

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.1+579.66
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-91-104>

Поступила в редакцию 21.04.2021
Received 21.04.2021

Е. Г. Веремеенко¹, М. А. Шапиро², О. А. Наумовская³,
Д. Д. Ашманкевич⁴, Н. П. Максимова¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

³Вроцлавский университет естественных наук, Вроцлав, Польша

⁴Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении, Минск, Республика Беларусь

ПРОТЕОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ФЕНАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA*

Аннотация. Протеомный анализ – высокоэффективный метод идентификации бактерий и определения содержания белка в прокариотических клетках при различных условиях роста бактериальной культуры. Однако данный подход практически не используется для характеристики продуцентов биологически активных веществ. Использование методов протеомного профилирования при изучении бактерий позволяет получить данные о метаболических процессах, протекающих в клетках прокариот, что дает возможность оптимизировать подходы к созданию продуцентов биологически значимых соединений.

Целью данной работы было проведение протеомного профилирования мутантных штаммов бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, способных к сверхпродукции феназиновых антибиотиков, с помощью микробиологических и биохимических методов.

В ходе проведения протеомного анализа штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* впервые было продемонстрировано достаточно раннее (в *log*-фазе) начало экспрессии отдельных генов *phz*-оперона, кодирующего ферменты синтеза феназинов. Наиболее высокое содержание белка PhzO, ген которого находится за пределами *phz*-оперона, было зарегистрировано для штамма дикого типа. Не обнаружено корреляции между содержанием данного белка и концентрацией продуктов реакции, которую он катализирует. Кроме того, выявлена общая тенденция штаммов-продуцентов к накоплению ферментов и белков, входящих в комплекс системы антиоксидантной защиты. У штаммов-продуцентов также отмечено существенное увеличение содержания белков, принимающих участие в репарации ДНК, и шаперонов, способствующих восстановлению нативной конформации белков.

Ключевые слова: феназины, протеом, *phz*-оперон, антиоксидантные ферменты, пероксид водорода, репаративные процессы, сверхпродукция, ген

Для цитирования: Протеомное профилирование штаммов-продуцентов феназиновых соединений *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* / Е. Г. Веремеенко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. Біял. навук. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 91–104. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-91-104>

Katsiaryna G. Verameyenka¹, Michail A. Shapira², Volga A. Naumouskaya³,
Denis D. Ashmankevich⁴, Natalia P. Maximova¹

¹Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

³Wroclaw University of Natural Sciences, Wroclaw, Poland

⁴Center for Examinations and Tests in Health Service Republican Unitary Enterprise, Minsk, Republic of Belarus

PROTEOMIC ANALYSIS OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* STRAINS CAPABLE OF PHENASINE COMPOUNDS OVERPRODUCTION

Abstract. Proteomic analysis is a highly effective method for bacteria identification and the elucidation of protein's content in prokaryotic cells at different growth conditions. To our knowledge this approach is hardly ever used for characterization of producers of biologically active substances. The understanding of the changes in protein profile in mutant strains capable of biologically active substances overproduction helps to recognize the biochemical and molecular basis of metabolic changes which lead to overproduction. So that, proteomic analysis could be especially useful for optimization the producer's creation techniques.

The purpose of current research was to carry out proteomic profiling of bacteria *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* mutant strains capable of overproduction of phenazine antibiotics. Microbiological and biochemical methods were used for these aims.

In current research a proteomic analysis of strains of *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* producing phenazines was carried out. An early (during *log*-phase) onset of expression of individual genes of *phz*-operon which codes enzymes for phenazines synthesis was demonstrated. It was also found that the wild type strain has the highest level of PhzO protein. The gene encoding this protein is located outside the *phz*-operon. We weren't able to establish the correlation among PhzO protein content and concentration of the derivatives for which appearance PhzO is responsible. A general tendency of producer strains towards the accumulation of enzymes and proteins of the antioxidant defense system was revealed. Producer strains also demonstrate a significant increase in the concentration of proteins involved in DNA repair as well as chaperones involved in the native protein conformation maintenance.

Keywords: phenazines, proteome, *phz*-operon, antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, reparative processes, superproduction, gene

For citation: Verameyenko K. G., Shapira M. A., Naumouskaya V. A., Ashmankevich D. D., Maximova N. P. Proteomic analysis of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains capable of phenazine compounds overproduction. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2022, vol. 67, no. 1, pp. 92–104 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2022-67-1-91-104>

Введение. Методы протеомного профилирования в настоящее время достаточно широко используются в медицинской микробиологии и лабораторных микробиологических исследованиях для идентификации микроорганизмов и сравнения их между собой, диагностики патологических процессов и выявления достоверных маркеров инфекционных заболеваний [1, 2], исследования патогенных штаммов микроорганизмов [2], а также для изучения процессов биоремедиации и устойчивости бактерий к антибиотикам [3, 4].

Использование методов протеомного профилирования в исследовании микроорганизмов позволяет получить более точные данные о биохимических процессах, протекающих в бактериальных клетках. Известно, что концентрация того или иного белка в клетке не определяется исключительно уровнем транскрипции соответствующего гена. Большое значение имеют процессы, происходящие на посттранскрипционном уровне, а также в ходе трансляции и посттрансляционных модификаций. Именно совокупность этих процессов и обеспечивает в итоге определенную концентрацию того или иного белка в клетках и соответствующий уровень его активности. Следует отметить, что протеомный анализ (протеомное профилирование) позволяет установить эффективность синтеза белков и их посттрансляционных модификаций именно на последних стадиях, что дает возможность определить интенсивность контролируемых бактериальными клетками метаболических реакций в целом.

Вместе с тем данный подход в настоящее время еще недостаточно широко используется для изучения особенностей метаболизма биологически активных соединений у штаммов-продуцентов. В первую очередь это связано с методологическими сложностями выделения из бактериальной клетки общей белковой фракции, необходимой для изучения протеома. На сегодняшний день еще не существует универсальных методик экстракции белков из клеток микроорганизмов в силу особенностей организации их клеточной стенки, наличия дополнительных механизмов устойчивости к воздействию факторов внешней среды, кислотам, щелочам и другим соединениям, применяемым для разрушения клеток. В связи с этим для каждого вида и даже штамма микроорганизмов необходимо разработать индивидуальный подход к экстракции белков.

Известно, что синтез феназиновых антибиотиков происходит в бактериальных клетках в стационарной фазе роста культуры [5]. В задачу данного исследования входило выявление продуктов генов *phz*-оперона (белков), задействованных в синтезе феназиновых антибиотиков, у мутантных штаммов-продуцентов данных соединений уже в *log*-фазе роста культуры, что является одним из возможных факторов, обеспечивающих сверхпродукцию феназинов у изучаемых мутантных штаммов. Одна из ключевых задач данного исследования – установить время появления Phz-белков в клетках штаммов-продуцентов для определения начала экспрессии кодирующих их генов. Данная информация крайне важна для разработки подходов к оптимизации процессов регуляции потока клеточных метаболитов в бактериальных клетках и, соответственно, переключения биосинтетических реакций на продукцию феназинов на разных стадиях роста бактериальной культуры.

Целью данной работы было проведение протеомного профилирования бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* мутантных штаммов, способных к сверхпродукции феназиновых анти-

биотиков для анализа метаболических процессов, происходящих в клетках-продуцентах уже в *log*-фазе роста культуры. В задачи исследования входил также поиск белков-кандидатов, которые связаны с приобретением мутантными штаммами способности к сверхсинтезу феназиновых антибиотиков.

Материалы и методы исследования. В работе использовали штаммы *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* дикого типа (B-162), мутантные штаммы (B-162/55, B-162/255, B-162/17, B-162/2 и B-162/15), отличающиеся повышенным уровнем продукции феназиновых соединений [6], а также штамм B-162/18, полученный в результате клонирования генов положительной регуляции синтеза феназинов (*phzIR*-генов) в клетках штамма дикого типа [7].

Культивирование бактерий проводили в питательном бульоне в течение 16–18 ч при температуре 28 °C.

Каждый образец анализировали в двух биологических и двух-трех технических повторях. Белок идентифицировали как найденный, если в каждом биологическом повторе не менее чем в двух технических повторях из трех (или хотя бы в одном, если их было два) было выявлено не менее двух пептидов длиной более 7 аминокислотных остатков. В качестве меры, характеризующей количество интенсивностей обнаруженного белка, использовали среднеарифметические совокупности интенсивности сигналов найденных пептидов, принадлежащих белку. Интенсивность белка считали приемлемой, если разброс (дисперсия) интенсивностей во всех совокупных повторях составлял не более половины от абсолютного значения [8].

Для проведения протеомного анализа бактерии, выращенные в питательном бульоне до *log*-фазы роста культуры, осаждали путем центрифугирования при 15 000 об/мин в течение 1 мин, отмывали натрий-фосфатным буфером (50 мМ, pH 7,0), концентрировали в соответствующем буфере до 10^{10} – 10^{11} кл/мл. При получении бесклеточного экстракта для протеомного анализа бактериальную массу подвергали ультразвуковому воздействию с помощью дезинтегратора Bandelin UW 3100 (Reichmann, Германия) (частота 20 кГц, режим: 1,5 с экспозиция, далее 1,5 с перерыв, циклично в течение 45 с, температурный режим от –4 до 0 °C), после чего центрифугировали в течение 4 мин при 14 500 об/мин. Полученный осадок подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 10 мин при комнатной температуре и растворяли в 300 мкл деионизированной воды. К полученной взвеси добавляли 400 мкл метанола и 200 мкл хлороформа, тщательно перемешивали (5 мин на шейкере при 250 об/мин) и помещали на 1 ч в морозильную камеру (–20 °C). Затем смесь повторно перемешивали (см. выше) и центрифугировали в течение 15 мин при 4 °C со скоростью 13 400 об/мин. После этого верхний слой удаляли, а к оставшейся двухфазной смеси добавляли 600 мкл метанола. Образец встряхивали и центрифугировали 15 мин при 4 °C со скоростью 13 400 об/мин. Затем супернатант удаляли, а осадок подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 10 мин при комнатной температуре. При необходимости доочистки белковой фракции процедуру выделения повторяли. Полученный осадок предварительно растворяли в 150 мкл 9 М мочевины, инкубировали на шейкере при 40 °C (550 об/мин), а затем подвергали трипсинолизу. К раствору добавляли 20 мкл 50 мМ раствора дитиотриэтола и повторяли инкубирование. Затем в смесь добавляли 20 мкл 150 мМ йодацетамида и инкубировали на шейкере при 40 °C со скоростью 250 об/мин в темноте. По прошествии 10 мин в раствор добавляли 800 мкл 0,1 М раствора гидрокарбоната аммония (pH = 8,0) и 10 мкл раствора трипсина (1 мг/мл в 0,1 М растворе гидрокарбоната аммония, pH = 8,0). Полученную смесь инкубировали в течение ночи. По прошествии необходимого времени в смесь добавляли 20 мкл гексафтормасляной кислоты, центрифугировали 15 мин при 4 °C со скоростью 13 400 об/мин и подвергали твердофазной экстракции (ТФЭ).

При пробоподготовке образца для хроматографии (ТФЭ) колонки уравнивали путем последовательного нанесения 2 мл ацетонитрила, 2 мл воды и 0,5 мл 10 мМ раствора гамма-аминомасляной кислоты. Затем на колонку наносили подкисленный супернатант (pH = 5,0) после центрифугирования (15 мин при 4 °C, скорость 13 400 об/мин). После прохождения образца через колонку ее промывали 0,5 мл 0,7 %-ного раствора муравьиной кислоты и 0,5 мл дистиллированной воды. Затем колонку просушивали током воздуха в течение 10–15 мин (использовался вакуумный насос с рабочим давлением 2,5–3 атмосферы). Элюирование образцов проводили 60 %-ным

раствором ацетонитрила в 0,1 М FABS-буфере (от *англ.* Formic Acid Buffer Solution) (pH = 2,0). Полученный элюат фильтровали через 0,2 мкм политетрафторэтиленовый фильтр и закалывали (5 мкл) в хроматограф. Для разделения и анализа пептидной смеси использовали высокоэффективный хроматограф (Agilent-1290, США) с tandemным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором (Agilent, США). Разделение проводили на колонке ZORBAX Extend-C18 (длина – 50 мм, внутренний диаметр – 2,1 мм, диаметр пор – 1,8 мкм) в градиенте:

0 мин – 1,5 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 98,5 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты;

1 мин – 1,5 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 98,5 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты;

35 мин – 25 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 75 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты;

45 мин – 40 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 60 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты;

50 мин – 90 % ацетонитрила + 0,1 % муравьиной кислоты, 10 % деионизированной воды + 0,1 % муравьиной кислоты.

Длительность анализа – 55 мин, кондиционирование колонки – 5 мин, объем вводимой пробы – 17 мкл. Для анализа данных был использован алгоритм, учитывающий все вышеописанные нюансы статистической обработки протеомных данных.

Относительное содержание белков оценивали с помощью нормирования общего количества белка в пробоподготовке после их осаждения из раствора, используя метод Лоури и метод метанол-хлороформной преципитации [9]. В качестве дополнительного инструмента нормирования использовали нормализацию к белкам «домашнего хозяйства». Количество последних было усреднено путем вычисления среднего арифметического совокупной интенсивности пептидов, относящихся к одному белку [10].

Результаты и их обсуждение. Результаты протеомного профилирования бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* дикого типа и полученных ранее мутантных штаммов, способных к сверхпродукции феназиновых антибиотиков, приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Уровни продукции феназиновых антибиотиков у штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

T a b l e 1. Phenazine antibiotics production levels at *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains

Штамм	Уровень продукции феназинов, мг/л	Ссылка
В-162	75 ± 15	Коллекция кафедры генетики БГУ
В-162/18	410 ± 26	[7]
В-162/55	210 ± 19	[6]
В-162/255	420 ± 29	[6]
В-162/17	210 ± 25	[6]
В-162/15	2100 ± 81	[6]
В-162/2	2850 ± 67	[6]

П р и м е ч а н и е. Значения уровней продукции приведены при выделении антибиотиков с помощью метода хлороформной экстракции [11]. Порядок штаммов в таблице отражает последовательность их получения и взаимосвязь между штаммами.

Особый интерес представляют белки, принимающие участие в синтезе бактериальными клетками феназиновых антибиотиков (Phz-белки). Известно, что гены, ответственные за синтез этих соединений, организованы в оперон (*phz*-оперон) [12]. Кроме того, некоторые гены, продукты которых относятся к ферментам модификации феназин-1-карбоксилата, являющегося базовым феназином (например, PhzO-белок), располагаются вне оперона [12].

Известно, что накопление феназиновых антибиотиков в культуральной жидкости бактерий рода *Pseudomonas* происходит в стационарную фазу роста (на 4–6-е сутки культивирования

в среде PCA (от *англ.* Phenazine-1-Carboxylic Acid induction medium) [13]). Однако на сегодняшний день в литературе нет сведений о том, когда именно начинается образование ферментов, участвующих в процессе их синтеза. Высказано предположение, что синтез продуктов отдельных генов *phz*-оперона, а также продуктов ряда других генов, функционально связанных с синтезом феназинов, у штаммов-продуцентов (т. е. мутантных штаммов) может начинаться уже в логарифмической фазе (*log*-фазе) роста культуры. Для проверки этого предположения нами проведен протеомный анализ бактерий дикого типа *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* и полученных на их основе мутантных штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков (табл. 1), находящихся в *log*-фазе роста.

В результате проведения протеомного анализа штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков (табл. 1) для каждого из исследованных образцов в высоком качестве были получены и идентифицированы 144 белка. Анализ интенсивности сигнала, который коррелирует с содержанием того или иного белка в образце, показал, что исследуемые штаммы имеют существенные различия как по качественному составу белков, задействованных в синтезе феназиновых антибиотиков, так и по количественному их содержанию.

Так, у штамма В-162 содержание фермента (продукт гена *phzO*), ответственного за превращение феназин-1-карбоксилата в 2-оксифеназин и 2-оксифеназин-1-карбоксилат, достигает $44,9 \cdot 10^4$ отн. ед. (рис. 1). Ген, кодирующий соответствующий белок, располагается за пределами *phz*-оперона.

Примечательно, что по результатам ранее проведенного ВЭЖХ-анализа по изучению качественного состава феназинов, синтезируемых мутантными штаммами, было обнаружено, что у штамма В-162/55 содержание 2-окси-производных карбоксифеназина максимально и достигает 32 % от общего количества феназинов в комплексе, несмотря на относительно низкое содержание самого фермента (данные не опубликованы). У штамма В-162/255, к примеру, содержание данного фермента составляет $42,8 \cdot 10^4$ отн. ед., что, тем не менее, сопровождается падением уровня 2-окси-производных (суммарно до 24 % от общего количества феназинов в составе комплекса) и соответствует таковому для бактерий дикого типа (штамм В-162). Прямая зависимость между концентрацией 2-окси-производных и содержанием этого фермента не выявлена и у остальных изучаемых штаммов. Причиной этого, как указывалось выше, может быть его обособленное расположение вне *phz*-оперона, а также возможное участие в образовании 2-окси-производных феназин-1-карбоксилата других бактериальных ароматических монооксигеназ, к которым относится продукт гена *phzO*.

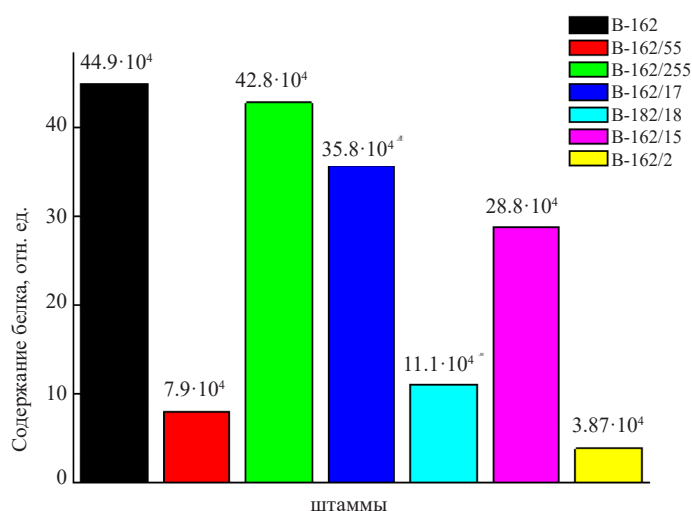


Рис. 1. Относительное содержание белка PhzO в клетках различных штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

Fig. 1. PhzO-protein relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers

Белки PhzA, PhzB. На логарифмической стадии роста культуры удалось детектировать и белки *phz*-оперона. Это свидетельствует о том, что экспрессия генов *phz*-оперона начинается уже в логарифмической стадии роста бактериальной культуры. В частности, были обнаружены белки PhzA и PhzB. Примечательно, что соответствующие белки присутствовали в клетках не всех штаммов. Так, PhzA-белок был обнаружен только у штаммов B-162/55 и B-162/2 (рис. 2).

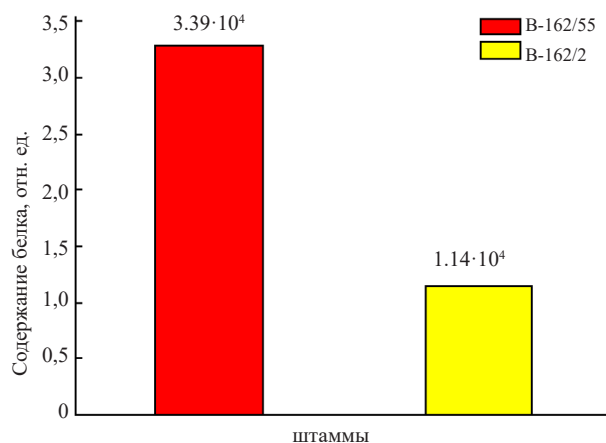


Рис. 2. Относительное содержание белка PhzA в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.
У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 2. PhzA-protein relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers.
No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

Белок PhzB обнаружен в протеоме как у бактерий дикого типа, так и у почти всех мутантных штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков (рис. 3). Следует отметить отсутствие данного белка именно у штаммов B-162/55 и B-162/2. Известно, что гены *phzA* и *phzB* представляют собой результат дупликации и демонстрируют сходство нуклеотидных последовательностей более чем на 80 % [14]. Высказываются предположения, что белки PhzA и PhzB формируют молекулярную платформу для сборки и последующего функционирования остальных ферментов пути биосинтеза феназинов [14]. Достоверно ответить на вопрос, почему изучаемые штаммы так отличаются по содержанию этих белков, пока не представляется возможным.

PhzD-белок. В клетках штамма B-162/2 обнаружен белок *phz*-оперона – PhzD. Данный белок является гомологом изохоризоматазы и осуществляет преобразование изохоризомата в транс-

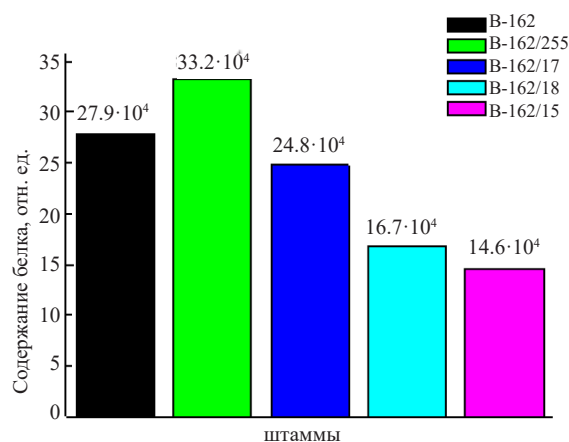


Рис. 3. Относительное содержание белка PhzB в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.
У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 3. PhzB-protein relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers.
No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

2,3-дигидро-3-оксиантранилат, который, в свою очередь, служит субстратом для PhzF-белка (продукта *phzF* гена) [14]. Однако в клетках остальных штаммов PhzD-белок не обнаружен.

Ферменты антиоксидантного комплекса. Полученные данные протеомного профилирования мутантных штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* позволили выявить и ряд других интересных закономерностей, которые могут являться причиной их способности к сверхпродукции феназинов. Хорошо известно, что штаммы-продуценты феназиновых антибиотиков обладают высоким уровнем активности антиоксидантных ферментов (каталазы, СОД) [15]. Это является одним из условий их выживания в условиях окислительного стресса, вызываемого сверхсинтезом собственных феназинов. При проведении протеомного анализа выявлен ряд других антиоксидантных ферментов, которые принимают участие в защите клеток-продуцентов от повышенных концентраций феназиновых антибиотиков. Так, установлено, что в клетках всех штаммов-продуцентов в высоких концентрациях присутствует один из ферментов алкилгидропероксид редуктазы (идентификационный номер A0A0E1E5S5_9PSED). Данный фермент отвечает за снижение в клетке уровня пероксида водорода и органических пероксидов [16]. Максимальное содержание этого фермента характерно для штамма дикого типа В-162 ($27,4 \cdot 10^4$ отн. ед.). У бактерий штамма В-162/255 уровень алкилгидропероксид редуктазы не превышает $9,13 \cdot 10^4$ отн. ед. У клеток штамма В-162/55 аналогичный показатель составляет $8,85 \cdot 10^4$ отн. ед., у штамма В-162/2, устойчивого к пероксиду водорода, – $0,57 \cdot 10^4$ отн. ед. Однако все штаммы-сверхпродуценты, в отличие от штаммов дикого типа, характеризуются повышенной активностью фермента каталазы [15], которая приводит к снижению концентрации пероксида водорода в клетках бактерий и во внеклеточной среде. Более низкие концентрации пероксида водорода, по-видимому, и обуславливают снижение содержания алкилгидропероксид редуктазы.

Выявлена тенденция к увеличению содержания в клетках штаммов-продуцентов тиолпероксидазы. В протеоме штамма дикого типа обнаружить данный белок не удалось, в то время как практически у всех мутантных штаммов его содержание варьировалось от $3,17 \cdot 10^4$ отн. ед. (В-162/255) до $2,21 \cdot 10^5$ отн. ед. (максимальное значение) у одного из самых продуктивных штаммов – В-162/15. Известно, что данный фермент также принимает участие в восстановлении пероксида водорода и органических пероксидов [16]. Некоторые штаммы-продуценты, в частности В-162/55, В-162/18, В-162/15 и штамм В-162/17, способный к синтезу феназинов на минимальных средах, демонстрируют значительное содержание глутаредоксина (рис. 4), однако прямой корреляции между уровнем продукции феназинов и содержанием глутаредоксина не выявлено.

В образцах, полученных из штамма дикого типа, глутаредоксин детектировать не удалось. В то же время у штамма В-162/17 данный показатель максимален и составляет $6,89 \cdot 10^4$ отн. ед.

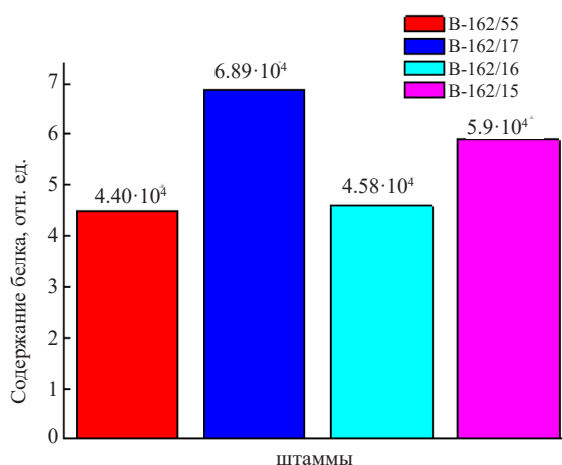


Рис. 4. Относительное содержание глутаредоксина в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.
У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 4. Glutaredoxin relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers.
No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

Этот белок относится к классу тиолтрансфераз и представляет собой один из элементов глутатионовой системы. Основная его функция в клетках бактерий заключается в детоксикации мышьяка и пероксидов, а также в восстановлении белков, поврежденных в результате окислительного стресса [17].

Похожие функции выполняет и пероксиредоксин [18]. В отличие от глутаредоксина, данный белок был обнаружен и в клетках В-162 (дикий тип). Однако взаимосвязи между содержанием этого белка и продуктивностью штамма не выявлено (рис. 5). Так, штамм В-162/15, который имеет один из самых высоких уровней продукции феназиновых антибиотиков (2100 мг/мл), отличается невысоким содержанием пероксиредоксина, а у штамма дикого типа с относительно невысокой продуктивностью содержание данного белка, наоборот, максимально. Еще для одного сверхпродуктивного штамма В-162/2 (см. табл. 1) присутствие пероксиредоксина не зафиксировано, равно как и для штаммов со значительно меньшим уровнем продукции феназинов (к примеру, для штаммов В-162/17 и В-162/255).

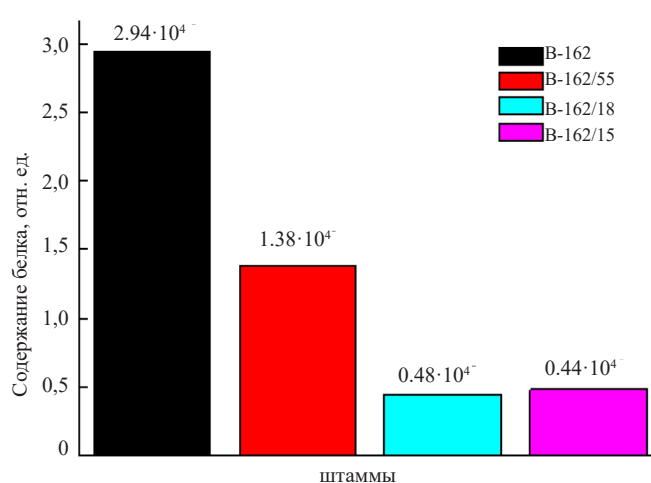


Рис. 5. Относительное содержание пероксиредоксина в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.
У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 5. Peroxiredoxin relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers.
No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

Серин-гидроксиметил трансфераза (СГТ), еще один обнаруженный фермент, принимает участие в защите макромолекул клетки от окислительного стресса [19]. Этот белок был выявлен только в протеоме наиболее продуктивных мутантных штаммов В-162/2 и В-162/15, селекционированных на устойчивость к пероксиду водорода, в практически равном соотношении. В реакции ретроальдольного расщепления СГТ превращает серин в глицин, одновременно перенося метильную группу на остаток фолиевой кислоты. Реакция СГТ является основным источником метильных групп для фолатного цикла. Глицин и фолиевая кислота принимают участие в синтезе пуринов и пиримидинов, а также липидов, помогая восстановить пул данных молекул после их повреждения активными формами кислорода [20].

Значительные концентрации одного из фосфат-связывающих белков (код доступа A0A089Y9J3) зарегистрированы у штаммов, способных к сверхпродукции феназинов. Этот белок обеспечивает устойчивость бактериальных клеток к окислительному стрессу в макрофагах [21]. Основным веществом, образующимся в макрофагах и используемым данным типом клеток для разрушения клеточной стенки бактерий, является пероксид водорода. Согласно данным, полученным нами ранее, это же соединение массово генерируется и при продукции феназиновых антибиотиков [15].

Представляет интерес и такой белок, как ферритин, который может принимать участие в защите клетки от последствий окислительного стресса. Известно, что при высоких концентрациях пероксида водорода железо, присутствующее в цитоплазме бактериальных клеток, может быть

окислено до наиболее токсичной его формы – Fe^{2+} . В живых системах имеются механизмы детоксикации Fe^{2+} и его удаления из цитозоля. Эти механизмы включают окисление избыточных Fe^{2+} до состояния Fe^{3+} и накопление ионов трехвалентного железа в ферритиноподобных белках. Ферритин способен связывать Fe^{3+} [22]. Примечательно, что данный белок обнаружен у всех штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков, за исключением B-162/2 и B-162/18. У штамма B-162/255 его концентрация максимальна и составляет $6,04 \cdot 10^5$ отн. ед., что почти в 3 раза выше, чем у штаммов дикого типа.

Таким образом, четко прослеживается тенденция к накоплению штаммами-продуцентами феназиновых антибиотиков пептидов и ферментов систем антиоксидантной защиты, нейтрализующих пероксид водорода. Ранее нами было показано, что у штаммов-продуцентов происходит активация ряда антиоксидантных ферментов, в частности каталазы [15]. На основании этого было сделано заключение, что в клетках продуцентов при массовом синтезе феназинов происходит накопление именно пероксида водорода, который является основной формой активного кислорода, обеспечивающей антимикробную активность феназинов бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* [15]. Полученные данные протеомного анализа дополнительно подтверждают сделанные ранее выводы. Однако разные штаммы, по-видимому, используют различные комбинации пептидов и ферментов антиоксидантной защиты для обеспечения устойчивого роста культуры продуцента в условиях повышенного содержания пероксида водорода. Этим, вероятно, и объясняется отсутствие в ряде случаев прямой корреляции между уровнем синтеза феназиновых антибиотиков у отдельного штамма-продуцента и уровнем их синтеза у конкретного белка.

Шапероны. Примечательно, что единственным из обнаруженных шаперонов, содержание которого максимально в клетках штамма дикого типа, является шаперон HSP60 (GroEL) (рис. 6, а). Этот белок, являясь одним из ключевых шаперонов бактериальной клетки, обеспечивает микроокружение, в котором осуществляется фолдинг белков [23]. У штамма B-162/55 по сравнению со штаммом дикого типа в 2 раза возрастает количество шаперона DnaK (рис. 6, б). Данный белок также относится к ключевым шаперонам бактериальных клеток [23]. Механизм действия DnaK заключается в связывании и защите отдельных участков белковых цепей, которые еще не подверглись фолдингу или были уложены лишь частично. Совместно с белком ClpV шаперон DnaK принимает участие в реактивации белков, агрегировавших после нагревания [23]. Существенное увеличение содержания базовых шаперонов в протеомах мутантных штаммов-продуцентов может являться адаптивным механизмом, направленным на защиту внутриклеточных белков и пептидов и на восстановление их нативной структуры даже в присутствии значительного количества активных форм кислорода, образующихся в клетках продуцентов под действием феназинов (рис. 6).

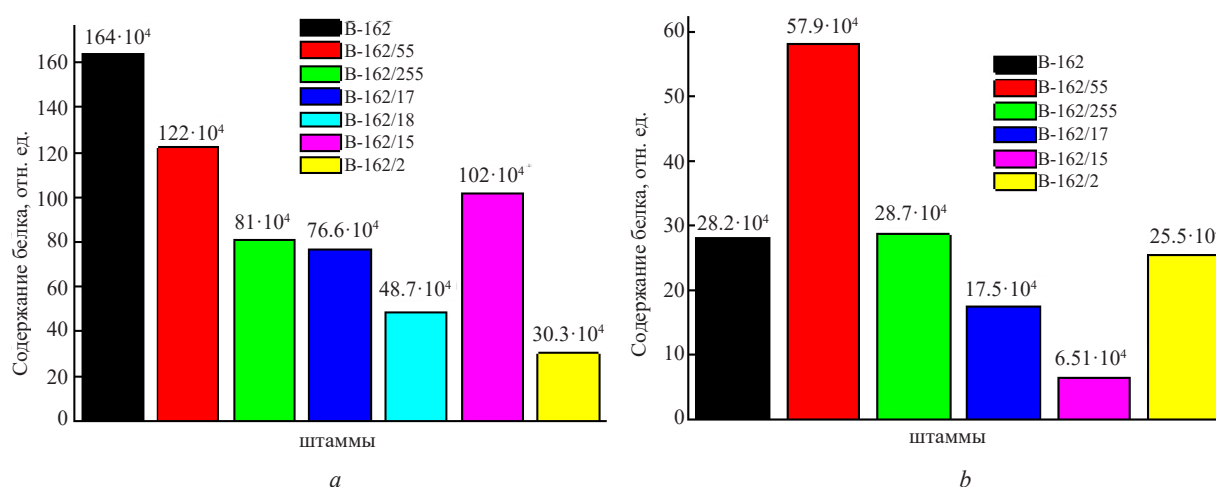


Рис. 6. Относительное содержание HSP60 (а) и DnaK (б) в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

Fig. 6. The relative content of HSP60 (a) and DnaK (b) in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers

Обнаружен также шаперон Skp, принимающий участие в образовании белков внешней мембраны. Этот шаперон инкапсулирует частично свернутые белки внешней мембраны, защищая их от водной среды во время транспортировки по цистернам шероховатого эндоплазматического ретикулума и включения в липидные блоки. Он обеспечивает укладку растворимых белков в бактериальной периплазме, способствуя таким образом увеличению выхода рекомбинантных белков и факторов вирулентности бактерий [24]. Данный шаперон встречается в наибольшем количестве у штаммов B-162/15 ($8,04 \cdot 10^4$ отн. ед.) и B-162/255 ($9,09 \cdot 10^4$ отн. ед.), но отсутствует у штамма дикого типа.

Пептидилпролил-изомераза. У штаммов-продуцентов регистрируется также фермент пептидилпролил-изомеразы, тогда как в клетках штамма дикого типа этот белок не детектируется (рис. 7). Пептидилпролил-изомераза контролирует лимитирующий этап белкового фолдинга по пептидильным связям, предшествующим остаткам пролина. Обнаружено, что белки данного класса помимо непосредственной химической активности участвуют во множестве биологических процессов, таких как экспрессия генов, передача сигналов, секреция белков, развитие и регенерация тканей (у эукариот), а также могут служить факторами вирулентности у некоторых патогенных штаммов микроорганизмов [25]. Повышение концентрации этого белка наряду с описанным выше повышением концентрации шаперонов, участвующих в фолдинге белковых молекул, дополнительно подтверждает вывод о том, что одной из предпосылок сверхпродукции феназинов у штаммов-продуцентов может являться повышение эффективности систем восстановления и поддержания нативной конформации белковых молекул.

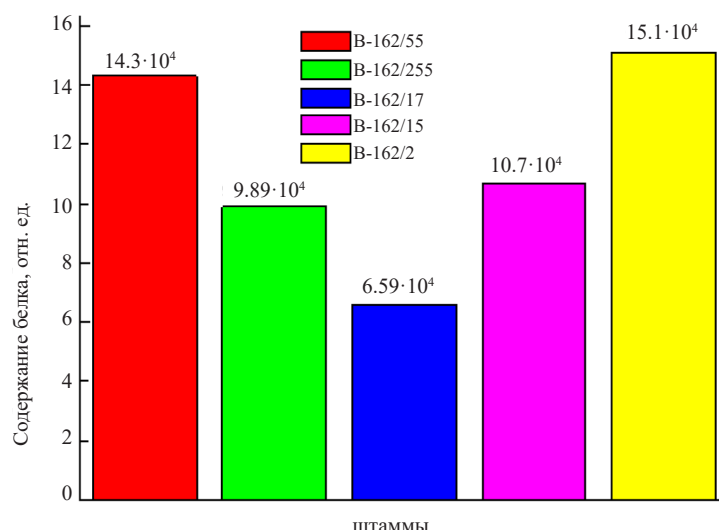


Рис. 7. Относительное содержание пептидилпролил-изомеразы в штаммах *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.
У остальных штаммов белок не обнаружен

Fig. 7. Peptide-propyl isomerase relative content in different *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains-producers.
No protein was found in the remaining strains that was not given at figure

Ssb-белки. В ходе протеомного анализа установлено, что у некоторых штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков (к примеру, B-162/255) увеличивается концентрация в их клетках Ssb-белков. Известно, что эти белки принимают участие не только в процессах репликации и рекомбинации, но и в процессах репарации, в частности в процессах репарации двунитевых разрывов ДНК [26]. Активные формы кислорода при их избыточном содержании в клетках являются одним из ключевых факторов, вызывающих повреждения молекул ДНК. Увеличение концентрации Ssb-белков служит маркером более активных репаративных процессов, что является важным условием выживания штаммов-продуцентов феназиновых соединений. На этот факт косвенно может указывать и повышение содержания фермента инозин-5-монофосфат дегидрогеназы у одного из наиболее продуктивных штаммов – B-162/255. Данный фермент ответственен за биосинтез пуриновых нуклеотидов, в первую очередь гуанина [27]. Кроме того, бактерии

штамма В-162/255 отличаются присутствием в их клетках белка бетаин-альдегид дегидрогеназы, которая полностью отсутствует у всех остальных штаммов, в том числе у штамма дикого типа В-162. Следует отметить, что наличие в геноме гена, кодирующего данный белок, характерно не только для *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, но и для других представителей рода *Pseudomonas*. Однако экспрессии гена у бактерий дикого типа и остальных мутантных штаммов либо не происходит, либо концентрация белка настолько низка, что находится на недетектируемом уровне. Бетаин-альдегид дегидрогеназа обеспечивает представителям рода адаптацию к осмотическому стрессу [28], однако ее роль в повышении продуктивности штамма не ясна.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать заключение, что у штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков повышение концентрации ряда антиоксидантных ферментов и пептидов, связывающих активные формы кислорода, а также других протекторных белков происходит непосредственно до начала продукции феназиновых соединений. Это свидетельствует о том, что феназины сами по себе не являются индукторами активации защитных систем, а их способность к повышенной продукции обеспечивается масштабными изменениями в метаболизме продуцентов, что позволяет им противостоять высоким концентрациям собственных феназинов. Вторым важным заключением, которое следует из полученных данных, является то, что каждый штамм для защиты от высоких концентраций пероксида водорода и других активных форм кислорода, которые образуются в присутствии феназиновых соединений, по-видимому, использует индивидуальную комбинацию пептидов и ферментов системы антиоксидантной защиты. Таким образом, устойчивость каждого конкретного штамма является результатом уникального сочетания отдельных белков, тогда как общая тенденция на активизацию защитных систем сохраняет свою актуальность. В табл. 2 систематизированы данные по каждому штамму, которые позволяют составить представление о составе защитного комплекса для каждого из полученных продуцентов.

Т а б л и ц а 2. Состав защитного комплекса у штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

Table 2. Protection complex composition at *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains

Штамм	Белки и их активность	Активируемые процессы
В-162	Алкилгидропероксид редуктазы, пероксиредоксин, фосфат-связывающий белок, шаперон HSP60	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода, восстановление структуры белковых молекул
В-162/55	Пептидилпролил-изомеразы, шапероны DnaK и GrpE	Восстановление структуры белковых молекул
В-162/255	Ферритин, шаперон Skp, инозин-фосфат дегидрогеназа, Ssb-белки Повышенный уровень удельной активности каталазы [14]	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода, восстановление структуры белковых молекул
В-162/17	Глутаредоксин	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода
В-162/2	Пептидилпролил-изомеразы, серин-гидроксиметил трансфераза Повышенный уровень удельной активности СОД [29]	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода, восстановление структуры белковых молекул, восстановление пула пуринов и пиримидинов после повреждения активными формами кислорода
В-162/15	Тиолпероксидаза, серин-гидроксиметил трансфераза Повышенный уровень удельной активности каталазы и СОД [29]	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода
В-162/18	Повышенный уровень активности каталазы [7]	Защита от повышенных концентраций пероксида водорода

Заключение. Полученные данные указывают на то, что способность к сверхсинтезу феназинов закреплена генетически, что подтверждается стабильной способностью продуцентов к сверхпродукции при полном отсутствии какого-либо селективного давления при многократном пассировании штаммов в неселективных условиях. В основе этой способности лежат два ключевых

механизма: первый – это снятие механизмов регуляции синтеза феназиновых соединений на генетическом уровне в результате целого комплекса мутаций в геноме штаммов-продуцентов, второй – селективно отобранный и генетически закрепленный комплекс мутаций, которые обеспечивают устойчивость штаммов-продуцентов к высокому уровню окислительного стресса, вызываемому собственными феназинами.

Список использованных источников

1. Возможности применения протеомного анализа в инфектологии / Н. С. Страшникова [и др.] // Бюл. Сибир. медицины. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 248–261.
2. Беспятых, Ю. А. Протеомные подходы в изучении микобактерий / Ю. А. Беспятых, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина // Acta Naturae. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 16–26.
3. A proteomics strategy for the analysis of bacterial biodegradation pathways / S. I. L. Kim [et al.] // OMICS: J. Integr. Biol. – 2007. – Vol. 11, N 3. – P. 280–294. <https://doi.org/10.1089/omi.2007.0019>
4. Proteomic analysis of bacterial response to a 4-hydroxybenzylidene indolinone compound, which re-sensitizes bacteria to traditional antibiotics / C. Opoku-Temeng [et al.] // J. Proteomics. – 2019. – Vol. 202. – Art. 103368. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.04.018>
5. Synthesis of dibenzo[a,j]phenazine compounds using hemicucurbit[6]uril-catalyzed oxidative dimerization of 2-aryl-amines / Heng Li [et al.] // ChemCatChem. – 2020. – Vol. 12, N 22. – P. 5727–5732. <https://doi.org/10.1002/cctc.202000956>
6. Veremeenko, E. G. Creation and characterization of regulatory mutants of *Pseudomonas aurantiaca* B-162 resistant to toxic analogues of aromatic amino acids / E. G. Veremeenko // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution: materials of III Int. conf. of young scientists. – 2007. – P. 231–232.
7. Veremeenko, E. G. Increase of phenazine antibiotic production in bacteria *Pseudomonas aurantiaca* by cloning the cluster of PhzIR-genes / E. G. Veremeenko, N. P. Maksimova // Adv. Med. Biol. – 2012. – Vol. 50. – P. 195–206.
8. Statistical approach to protein quantification / S. Gerster [et al.] // Mol. Cell Proteomics. – 2014. – Vol. 13, N 2. – P. 666–677. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.025445>
9. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, N 1. – P. 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
10. Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa* / B. Alqarni [et al.] // J. Microbiol. Meth. – 2016. – Vol. 127. – P. 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.008>
11. Levitch, M. E. A study of the biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid. / M. E. Levitch, E. R. Stadtman // Arch. Biochem. Biophys. – 1964. – Vol. 106. – P. 194–199. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
12. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas spp.* biosynthesis and regulation / D. V. Mavrodi [et al.] // Ann. Rev. Phytopathol. – 2006. – Vol. 44. – P. 417–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>
13. Price-Whelan, A. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics / A. Price-Whelan, L. E. P. Dietrich, D. K. Newman // Nat. Chem. Biol. – 2006. – Vol. 2, N 2. – P. 71–78. <https://doi.org/10.1038/nchembio764>
14. Of two make one: the biosynthesis of phenazines / M. Mentel [et al.] // ChemBioChem. – 2009. – Vol. 10, N 14. – P. 2295–2304. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900323>
15. Veremeenko, E. G. Activation of the antioxidant complex in *Pseudomonas aurantiaca* – producer of phenazine antibiotics / E. G. Veremeenko, N. P. Maksimova // Microbiology. – 2010. – Vol. 79, N 4. – P. 439–444. <https://doi.org/10.1134/S0026261710040041>
16. A comparison of thiol peroxidase mechanisms / L. Flohé [et al.] // Antioxid. Redox Signal. – 2011. – Vol. 15, N 3. – P. 763–780. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3397>
17. Comparative analysis of glutaredoxin domains from bacterial opportunistic pathogens / T. Leeper [et al.] // Acta Crystallographica. Sec. F, Struct. boil. crystal. comm. – 2011. – Vol. 67, N 9. – P. 1141–1147. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
18. Dubbs, J. M. Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense / J. M. Dubbs, S. Mongkolsuk // Peroxiredoxin Systems. – 2007. – Vol. 44. – P. 143–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_7
19. Metabolic flux ratio analysis and multi-objective optimization revealed a globally conserved and coordinated metabolic response of *E. coli* to paraquat-induced oxidative stress / T. Shen [et al.] // Mol. Biosyst. – 2013. – Vol. 9, N 1. – P. 121–132. <https://doi.org/10.1039/c2mb25285f>
20. Mullarky, E. Diverting glycolysis to combat oxidative stress / E. Mullarky, L. C. Cantley // Innovative Medicine: Basic Research and Development / eds. : K. Nakao, N. Minato, S. Uemoto. – Tokyo, 2015. – P. 3–23.
21. Characterization of two signal transduction systems involved in intracellular macrophage survival and environmental stress response in *Enterococcus faecalis* / C. Muller [et al.] // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 14. – P. 59–66. <https://doi.org/10.1159/000106083>
22. Alkhateeb, A. A. Nuclear ferritin: a new role for ferritin in cell biology / A. A. Alkhateeb, J. R. Connor // Biochim. Biophys. Acta. Gen. Sub. – 2010. – Vol. 1080, N 8. – P. 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.017>
23. Lund, P. A. Microbial molecular chaperones / P. A. Lund // Adv. Microb. Physiol. – 2001. – Vol. 44. – P. 93–140. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(01\)44012-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(01)44012-4)
24. The Skp chaperone helps fold soluble proteins *in vitro* by inhibiting aggregation / C. Chang [et al.] // Biochemistry. – 2012. – Vol. 51, N 24. – P. 4822–4834. <https://doi.org/10.1021/bi300412y>

25. Ünal, C. M. Microbial peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (ppiases): virulence factors and potential alternative drug targets / C. M. Ünal, M. Steinert // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2014. – Vol. 78, N 3. – P. 544–571. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-14>
26. Antony, E. Dynamics of *E. coli* single stranded DNA binding (SSB) protein-DNA complexes / E. Antony, T. M. Lohman // *Sem. Cell Develop. Biol.* – 2019. – Vol. 86. – P. 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2018.03.017>
27. Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5'-monophosphate dehydrogenase / R. Zhang [et al.] // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, N 15. – P. 4691–4700. <https://doi.org/10.1021/bi982858v>
28. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* / R. Velasco-García [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181, N 4. – P. 1292–1300. <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1292-1300.1999>
29. Полевой, С. А. Анализ активности ферментов антиоксидантного комплекса у бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*, устойчивых к пероксиду водорода / С. А. Полевой, Е. Г. Веремеенко // 75-я науч. конф. студентов и аспирантов Белорус. гос. ун-та : материалы конф., Минск, 14–23 мая 2018 г. : в 3 ч. / Белорус. гос. ун-т ; редкол. : В. Г. Сафонов (пред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Ч. 2. – С. 330–333.

References

1. Strashnikova N. S., Martynova G. P., Salmina A. B., Olovyannikova R. Ya., Kutyakov V. A., Tokhidpur A. Possibilities of using proteomic analysis in infectious diseases. *Byulleten' Sibirskoi meditsiny* [Bulletin of Siberian medicine], 2019, vol. 18, no. 2, pp. 248–261 (in Russian).
2. Bespyatykh Yu. A., Shitikov E. A., Il'ina E. N. Proteomic approaches in the study of mycobacteria. *Acta Naturae*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 16–26 (in Russian).
3. Kim S. I. L., Choi J. S., Kahng H. Y. A Proteomics strategy for the analysis of bacterial biodegradation pathways. *OMICS: Journal of Integrative Biology*, 2007, vol. 11, no. 3, pp. 280–294. <https://doi.org/10.1089/omi.2007.0019>
4. Opoku-Temeng C., Onyedibeb K. I., Aryalc U. K., Sintimb H. O. Proteomic analysis of bacterial response to a 4-hydroxybenzylidene indolinone compound, which re-sensitizes bacteria to traditional antibiotics. *Journal of Proteomics*, 2019, vol. 202, art. 103368. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.04.018>
5. Heng Li, Juan Yu, Qingmei Ge, Mao Liu, Zhu Tao, Hang Cong. Synthesis of dibenzo[a,j]phenazine compounds using hemicucurbit[6]uril-catalyzed oxidative dimerization of 2-arylamines. *ChemCatChem*, 2020, vol. 12, no. 22, pp. 5727–5732. <https://doi.org/10.1002/cctc.202000956>
6. 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: materials of III International conference of young scientists*, 2007, pp. 231–232.
7. Veremeenko E. G., Maksimova N. P. Increase of phenazine antibiotic production in bacteria *Pseudomonas aurantiaca* by cloning the cluster of PhzIR-genes. *Advances in Medicine and Biology*, 2012, vol. 50, pp. 195–206.
8. Gerster S., Kwon T., Ludwig C., Matondo M., Vogel C., Marcotte E. M., Aebersold R., Bühlmann P. Statistical approach to protein quantification. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 666–677. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.025445>
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
10. Alqarni B., Colley B., Klebensberger Ja., McDougald D., Rice S. A. Expression stability of 13 housekeeping genes during carbon starvation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, vol. 127, pp. 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.008>
11. Levitch M. E., Stadtman E. R. A study of the biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid. *Archive Biochemica et Biophysica*, 1964, vol. 106, pp. 194–199. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
12. Mavrodi D. V., Blankenfheldt W., Thomashow L. S., Mentel M. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, vol. 44, pp. 417–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.013106.145710>
13. Price-Whelan A., Dietrich L. E. P., Newman D. K. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Natural Chemical Biology*, 2006, vol. 2, no. 2, pp. 71–78. <https://doi.org/10.1038/nchembio764>
14. Mentel M., Ahuja E. G., Mavrodi D. V., Breinbauer R., Thomashow L. S., Blankenfheldt W. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem*, 2009, vol. 10, no. 14, pp. 2295–2304. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900323>
15. Veremeenko E. G., Maksimova N. P. Activation of the antioxidant complex in *Pseudomonas aurantiaca* – producer of phenazine antibiotics. *Microbiology*, 2010, vol. 79, no. 4, pp. 439–444. <https://doi.org/10.1134/S0026261710040041>
16. Flohé L., Toppo S., Cozza G., Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, vol. 15, no. 3, pp. 763–780. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3397>
17. Leeper T., Zhang S., Van Voorhis W. C., Myler P. J., Varani G. Comparative analysis of glutaredoxin domains from bacterial opportunistic pathogens. *Acta Crystallographica, Section F, Structural biology and crystallization communications*, 2011, vol. 67, no. 9, pp. 1141–1147. <https://doi.org/10.1107/S1744309111012346>
18. Dubbs J. M., Mongkolsuk S. Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense. *Peroxiredoxin Systems*, 2007, vol. 44, pp. 143–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_7
19. Shen T., Rui B., Zhou H., Zhang X., Yi Y., Wen H., Shi Y. Metabolic flux ratio analysis and multi-objective optimization revealed a globally conserved and coordinated metabolic response of *E. coli* to paraquat-induced oxidative stress. *Molecular BioSystems*, 2013, vol. 9, no. 1, pp. 121–132. <https://doi.org/10.1039/c2mb25285f>

20. Mullarky E., Cantley L. C. Diverting glycolysis to combat oxidative stress. *Innovative Medicine: Basic Research and Development*. Tokyo, 2015, pp. 3–23.
21. Muller C., Sanguinetti M., Riboulet E., Hubert L., Posteraro B., Fadda G., Auffray Y., Rinc A. Characterization of two signal transduction systems involved in intracellular macrophage survival and environmental stress response in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiological Biotechnology*, 2008, vol. 14, pp. 59–66. <https://doi.org/10.1159/000106083>
22. Alkhateeb A. A., Connor J. R. Nuclear ferritin: a new role for ferritin in cell biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 2010, vol. 1080, no. 8, pp. 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.017>
23. Lund P. A. Microbial molecular chaperones. *Advances in Microbiological Physiology*, 2001, vol. 44, pp. 93–140. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(01\)44012-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(01)44012-4)
24. Chang C., Myhre R. O., McCallum K. C., Maynard J. A., Entzminger K. C. The Skp chaperone helps fold soluble proteins *in vitro* by inhibiting aggregation. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, no. 24, pp. 4822–4834. <https://doi.org/10.1021/bi300412y>
25. Ünal C. M., Steinert M. Microbial peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases (ppiases): virulence factors and potential alternative drug targets. *Microbiology Molecular Biology Review*, 2014, vol. 78, no. 3, pp. 544–571. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-14>
26. Antony E., Lohman T. M. Dynamics of *E. coli* single stranded DNA binding (SSB) protein-DNA complexes. *Seminars of Cell Development Biology*, 2019, vol. 86, pp. 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2018.03.017>
27. Zhang R., Evans G., Rotella F. J., Westbrook E. M., Beno D., Huberman E., Chimiak A. J., Collart F. R. Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5'-monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, no. 15, pp. 4691–4700. <https://doi.org/10.1021/bi982858v>
28. Velasco-García R., Mújica-Jiménez C., Mendoza-Hernández G., Muñoz-Clares R. A. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1999, vol. 181, no. 4, pp. 1292–1300. <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1292-1300.1999>
29. Polevoi S. A., Veremeenko E. G. Analysis of the activity of enzymes of the antioxidant complex in the bacteria *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* resistant to hydrogen peroxide. *75-ya nauchnaya konferentsiya studentov i aspirantov Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta: materialy konferentsii (Minsk, 14–23 maya 2018 g.)*. Chast' 2 [The 75th scientific conference of students and postgraduates of the Belarusian State University: conference proceedings (Minsk, May 14–23, 2018). Part 2]. Minsk, 2018, pp. 330–333 (in Russian).

Информация об авторах

Веремеенко Екатерина Геннадьевна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: veremeenkoKatya@yandex.ru

Шапиро Михаил Анатольевич – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shapiromihailanatolevich@gmail.com

Наумовская Ольга Алексеевна – магистрант. Вроцлавский университет естественных наук (Agencja Rozwoju Aglomeracji Wrocławskiej SA pl. Solny 14, 50-062 Wrocław). E-mail: nnn060399@tut.by

Ашманкевич Денис Дмитриевич – специалист. Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении (Товарищеский пер., 2а, 220037, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: denis.ashmankevich@gmail.com

Максимова Наталья Павловна – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nataliamaximova@yahoo.com

Information about the authors

Katsiaryna G. Verameyenka – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: veremeenkoKatya@yandex.ru

Michail A. Shapira – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shapiromihailanatolevich@gmail.com

Volga A. Naumouskaya – Undergraduate. Wrocław University of Natural Sciences (Agencja Rozwoju Aglomeracji Wrocławskiej SA pl. Solny 14, 50-062 Wrocław). E-mail: nnn060399@tut.by

Denis D. Ashmankevich – specialist. Center for Examinations and Tests in Health Service Republican Unitary Enterprise (2a, Tovarishcheski Lane, 220037, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: denis.ashmankevich@gmail.com

Natalia P. Maximova – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nataliamaximova@yahoo.com