

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берия Л.В. Стимуляция биолюминесцентной активности бактериальной люциферазы продуктами Fe^{2+} индуцированного перекисного окисления липидов / Л.В. Берия, А.Д. Исмаилов, В.С.Данилов // Биохимия. – 1991. – Т. 56., вып. 3. – С. 477-485.
2. Кратасюк В.А. Люциферазное биотестирование: биофизические основы, методы и применение: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук / В.А. Кратасюк. - Красноярск, 1994. - 20 с.
3. Реммель Н.Н. Биолюминесцентный контроль интенсивности патологических окислительных процессов в клетках перфузируемой печени крыс после гипертермического воздействия / Н.Н. Реммель, В.А. Кратасюк, О.М. Мазняк и др. // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2003. - Т. 135, №1. - С.52-54.
4. Реммель Н.Н., Титова Н.М., Кратасюк В.А. Мониторинг окислительного стресса в биологических образцах биолюминесцентным методом // Бюл. эксп. биол. и мед. – 2003. – Т. 136, №8. – С. 238 – 240.
5. Hastings J.W., Gibson Q.H. Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced FMN // J. Biol. Chem. – 1963. – Vol. 238. – P. 2537-2554.
6. Meighen E.A., Hastings J.W. Binding site determination from kinetic data // J. Biol. Chem. – 1971. – Vol. 246. – P. 7666-7674.
7. Porter N.A., Caldwell S.E., Mills K.A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids // Lipids. – 1995. –Vol. 30. – P. 277-290.
8. Ulitzur S., Hastings J.W. Evidence for tetradecanal as the natural aldehyde in bacterial bioluminescence // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1979. – N 1. - P. 265-267.

**THE PARTICIPATION OF LIPID PEROXIDATION METABOLITES
IN BACTERIAL LUMINESCENT REACTION**

N.N. Remmel, V.A. Kratasyuk

Participation of aldehyde metabolites (products of the nonsaturated fat acids oxidation which appearing in the lipid peroxidation process) in reaction of a bacterial luminescence is shown on an example malonic dialdehyde. Malonic dialdehyde is substrate of luciferase. The spectra of luminescence reactions at presence malonic and decanal aldehydes coincide, but the intensity of luminescence at presence malonic dialdehyde on the order is less.

УДК 574.579.26:574.579.222

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ
КАК ФАКТОР ЗАЩИТЫ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА¹**

Н.Н. Реммель, В.А. Кратасюк, Г.А. Выдрякова,
С.А. Котова, Д.А. Котов, Ю.А. Лабас*

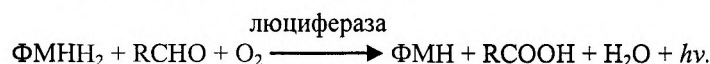
*Окислительный стресс служит общим пусковым механизмом повышенной активности ферментов антиоксидантной и люминесцентной систем. В работе показано увеличение активности ферментов как антиоксидантной, так и люминесцентной систем в условиях индукции окислительного стресса пероксидом водорода и ионами двухвалентного железа. При потере люминесцентной системы бактерии вынуждены адаптироваться к повышенному содержанию активных форм кислорода только с помощью антиоксидантной системы, более высокие значения активности антиоксидантных ферментов показаны для мутантного темнового штамма бактерий *Vibrio harveyi*.*

В основе свечения бактерий, как и других живых организмов, лежит катализируемая специфическими ферментами химическая реакция, которая сопровождается излучением квантов видимого света. Ферменты называют люциферазами, а окисляемые ими субстраты – люциферинами [4,8].

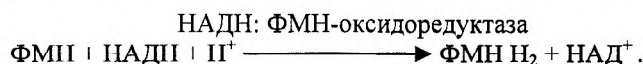
¹ При поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации и Американского фонда гражданских исследований и развития, грант Y2-B-02-19 по программе «Фундаментальные исследования и высшее образование» и гранта РФФИ № 05-04-49316.

* © Н.Н. Реммель, В.А. Кратасюк, С.А. Котова, 2005; Красноярский государственный университет, Красноярск (Россия); e-mail: remmel@mail.ru; VKratasyuk@yandex.ru; Г.А. Выдрякова, Д.А. Котов, 2005; Институт биофизики СО РАН, Красноярск (Россия); Ю.А. Лабас, 2005; Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва (Россия); e-mail: labas@inbi.ras.ru.

Хотя люциферазы разных видов светящихся бактерий отличаются по своим физическим и кинетическим свойствам, все они катализируют одну и ту же реакцию [2]:



Здесь ФМН и ФМНН₂ - окисленная и восстановленная форма флавиномононуклеотида, RCHO и RCOOH - длинноцепочечный алифатический альдегид и соответствующая жирная кислота. Восстановление ФМН может осуществляться ферментативным путем с помощью НАДН: ФМН-оксидоредуктазы:



Кислород - необходимый компонент дыхания и люминесцентной реакции. В возбуждении биоломинесценции могут участвовать активные промежуточные кислородные радикалы и алифатические альдегиды, продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран. Инициация процессов ПОЛ осуществляется при взаимодействии активных форм кислорода (АФК) с полиненасыщенными жирными кислотами. В условиях окислительного стресса происходит увеличение интенсивности ПОЛ [1]. Предполагают, что люминесцентная система представляет собой аналог антиоксидантной и участвует в защите бактерий от окислительного стресса [3,9,10].

Цель работы состояла в исследовании роли люминесцентной реакции в защите светящихся бактерий от окислительного стресса. Для этого изучали возможность генерации бактериями активных форм кислорода (АФК) в процессе роста, особенности свечения и уровень активности основных ферментов антиоксидантной системы (АОС) каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), а также активность ферментов люминесцентной системы люциферазы и НАДН: ФМН-оксидоредуктазы в динамике роста бактерий, в условиях индуцированного окислительного стресса; активность ферментов антиоксидантной и люминесцентной систем светящегося штамма сравнивали с активностью аналогичных ферментов мутантного темного штамма.

Методика исследования

В работе использовали светящиеся бактерии из Коллекции культур ИБСО лаборатории бактериальной биоломинесценции Института биофизики СО РАН *Photobacterium phosphoreum*, штаммы 677, 189; *Vibrio fischeri*, штаммы 2088, 1231; *Photobacterium leiognathi*, штамм 208; *Vibrio harveyi*, штаммы 1212, 178; рекомбинантный штамм *Escherichia coli* Z-905 (несущий lux-гены, кодирующие все элементы люминесцентной реакции); темных мутантов *P.phosphoreum* (1764), *V.harveyi* (178), *E.coli* (Z-905). Культивирование бактерий проводили до фазы замедления роста, снимая показатели роста и свечения каждые 30 минут. Рассчитывали удельную скорость роста бактерий. Пробы для определения активности ферментов отбирали в экспоненциальной фазе и фазе замедления роста.

Все биоломинесцентные измерения выполняли на биоломинометрах ВЛМ 8801, 8802 (конструкторское бюро "Наука", Красноярск, Институт биофизики СО РАН). Активность люциферазы оценивали по максимальной интенсивности люминесценции. Активность НАДН: ФМН-оксидоредуктазы и антиоксидантных ферментов определяли спектрофотометрически по известным методикам на спектрофотометре Uvikon 943 (Kontron instruments, Италия) в бесклеточных бактериальных экстрактах, которые получали на ультразвуковой установке Ultrasonic disintegrator type UD- 20 automatic (Techpan, Польша). Индукцию окислительного стресса и ПОЛ в клетках бактерий вызывали внесением в инкубационную среду ионов двухвалентного железа FeSO₄ в концентрации 1,5 мМ и H₂O₂ в концентрациях 1 мМ и 2,5 мМ.

Результаты и обсуждение

Известно, что у светящихся бактерий существуют ферменты "классической" антиоксидантной системы - каталаза и супероксиддисмутаза (СОД) [5,7,12]. Более того, каталаза с периплазматической локализацией требуется для обеспечения нормальной симбиотической способности [11,13]. Мутанты по гену имеют слабую симбиотическую способность. Фермент люминесцентной системы люцифераза также имеет периплазматическую локализацию, а некоторые кислородные радикалы стимулируют люминесценцию [6].

При исследовании основных ферментов АОС каталазы и СОД в зависимости от фаз роста бактерий была показана высокая активность ферментов у всех изученных видов светящихся бактерий. Интенсивность свечения в процессе роста бактерий изменялась параллельно возрастанию в клетках количества основного фермента люминесцентной реакции люциферазы. Свечение достигало максимального значения и затем уменьшалось, хотя рост бактерий еще продолжался. Максимальную активность люциферазы и максимальную интенсивность свечения наблюдали в экспоненциальную фазу роста бактерий (рис.1). Содержание второго фермента люминесцентной реакции НАДН: ФМН-оксидоредуктазы не зависит от содержания люциферазы и интенсивности свечения, поэтому во всех исследованных точках активность этого фермента оставалась в среднем стабильной. В условиях накапливающихся во время роста бактерий продуктов окислительного метаболизма активность антиоксидантных ферментов при культивировании изменялась. Активность каталазы увеличивалась, что подтверждается данными и других авторов [13], активность СОД к фазе

замедления роста снижалась (рис.2). Наиболее высокую активность СОД наблюдали в экспоненциальной фазе роста.

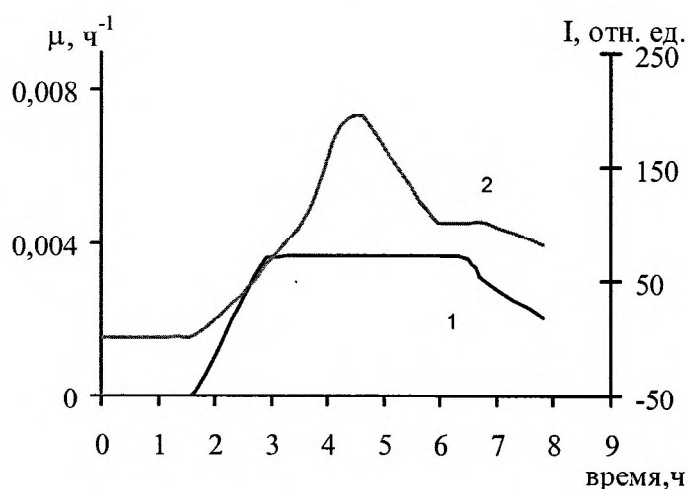


Рис.1. Динамика роста и свечения бактерий *Vibrio harveyi*: 1 - удельная скорость роста, μ ; 2 - кривая свечения (зависимость интенсивности свечения I от времени культивирования бактерий)

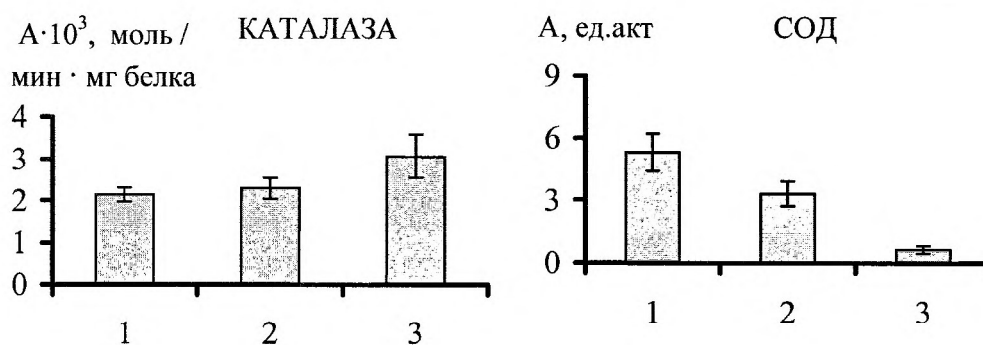


Рис.2. Активность ферментов антиоксидантной системы (A) бактерий *Vibrio harveyi* в зависимости от фазы роста: 1 - экспоненциальная фаза (максимум интенсивности свечения); 2 - экспоненциальная фаза (падение интенсивности свечения); 3 - фаза замедления роста

Для доказательства взаимного участия антиоксидантной и люминесцентной систем в механизмах антиоксидантной защиты бактерии подвергали окислительному стрессу. В экспериментах с добавлением в среду культивирования двухвалентного железа было показано, что при совпадении кривых роста опыта и контроля индукция люминесценции в присутствии железа начинается раньше, а интенсивность люминесценции достоверно выше ($p_k < 0,001$) (рис.3). Активность люциферазы в точке максимальной интенсивности свечения превышала контрольные значения почти в 2 раза ($p_k < 0,01$), постепенно снижаясь к фазе замедления роста (рис.4). Повышенную активность антиоксидантных ферментов регистрировали на протяжении всего периода культивирования. Особенно высокой была активность СОД ($p_k < 0,001$), приближаясь к контрольным значениям только к фазе замедления роста; содержание малонового диальдегида (МДА), показателя интенсивности окислительного стресса, в этот период превышало контрольные значения ($p_k < 0,01$). Увеличение активности НАДН: ФМН оксидоредуктазы в несколько раз по сравнению с контролем ($p_k < 0,001$) в условиях окислительного стресса наблюдали во время экспоненциальной фазы роста бактерий на фоне падения интенсивности свечения и в фазе замедления роста. Такое поведение фермента может свидетельствовать о повышенном расходе восстановительных эквивалентов в условиях напряженного метаболизма.

Перекись водорода в концентрации 1мМ практически не оказывала влияния на рост бактерий. Интенсивность свечения в момент внесения перекиси падала и восстанавливалась к фазе замедления роста. Более значительные изменения наблюдали при определении активности ферментов. Через час после внесения пероксида на фоне тенденции к увеличению содержания МДА ($0,05 < p_k < 0,1$) возрастает активность ферментов как антиоксидантной, так и люминесцентной систем ($p_k < 0,001$, $p < 0,01$; p - по сравнению со значениями параметров до внесения перекиси) (рис.5). К фазе замедления роста бактерий активность люминесцентной системы и каталазы снижается, приближаясь к контрольным значениям, активность же СОД еще более воз-

растает по сравнению с контрольными значениями ($p_k < 0,001$). Вероятно, в системе стали происходить вторичные процессы образования O_2^- в реакциях перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне недостоверного увеличения содержания МДА ($p_k > 0,05$). Увеличение активности люциферазы без увеличения свечения подтверждает имеющиеся в литературе сведения об участии H_2O_2 в темновой реакции, катализируемой люциферазой. При внесении в среду перекиси водорода в концентрации 2,5 мМ интенсивность свечения падает, не восстанавливаясь, рост бактерий при этом замедляется. Данная тенденция наблюдается независимо от того, в какой момент экспоненциальной фазы вносили перекись, следовательно, такая концентрация для бактерий оказывается сублетальной.

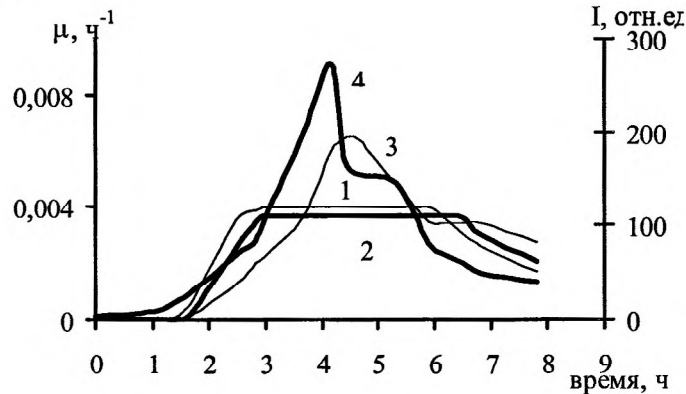


Рис. 3. Рост и свечение бактерий *Vibrio harveyi* в присутствии $FeSO_4$:
1 - удельная скорость роста μ в контроле; 2 - удельная скорость роста μ в присутствии $FeSO_4$;
3 - кривая свечения в контроле; 4 - кривая свечения в присутствии $FeSO_4$

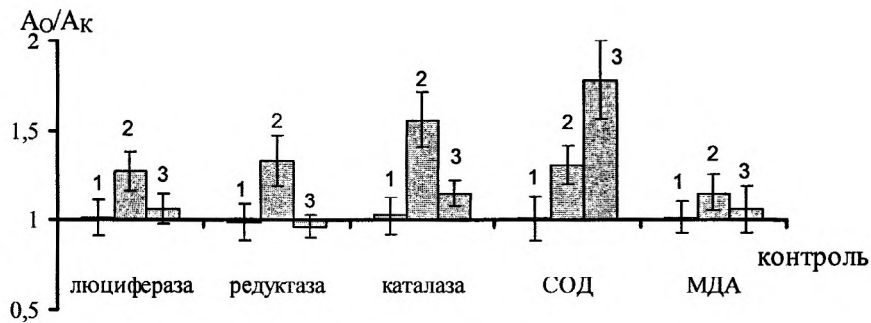


Рис. 4. Изменение активности ферментов антиоксидантной и люминесцентной систем (A_0/A_k) и содержание МДА бактерий *Vibrio harveyi* в присутствии $FeSO_4$:
1 - экспоненциальная фаза роста (максимум интенсивности свечения); 2 - экспоненциальная фаза роста (падение интенсивности свечения); 3 - фаза замедления роста

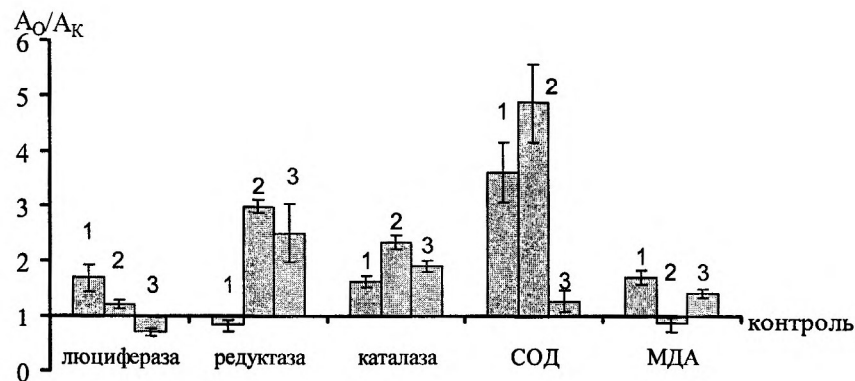


Рис. 5. Изменение активности ферментов антиоксидантной и люминесцентной систем (A_0/A_k) и содержание МДА бактерий *Vibrio harveyi* в присутствии H_2O_2 : 1 - экспоненциальная фаза роста (до внесения H_2O_2); 2 - экспоненциальная фаза роста (через 1 час после внесения H_2O_2); 3 - фаза замедления роста

Еще одним подтверждением гипотезы взаимного участия антиоксидантной и люминесцентной систем в защите бактерий от окислительного стресса являются данные по активности антиоксидантных ферментов у темнового (мутантного по альдегиду) штамма бактерий *V. harveyi*. Показано, что активность антиоксидантных ферментов и каталазы и СОД мутантов на фоне повышенного содержания МДА увеличивается в зависимости от фазы роста в 2-6 раз ($p \leq 0,001$). Очевидно, при потере люминесцентной системы бактерии вынуждены адаптироваться к повышенному содержанию АФК только с помощью АОС. Темновой штамм теряет резистентность к окислительному стрессу. При летальных концентрациях перекиси водорода для темнового штамма светящийся не погибает.

Таким образом, генерация АФК в экспоненциальной фазе роста фотобактерий сопровождается увеличением активности ферментов АОС, люциферазы и свечения. Главную роль в защите бактерий от O_2^- играют СОД и, вероятно, люцифераза. Окислительного стресс, вызывающий образование O_2^- , оказывает влияние на механизмы регуляции двух систем, антиоксидантной и люминесцентной, проявляющиеся в ранней индукции люминесцентного свечения, увеличении интенсивности свечения и увеличении активности люциферазы наряду с активностью антиоксидантных ферментов. При потере люминесцентной системы бактерии вынуждены адаптироваться к повышенному содержанию АФК только с помощью АОС. Таким образом, люминесцентная система играет важную экологическую роль в защите бактерий от окислительного стресса, с одной стороны снижая концентрацию кислорода в окружающей среде и предупреждая образование его активных форм, с другой – используя АФК в качестве субстратов собственной реакции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров // Биофизика. Итоги науки и техники. – ВИНТИ. – 1991 - Т.29. – 252с.
2. Гительзон И.И. Светящиеся бактерии / И.И. Гительзон. – Новосибирск: Наука, 1984. - С. 108-112, 159.
3. Гордеева А.В. Генерация активных форм кислорода наружными поверхностями водных организмов / А.В. Гордеева, Ю.А. Лабас // Цитология. – 2003. - Вып.45, N 3.- С. 284-289.
4. Кратасюк В.А. Бактериальная биолюминесценция и биолюминесцентный анализ / В.А. Кратасюк // Биофизика. – 1982. – Т. 27, вып. 6. – С. 937-940.
5. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity //Annu. Rew. Biochem, 1989, N58. – P.79-110.
6. Hastings J.W. Bacterial bioluminescence //Ann. Rev. Microbiol, 1977, Vol. 31. – P. 549-595.
7. Kobayashi H. Induktion of superoxide dismutase in *Photobacterium leiognathi* // Free Rad. Res. Comms, 1991, Vols.12,13. - P. 437-441.
8. Lee J. The mechanism of bacterial bioluminescence //Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes, 1991, Vol. 2. – P. 109-151.
9. Peskin A.V., Labas Y.A., Tikhonov A.N. Superoxide radical production by sponges *Sycon* sp. FEBS Lett., 1998, Vol. 434, P. 201-204.
10. Rees J.F. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools // J. Exp. Biology, 1998, Vol. 201. - P. 1211-1221.
11. Ruby E.G. Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri* // Trends Microbiol, 1999, Vol. 7, N 10. - P. 414-420.
12. Stoppolo M. Cu, Zn superoxide dismutase from *Photobacterium leiognathi* is an hyperefficient enzyme // Biochem, 1998, Vol. 37. - P. 12287-12292.
13. Visick K.L. The periplasmic, group III catalase of *Vibrio fischeri* is required for normal symbiotic competence and is induced both by oxidative stress and by approach to stationary phase // J. Bacteriol, 1998, Vol.180, N 8. - P.2087-2092.

THE BACTERIAL BIOLUMINESCENCE AS PROTECTION FACTOR FROM OXIDATIVE STRESS

N.N. Rimmel, V.A. Kratasyuk, G.A. Vydryakova,
S.A. Kotova, D.A. Kotov, Yu.A. Labas

*The oxidative stress is the common start mechanism for display of hyperactivity of antioxidative and luminescent systems enzymes. In work the increase of enzymes activity each of these systems is shown at induction of oxidative stress by hydrogen peroxide and ions of bivalent iron. The bacteria are adapt to increased of active forms of oxygen only with antioxidative systems at loss of luminescent system. The increasing of antioxidative enzymes activity are shown for dark mutant of *Vibrio harveyi*.*