

## ВПЛИВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ НА АКТИВНІСТЬ КАТАЛАЗИ З ДВОМА pH-ОПТИМУМАМИ В *ESCHERICHIA COLI*

### Вступ

Система глобальної відповіді клітини на дію пероксиду водню як оксиданту вперше була виявлена в *Escherichia coli* [1]. Інкубація бактерій з пероксидом водню низьких концентрацій робить ці бактерії резистентними до дії високих доз оксиданту, що до цього були летальними. Адаптивна відповідь кишкової палички у цьому випадку залежить від синтезу певних білків, які об'єднані до регулону *oxyR* [2]. Одним із ключових ферментів цього регулону є каталаза. Як відомо, *E. coli* продукує дві форми каталази: біфункціональну каталазу-пероксидазу HPI і монофункціональну каталазу HPII [3]. Обидва ферменти очищені і охарактеризовані як такі, що є несхожими на типові каталази. Відрізняються вони також один від одного за властивостями, кристалічною структурою, будовою молекул, а також способами індукції генів, які їх кодують. Так, експресія гена *katG* (каталаза HPI) знаходиться під контролем сенсора оксидативного стресу *OxyR*. Синтез каталази HPII, яка кодується геном *katE*, контролюється альтернативним  $\sigma^3$  фактором, субдиницею РНК-полімерази [4-6].

У попередніх дослідженнях нами було виявлено два оптимуми активності каталази в кислому та нейтральному діапазоні значень pH у препаратах частково зруйнованих бактерій *E. coli* [7; 8]. З метою подальшої характеристики і можливої диференціації двох виявлених піків досліджено вплив оксидативного стресу, індукованого пероксидом водню, на активність каталази з двома pH-оптимумами.

### Матеріали та методи

Штами *Escherichia coli* KS400 (K12, *metB*); AB1157 (K12, F<sup>+</sup> *thr-1 leuB6 proA2 his-4 thi-1 argE2 lacY1 galK2 rpsL supE44 ara-14 xyl-15 mtl-1 tsx-33*) люб'язно надані д-ром І.В.Андрєєвою (Інститут епідеміології та мікробіології ім. Гамалеї РАМН, Росія) та UM202 (HfrH *thi-1 katG17::Tn10*) – д-ром П.Лоевеном (Манітобський університет, Канада).

**Живильне середовище.** Культури *E. coli* вирощували в середовищах виробництва АОЗТ “Макрохім” (м. Київ, Україна), що містило 4,32 г/л суміші амінокислот, 5,44 г/л ферментативного пептону, 5,11 г/л хлориду натрію, 0,13 г/л карбонату натрію (pH 7,0). Середовище стерилізували автоклавуванням у паровому стерилізаторі BK-75 (СРСР) при температурі 121°C протягом 20 хв.

**Умови культивування.** Для досліджень відповідні об'єми нічної культури, вирощеної в умовах глибинного культивування (стаціонарна фаза), розводили 1:100 стерильним бульйоном та вирощували при 37°C за умов аерації протягом 4-5 год (середина експоненційної фази) до досягнення

оптичної густини приблизно 0,45 одиниць при довжині хвилі 600 нм. Після цього отриману культуру розводили в чотири рази свіжим бульйоном, нагрітим до 37°C. Відбирали аліквоти отриманої суспензії, до якої додавали 5-100 мкМ (всюди вказані кінцеві концентрації) пероксиду водню з наступною інкубацією при 37°C протягом відповідних проміжків часу до 60 хв. Після цього клітини збирали центрифугуванням при 3000 g протягом 10 хв на центрифугі PC-6 (СРСР). Бактерії двічі промивали 50мМ калій-фосфатним буфером з 0,5мМ ЕДТА (рН 7,0) та ресуспендували у відповідному об'ємі того ж буферу. При розведенні робочої суспензії інтактних клітин у 100 разів оптична густина цієї суспензії при довжині хвилі 600 нм становила 0,25-0,3 одиниці, що відповідало приблизно  $10^7$  клітин/мл.

**Визначення активності каталази.** Активність каталази визначали спектрофотометричним методом при температурі 25°C за допомогою спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, Ленінград, СРСР), обладнаного терmostатованим кюветоутримувачем. Використовуючи властивість молекул пероксиду водню – субстрату каталази вільно проникати через плазматичні мембрани, каталазну активність визначали в нативних клітинах [7]. Розпад пероксиду водню реєстрували при довжині хвилі 240 нм у пробі об'ємом 2 мл, що містила 10мМ пероксиду водню, 0,5мМ ЕДТА, 50мМ калій-фосфатного буферу (рН 7,0) і 20 мкл суспензії нативних клітин. Як контрольну використовували пробу, що містила всі перелічені компоненти, окрім пероксиду водню. Реакцію починали внесенням у кювету суспензії клітин. Для розрахунків використовували молярний коефіцієнт екстинкції для пероксиду водню  $39,4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [8]. Ферментативну активність виражали як зміну величини оптичного поглинання проби при довжині хвилі 240 нм за 1 хв. При цьому активність нормували до оптичної густини суспензії нативних бактерій при довжині хвилі 600 нм.

**Статистична обробка.** Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерної програми MYNOVA [9].

#### Результати та обговорення

У попередніх дослідженнях нами була описана модифікація рН-чутливості каталази *E. coli* KS400, отримана після руйнування клітин, а також як результат зміни кислотності середовища культивування, було виявлено два піки активності каталази при значеннях рН 3,5 та 7,0 [7; 8]. У цих же дослідях було попередньо показано, що співвідношення активності каталази з двома рН-оптимиумами змінюється внаслідок дії оксидативного стресу. Відомо, що *E. coli* відповідає на присутність екзогенного пероксиду водню синтезом додаткових молекул каталази НРІ, причому гідропероксидаза НРІІ не індукується оксидативним стресом [2; 3]. Для детальнішої характеристики і можливої диференціації двох піків активності каталази вивчали динаміку активності ферменту при рН 3,5 та 7,0 за умов оксидативного стресу. Рис. 1 демонструє вплив інкубації бактерій з пероксидом водню різних концентрацій протягом 10 хв. У результаті цього активність

каталази, що визначали при рН 7,0 і 3,5, зросла відповідно в 1,5 та 3,5-4,0 рази. В обох випадках максимальний ефект досягався при концентрації пероксиду водню 10 мкМ. Збільшення часу дії оксидативного стресу з 10 хв до 20 хв тільки незначно змінило картину (рис. 2, 3). У цьому випадку залежність активності при рН 7,0 від кількості екзогенного пероксиду водню була подібною. Максимальна ж величина зростання активності каталази при рН 3,5 становила 300% відносно контролю. Але в обох випадках активність у стресованих клітинах у порівнянні з контролем (початкова точка, рис. 2 і 3) була вищою в кілька разів. Оскільки ми не знайшли принципової різниці між індукцією каталази різними концентраціями пероксиду водню в межах від 5 мкМ до 100 мкМ (рис. 1), було цікаво дослідити часову динаміку активності каталази при рН 3,5 і 7,0. Рис. 4 і 5 демонструють підвищення активності ферменту при обох рН уже на перших 10 хв інкубації з 20 мкМ пероксидом водню. І знову активність каталази з оптимумом при рН 7,0 демонструвала стабільну тенденцію до зростання протягом 60 хв інкубації (рис. 4). У той же час активність каталази з кислим рН-оптимумом достовірно зросла до 200-240% і була стабільною протягом усього досліджуваного періоду (рис. 5). Причому для підвищення активності каталази з оптимумом при рН 3,5 було достатньо кількох секунд дії стресора. Проте, як і в попередніх дослідях, активність при рН 3,5 була втрачена повністю при спробі зруйнування клітин. У той же час активність каталази зруйнованих клітин при рН 7,0 стала вищою приблизно на 40% від активності нативних цілісних клітин. Втрата активності каталази в діапазоні кислих рН при руйнуванні клітин дає можливість висловити припущення, що ця активність пов'язана з функціонуванням певного мембранного компонента. Для функціонування цього компонента необхідний синтез білка, оскільки активація "кислої" каталази оксидативним стресом блокується хлорамфеніколом, інгібітором синтезу білка у прокариотів. Припускається, що цей мембранний комплекс входить до складу регулону *oxyR* [2; 4; 5], оскільки він активується екзогенним пероксидом водню. Крім того, його активація внаслідок оксидативного стресу не виявлена в *E. coli* UM202, який є дефіцитним за каталазою HPI. Не виявлена активність каталази з оптимумом при рН 3,5 і в *E. coli* AB1157, що продукує обидві форми каталази і, як передбачається, має дефект мембрани [10]. Однак описані генетичні характеристики цього штаму не дають можливості ідентифікувати ген, відповідальний за активність "кислої" каталази.

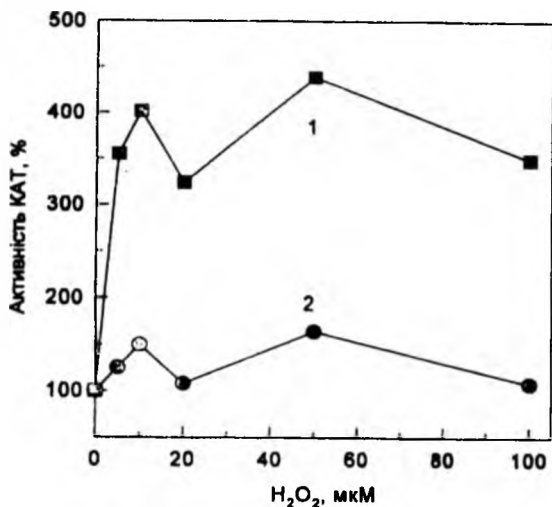


Рис. 1. Каталязна активність *E. coli* KS400, яку визначали при значеннях рН 3,5 (крива 1) та 7,0 (крива 2), за дії оксидативного стресу, індукованого перексидом водню різних концентрацій протягом 10 хв. Представлено дані типового експерименту

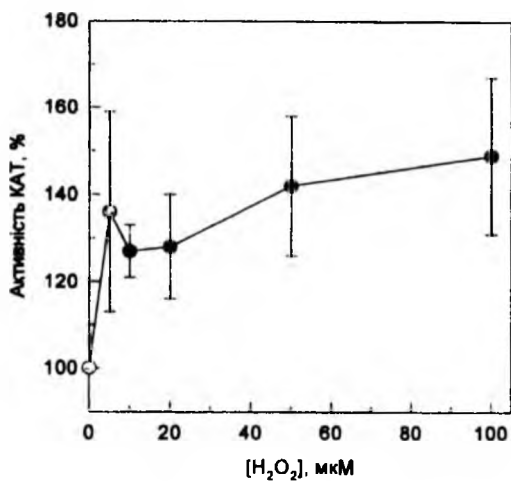


Рис. 2. Каталязна активність *E. coli* KS400, яку визначали при рН 7,0, за дії оксидативного стресу, індукованого перексидом водню різних концентрацій протягом 20 хв, n=3-4.

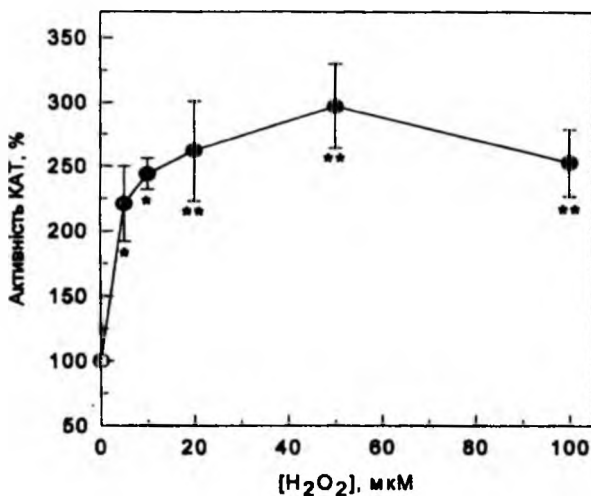


Рис. 3. Каталазна активність *E. coli* KS400, яку визначали при рН 3,5, за дії оксидативного стресу, індукованого пероксидом водню різних концентрацій протягом 20 хв. \*Достовірно відмінне від активності каталази в клітинах без індукції оксидативного стресу з  $P < 0,05$  та \*\* $P < 0,01$ ,  $n = 3-4$ .

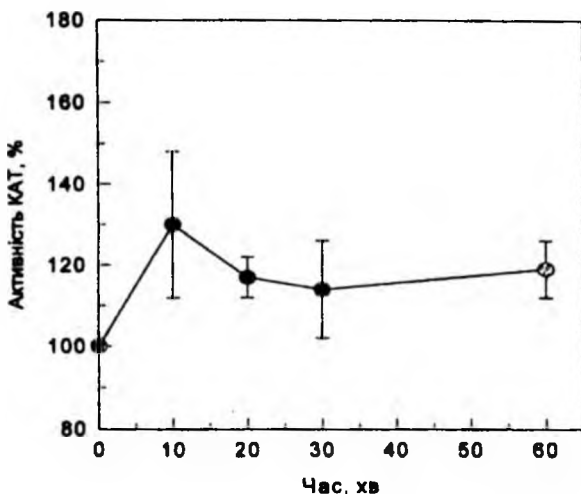


Рис. 4 Каталазна активність *E. coli* KS400, яку визначали при значенні рН 7,0, за дії оксидативного стресу, індукованого 20 мкМ пероксидом водню протягом різного часу,  $n = 5-7$ .

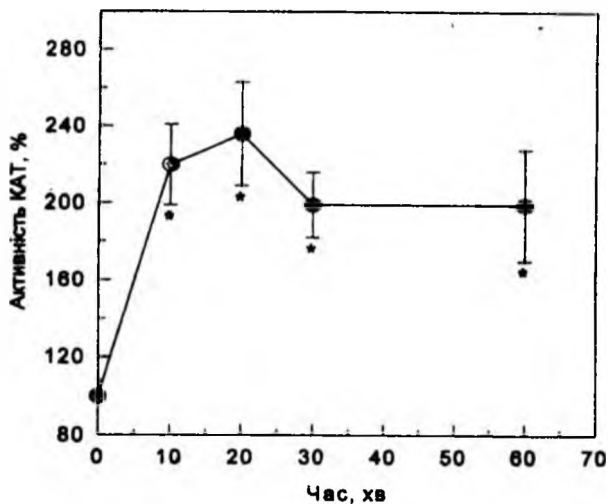


Рис. 5. Каталазна активність *E. coli* KS400, яку визначали при рН 3,5, за дії оксидативного стресу, індукованого 20 мкМ пероксидом водню протягом різного часу. \*Достовірно відмінне від активності каталази в клітинах без індукції оксидативного стресу з  $P < 0,05$  та \*\* $P < 0,01$ ,  $n = 5-7$ .

1. Demple B., Halbrook J. Inducible repair of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli* // Nature. – 1983 – Vol.304. – P.466-468
2. Lushchak V.I. Oxidative stress in bacteria. In: Oxidative stress at molecular, cellular and organ levels. – 2002. Eds. P.Johnson, A.Boldyrev, Research Signpost. – P.45-65
3. Loewen P.C. Bacterial catalases. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor. – NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. – P.273-308.
4. Storz G., Toledano M.B. Regulation of bacterial gene expression in response to oxidative stress // Meth. Enzymol. – 1997. – Vol.236. – P.196-207.
5. Storz G., Zheng M. Oxidative stress. Bacterial stress responses / Washington: ASM Press, Washington, D.C., 2000. – P.47-59.
6. Schellhorn H.E., Audia J.P., Wei L.I.C., Chang L. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli* // J.Bacteriol. – 1998. – Vol.180, №23 – P.6283-6291.
7. Семчишин Г.М., Дильовий М.В., Клименко А.О., Лушак В.І. Вплив руйнування клітини *Escherichia coli* на каталітичні властивості каталази // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т.72, №1.
8. Семчишин Г.М., Дильовий М.В., Лушак В.І. Вплив зовнішніх умов на активність каталази *Escherichia coli* // Укр біохім. журн. – 2002. – Т.74, №10.
9. Lushchak V.I., Lushchak L.P., Mota A.A., Hermes-Lima M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation // Am. J. Physiol. – 2001. – Vol.280. – P.R100-R107.

10. Дильовий М.В. Вплив 2,4-динітрофенолу і глюкози на утилізацію сукцинату, лактату, пірувату та форміату *Escherichia coli* K12 // Укр. біохім. журн. – 1996. – Т.68. №2. – С.37-41.

Halyna Semchyshyn, Tetiana Bagnyukova  
OXIDATIVE STRESS EFFECT ON CATALASE ACTIVITY WITH  
TWO PH-OPTIMUMS IN ESCHERICHIA COLI

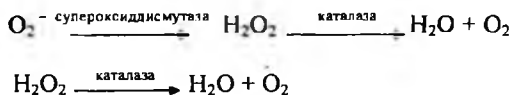
In previous work we have found two catalase activity peaks at pH 3.5 and pH 7.0 in *E. coli*. The activities demonstrated different activation as the result of hydrogen peroxide effect. It was suggested the activity with acid maximum is associated with some membrane protein component and regulated by OxyR factor.

Юрій Дем'ячук, Олександра Абрам

**ВПЛИВ РІЗНИХ РІВНІВ КИСНЮ НА РІСТ БАКТЕРІЙ  
*ESHERICHIA COLI* ШТАМІВ MC4100, GS071 ТА GS047**

Кисень є фактором, без якого неможливе існування більшості біологічних систем. Він бере участь в обміні речовин та енергії, без нього неможливе функціонування різних метаболічних шляхів. Найголовнішим процесом, в якому бере участь кисень, є дихання. Воно спряжене з окисним фосфорилуванням, а останнє, в свою чергу, – з перенесенням електронів через електронно-транспортний ланцюг (ЕТЛ). При перенесенні електронів через ЕТЛ, частина їх може виходити з нього і вступати в реакції, що ведуть до утворення активованих форм кисню (АФК) [4; 7]. До них, зокрема, належать супероксид-аніон ( $O_2^-$ ) та пероксид водню ( $H_2O_2$ ). АФК – речовини, що здатні пошкоджувати більшість компонентів живої клітини [3; 4; 7]. Це говорить про те, що кисень виступає не тільки як акцептор електронів у процесі окисного фосфорилування, але і як потужне джерело ендогенного оксидативного стресу.

У процесі еволюції живі організми виробили власні механізми захисту від АФК. Ці механізми скеровані на детоксикацію вільних радикалів, що постійно утворюються в клітині як побічні продукти деяких біохімічних процесів [7]. Детоксикація  $O_2^-$  та  $H_2O_2$  відбувається за такою схемою:



Супероксиддисмутаза (СОД) та каталаза є ключовими ферментами антиоксидантного захисту.