посредника в наблюдаемом эффекте мог выступать, как предполагалось, KdgR-репрессор, являющийся основным регулятором, опосредующим индукцию экспрессии вирулентного фенотипа продуктами деградации пектиновых веществ [6].

С целью проверки данной гипотезы был получен и охарактеризован двойной мутант *Eca* по генам *pelW* и *kdgR*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Использованные в работе штаммы и плазмиды представлены в таблице.

Для культивирования бактерий использовали полноценную питательную среду и среду А [2], обогащенную дрожжевым экстрактом (0,2%) и гидролизатом казеина (0,2%), в качестве источника углерода использовали глицерин (0,5%). Для индукции синтеза ферментов в среду добавляли полигалактуроновую кислоту («Sigma») до конечной концентрации 0,3%.

Для изучения ферментативных активностей бактерии выращивали до стационарной фазы роста. Активности внеклеточных пектатлиаз, целлюлаз и внутриклеточной катехол-2,3-диоксигеназы измеряли согласно методам, описанным в [7] и [11], соответственно.

Таблица

Штаммы бактерий и плазмиды	Описание	Источник получения
<i>Eca</i> JN42	прототроф, инсерция Tn9 в хромосому; Rif ^r Cm ^r	Коллекция НИЛ МГБ
<i>Eca</i> JN5084	как <i>Eca</i> JN42, но <i>pelW</i> ::mini-Tn5 χ ylE,	[1]
<i>Eca</i> SP5288	как <i>Eca</i> JN5084, но <i>kdgR</i> ::Sm/Sp, Sm ^r	Данная работа
<i>Eca</i> MV204	как JN42, но <i>kdgR</i> ::Sm/Sp, Sm ^r	[3]
<i>E. coli</i> BW19851	RP4-2::Mu-1 Km ^r ::Tn7/ <i>creB</i> 510 <i>hsdR17 endA1 zbf-5</i>	[9]
pKDGR4	Gm ^r Sm ^r ; <i>SacI-PstI</i> фрагмент <i>ogl-kdgR</i> ::Sm/Sp в pJQ200 SK	[3]

Манипуляции с ДНК, трансформация бактерий плазмидной ДНК, полимеразная цепная реакция и электрофорез в агарозном геле проводились согласно стандартным методам, описанным в руководстве [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Совмещение мутаций в генах *pelW* и *kdgR* было осуществлено в клетках *Eca* JN5084.

Для этого произведено конъюгационное скрещивание между бактериями *E. coli* BW19851 (донор), трансформированными предварительно ДНК плазмиды pKDGR4, и бактериями *Eca* JN5084 (реципиент). Инактивация хромосомного гена *kdgR* бактерий *Eca* JN5084 предполагалась в ходе рекомбинационного обмена по участкам гомологии интактного хромосомного гена *kdgR* и его варианта, инактивированного инсерцией кассеты антибиотикорезистентности «омега» [8], вводимого в составе pKDGR4.

Селекция рекомбинантов осуществлялась по их способности расти на среде, содержащей сахарозу (5%) и по признакам стрептомицин-резистентности и гентамицинчувствительности [10].

Дополнительный анализ отобранных рекомбинантов был проведен по экспрессии беспромоторного репортерного гена *xylE*, инсерцированного в ген *pelW* в составе mini-Tn5*xylE*. Спектрофотометрический анализ показал, что уровень катехол-2,3-диоксигеназной активности в клетках рекомбинантов более чем в 20 раз выше по сравнению с клетками родительского штамма JN5084 (Рис. 1). Препарат ДНК таких клонов был использован для генетического анализа.

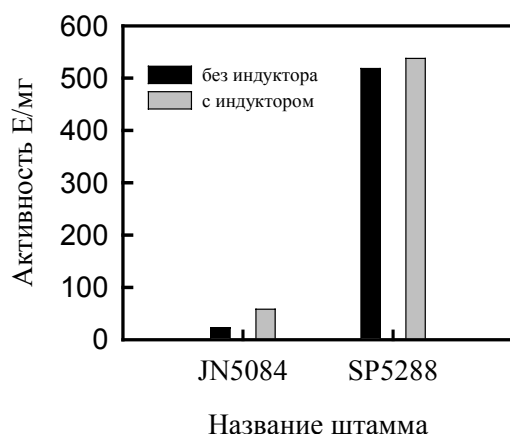


Рис. 1. Внутриклеточная катехол-2,3-диоксигеназная активность у штаммов бактерий *Eca*

Наличие вставки в составе хромосомного гена *kdgR* отобранных рекомбинантов было подтверждено с помощью ПЦР, проведенной с использованием праймеров KDG1 и KDG2 для гена *kdgR*.

В рамках данной работы был проведен сравнительный анализ продукции ферментов пекто- и целлюлолитического комплексов различными штаммами *Eca* (Рис. 2).

Как видно из рисунка 2, отмеченный ранее для бактерий *Eca* JN5084(*pelW*⁻) эффект снижения продукции пектиназ имеет место и в случае полученного двойного мутанта *Eca* SP5288 (*pelW*⁻*kdgR*⁻), что, судя по всему, свидетельствует о непричастности KdgR-репрессора к наблюдаемому явлению.

Сравнение уровней целлюлолитической активности (Рис. 2) позволяет отметить, что инактивация гена *pelW* не имеет столь значительного влияния на продукцию ферментов этого типа, по сравнению с пектиназами: степень индукции синтеза целлюлаз у бактерий *Eca* JN5084 сопоставима с отмеченной для штамма JN42 и, кроме того, в случае штамма SP5288 наблюдаются схожие уровни активности в индуцибельных и неиндуцибельных условиях культивирования.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что отмеченный ранее у бактерий *Eca* JN5084 эффект снижения продукции факторов вирулентности и патогенности при выращивании в среде с полигалактуроновой кислотой, судя по всему, не связан с действием глобального репрессора продукции факторов вирулентности и патогенности – KdgR-белком.

У бактерий *Eca* в отличие от близкородственных *Erwinia chrysanthemi* весьма вероятным является существование дополнительного механизма (-ов) регуляции экспрессии вирулентного фенотипа чувствительного к внутриклеточным концентрациям промежуточных продуктов метаболизма пектиновых веществ.

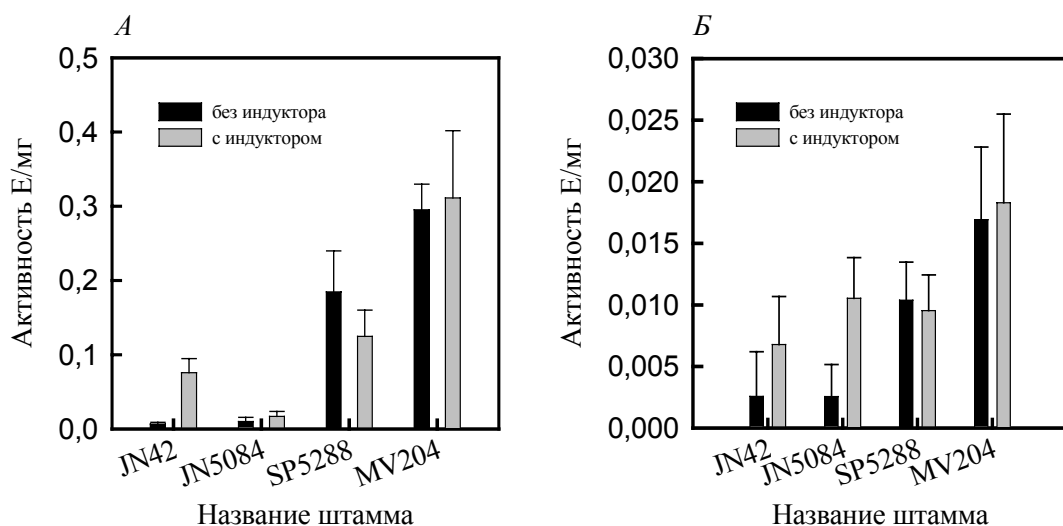


Рис. 2. Продукция внеклеточных ферментов у штаммов *Eca*:
 А – пектолитическая активность; Б – целлюлолитическая активность

Литература

1. Лагоненко А. Л., Песнякевич А. Г., Николайчик Е. А. Плейотропный эффект мутации в гене *pelW* бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 3-2 JN5084 // Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия: Тез. докл. конф. Минск, 2002. С.137.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 440 с.
3. Скобляков С.А., Лагоненко А.Л., Мямин В.Е., Песнякевич А.Г., Николайчик Е.А. Влияние мутаций в генах *pelW* и *kdgR* на продукцию пектатлиаз у *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* // Вестн. Белорус. ун-та. 2004. (в печати).
4. Ausubel F. A., Brent R., Kingston R. F., Moore D. D., Seidman I. G., Smith J. A., Struhl K. Current protocols in molecular biology. N. Y., 1992.
5. Barras F., Gijsegem F., Chatterjee A. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia* // Annu. Rev. Phytopathol. 1994. Vol. 32. P. 201–234.
6. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* // Annu. Rev. Microbiol. 1996. Vol. 50. P. 213–257.
7. Liu Y., Jiang G., Cui Y., Mukherjee A., Ma W. L., Chatterjee A.K. *kdgR_{Ecc}* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, harpin_{Ecc} and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 2411–2422.
8. de Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria // Journal of Bacteriology. 1990. Vol. 172. P. 6568–6572.
9. Metcalf W., Jiang W., Wanner B. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers // Gene. 1994. Vol. 138. P. 1–7.
10. Quandt J., Hynes M. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria // Gene. 1993. Vol. 127. P. 15–21.
11. Sala-Trepat J., Evans W. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species // Eur. J. Biochem. 1971. Vol. 20. P. 400–413.

АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ПЕРОКСИДАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЛАВОНОЛОВ

Е. А. Ледак, В. В. Сенчук

Флавонолы – это распространенные полифенольные биологически активные соединения растений, они являются природными антиоксидантами, входят в состав многочисленных биологически активных добавок к пище и лекарственных препаратов [1]. Флавонолы фармакологически активны, обладают Р-витаминными, ангиопротекторными, антирадикальными свойствами [2].

Кверцетин и физетин (5-дезоксикверцетин) являются структурно родственными соединениями, отличающимися только по гидроксилу в С5-положении кольца А. Оба флавонола обладают системой сопряжённых двойных связей, а, следовательно, способностью к перераспределению