

УДК 579.842.21:577.152.314:577.151.52

БИОСИНТЕЗ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *SERRATIA MARCESCENS* В ПРИСУТСТВИИ ПУРИНОВ И ИНГИБИТОРА ИХ БИОСИНТЕЗА

Р. Шах Махмуд, М.Н. Филимонова

Аннотация

Показано, что добавление в полноценную синтетическую среду аденозина, или аденина, или инозина, или гуанина, или гуанозина вместе с ингибитором биосинтеза пуринов 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазолом приводит к снижению биосинтеза и продуктивности эндонуклеазы *Serratia marcescens*, возрастающих под действием 2-ПАБСТ. Наибольший эффект отмечен для гуанина или гуанозина, наименьший – для аденозина. Предполагается участие эндонуклеазы в пуриновом обмене бактерий *Serratia marcescens* и наличие альтернативного общеизвестному пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов, при котором бактерии синтезируют необходимые нуклеотиды не de novo, а из интермедиатов, образуемых в ходе деградации нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, эндонуклеаза, биосинтез, 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазол, норсульфазол, пурины, альтернативный путь биосинтеза пуринов.

Введение

Внеклеточная эндонуклеаза (КФ 3.1.30.2) грамотрицательных бактерий *S. marcescens* является одним из наиболее изученных ферментов [1]. Известно, что биосинтез эндонуклеазы увеличивается в ответ на повреждение ДНК клеток и блокирование ее репликации [2–5]. Недавно нами было показано, что биосинтез и продуктивность эндонуклеазы можно увеличить, ингибируя биосинтез пуринов. Исходя из этого мы предположили, что пурины, образуемые с участием эндонуклеазы при гидролизе нуклеиновых кислот, могут восполнить недостаток пуринов, связанный с блокированием их биосинтеза. В таком случае добавление в полноценную синтетическую среду пуринов на фоне блокирования их биосинтеза, вероятно, должно было оказывать репрессирующее действие на биосинтез эндонуклеазы и снижать ее продуктивность. Проверка выдвинутого предположения стала целью исследования, в ходе которого была проведена оценка биосинтеза и продукции эндонуклеазы в присутствии и отсутствии экзогенных пуринов и 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола, который использовали для подавления биосинтеза пуринов.

Материалы и методы

В исследовании использовали бактерии *S. marcescens* W1050, любезно предоставленные профессором университета г. Хьюстона (США) М. Бенедиком.

Культуру выращивали 36 ч при 37 °С и принудительной аэрации (200 об/мин) в отсутствие пуринов (контроль) или в присутствии аденина, аденозина, гуанина, гуанозина или инозина (опыт) на среде следующего состава (г/л): NaCl – 4.7, NH₄Cl – 1.1, Na₂SO₄ – 0.4, MgCl₂ – 0.95, K₂HPO₄·3H₂O – 2.8, глюкоза – 5, гидролизат казеина – 1, дрожжевой экстракт – 3. Пурины добавляли в питательную среду непосредственно перед посевом микроорганизмов до конечной концентрации 0.0005%, предварительно приготовив их 1%-ные водные растворы с нагреванием на кипящей водяной бане и соблюдением правил антисептики. Заранее приготовленный с учетом рекомендаций [6] водный раствор 6.66%-ного 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола (2-ПАБСТ, ICN, США), дополнительно включающий 0.25 М Na₂CO₃ (рН раствора 9.0), добавляли в питательную среду перед внесением посевного материала до конечной концентрации 0.1%.

Посевной материал, которым служила культура в стадии стационарного роста (12 ч), вносили в свежую среду до оптической плотности 0.16–0.2, которую определяли нефелометрически на КФК-2 при 590 нм. Аликвоты отбирали каждые 1–3 ч в зависимости от фазы роста культуры.

Прирост биомассы измеряли по оптической плотности. За единицу оптической плотности принимали такое светорассеяние, которое при длине волны 590 нм и длине оптического пути 1 см составляло величину, равную 1.

Получение периплазмы проводили, взяв за основу ранее опубликованный метод [7, р. 78–79] и внося необходимые изменения. Для этого бактериальные клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием в течение 10 мин при 12000 об/мин. Для удаления с поверхности клеток следов внеклеточной эндонуклеазы клетки отмывали 4–5 раз 0.5%-ным NaCl, затем при 4 °С 2 раза 10 мМ Трис-НСl буфером (рН 8.0) и собирали каждый раз центрифугированием в течение 15 мин при 5000 об/мин. Для нарушения целостности наружной мембраны и клеточной стенки 10 мг сырой биомассы суспендировали в 0.8 мл раствора, состоящего из 30 мМ Трис-НСl буфера (рН 8.0) и 60%-ной сахарозы. К суспензии добавляли 20 мкл 0.7%-ного фенолметилсульфонилфторида, 33 мкл 0.25 М К-ЭДТА (рН 7.0) и 1.6 мг лизоцима, и инкубировали ее при комнатной температуре 30 мин. Подтверждением нарушения клеточной оболочки служило превращение клеток в сферопласты, которые определяли светлоступной микроскопией после предварительного окрашивания мазков по Граму. Образовавшиеся сферопласты отделяли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин. Для подтверждения сохранения целостности клеточной мембраны при отделении сферопластов определяли оптическую плотность надосадочной жидкости при 260 и 280 нм и соотношение полученных значений.

Для корректной оценки уровней содержания внеклеточной и внутриклеточной эндонуклеазы контролировали сохранение целостности клеточной оболочки при отделении бактериальных клеток от культуральной жидкости. Для этого анализировали динамику накопления маркерного белка – β-галактозидазы – в периплазме и культуральной жидкости, как было рекомендовано ранее [8].

Нуклеазную активность определяли методом кислоторастворимых фракций в соответствии с рекомендациями [9, 10].

Продуктивность культуры рассчитывали как отношение ферментативной активности к оптической плотности культуры.

Биосинтез эндонуклеазы определяли как сумму нуклеазной активности в культуральной жидкости и периплазме. Активность фермента в периплазме ($A_{\text{пп}}$) рассчитывали по следующей формуле:

$$A_{\text{пп}} = A \cdot 80 \cdot V_{\text{сыр}} / (0.01 \cdot V),$$

где A – активность образца, ед./мл; 80 – разбавление биомассы лизирующей смесью; $V_{\text{сыр}}$ – количество биомассы, выделенной из питательной среды, в мг; V – объем питательной среды (1.5 мл); 0.01 – 10 мг клеток.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью подпрограммы статистического анализа графической программы Sigma plot 8.0 (“Jandel Scientific Corporation”, США) и программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Как видно из рис. 1, *а*, присутствие в среде аденина, аденозина, гуанина, гуанозина или инозина не влияет на рост культуры, так как он был подавлен действием 0.1%-ного 2-ПАБСТ [11], по сравнению с ростом в отсутствие ингибитора. Напротив, добавление в среду одного из перечисленных пуринов отражалось на уровне нуклеазной активности в периплазме и культуральной жидкости. В частности, уровень нуклеазной активности в культуральной жидкости в присутствии пуринов увеличивался по сравнению с активностью в их отсутствие (рис. 1, *б*) и, наоборот, понижался в периплазме (рис. 1, *в*). В культуральной жидкости наибольшие изменения активности наблюдались под действием аденозина, в периплазме – под действием гуанина или гуанозина, показавших близкие результаты влияния.

Результаты анализа биосинтеза эндонуклеазы и продуктивности бактерий по этому ферменту представлены на рис. 2. Из рисунков видно, что присутствие в среде пуринов приводит к снижению количества эндонуклеазы, синтезированной за 36 ч роста культуры, и продукции этого фермента бактериями за тот же период роста. В частности установлено, что в присутствии аденозина количество синтезированной нуклеазы уменьшалось в 1.2 раза, а ее продукции – в 1.3 раза, аденина – в 1.8 и 1.5 раза, инозина – в 2.3 и 2.1 раза, гуанина – в 3 и 2.4 раза, гуанозина – 3.2 и 2.4 раза соответственно.

Ранее нами было установлено, что в присутствии 2-ПАБСТ за 36 ч роста культура *S. marcescens* W1050 синтезировала почти в 1.6 раза больше эндонуклеазы, чем в его отсутствие. При этом под действием 2-ПАБСТ продуктивность культуры по эндонуклеазе в целом возрастала примерно в 2.7 раза.

Наличие в среде пуринов не влияло на характер роста культуры, который был подавлен под действием сульфаниламидного препарата. Возможно, это обусловлено невысокой концентрацией пуринов (0.0005%), с одной стороны, и исследованием каждого из них в отдельности, с другой.

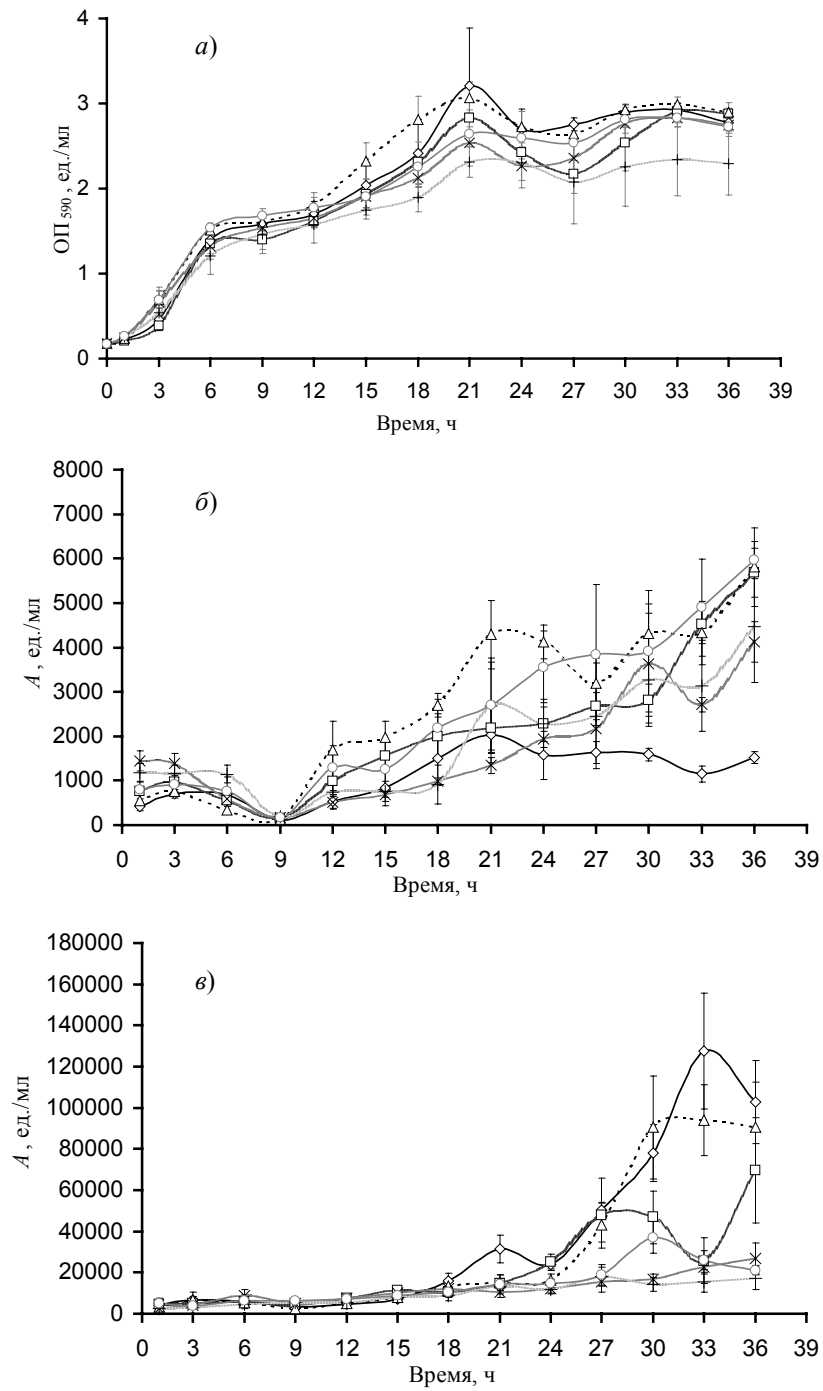


Рис. 1. Динамика роста (а) и накопления эндонуклеазы в культуральной жидкости (б) и периплазме (в) в отсутствие (—◇—) и присутствии аденина (—□—), аденозина (—Δ—), гуанина (—×—), гуанозина (—+—), инозина (—○—) в условиях блокирования биосинтеза пуринов

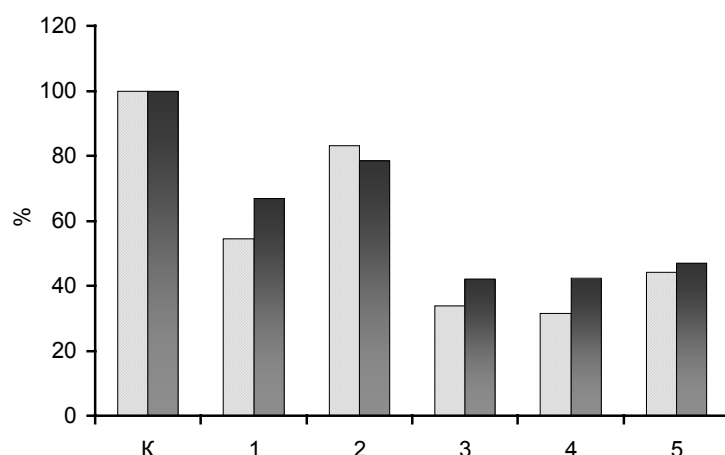


Рис. 2. Биосинтез (■) эндонуклеазы и продуктивность (■) бактерий по эндонуклеазе в отсутствие (К – контроль) и присутствии аденина (1), аденозина (2), гуанина (3), гуанозина (4), инозина (5) в условиях блокирования биосинтеза пуринов

Таким образом, нами показано, что добавление в полноценную синтетическую среду вместе с ингибитором биосинтеза пуринов аденозина, или аденина, или инозина, или гуанина, или гуанозина приводило к снижению биосинтеза и продуктивности эндонуклеазы, возраставших в их отсутствие под действием 2-ПАБСТ. Наибольший эффект наблюдали при добавлении гуанина или гуанозина, наименьший – в результате применения аденозина.

Полученные данные свидетельствовали в пользу возможного участия эндонуклеазы в пуриновом обмене у бактерий *Serratia marcescens* и наличия альтернативного общеизвестному пути биосинтеза пуриновых нуклеотидов, при котором бактерии синтезируют необходимые нуклеотиды не *de novo*, а из интермедиатов, образуемых в ходе дегградации нуклеиновых кислот [12–14].

Summary

R. Shah Mahmud, M.N. Filimonova. Biosynthesis of *Serratia marcescens* Endonuclease in the Presence of the Purines and Inhibitor of Purines Biosynthesis.

Adenine or adenosine or guanine or guanosine or inosine added to the synthetic medium with the inhibitor of purines biosynthesis 2-(para-aminobenzenesulfonamide)-thiazole was shown to cause a decreasing biosynthesis and production of *Serratia marcescens* endonuclease which used to increase upon the action of 2-(para-aminobenzenesulfonamide)-thiazole. The best effect was seen with guanine or guanosine the worst one – with adenosine. The endonuclease participation in purines metabolism and existence of the alternative pathway of purines biosynthesis are expected on the bases of the results.

Key words: *Serratia marcescens*, endonuclease, biosynthesis, 2-(para-aminobenzenesulfonamide)-thiazole, purines, alternative pathway of the purines biosynthesis.

Литература

1. Филимонова М.Н. Эндонуклеаза *Serratia marcescens* // Труды объедин. междунар. науч. конф. «Новая геометрия природы», Казань, 25 авг. – 5 сент. 2003 г. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2003. – С. 67–71.

2. Юсупова Д.В., Соколова Р.Б., Порфирьева О.В., Пономарева А.З. Индукция синтеза внеклеточной эндонуклеазы *Serratia marcescens* агентами, подавляющими репликацию ДНК // Микробиол. – 1991. – Т. 60, № 2. – С. 279–284.
3. Юсупова Д.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В., Пономарева А.З. Влияние налидиксовой кислоты и митомицина С на рост и биосинтез *Serratia marcescens* // Антибиотики и химиотерапия. – 1993. – Т. 38, № 8–9. – С. 16–21.
4. Friendhoff P., Kolmes B., Gimadutdinov O., Wende W., Krause K., Pingoud A. Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis // Nucl. Acids Res. – 1996. – V. 24, No 14. – P. 2632–2639.
5. Benedik M.J., Strych U. *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – V. 165, No 1. – P. 1–13.
6. Машиковский М.Д. Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей. – Кишинев: Картя молдовеняскэ, 1989. – 528 с.
7. Methods for general and molecular bacteriology / Eds. P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, N.R. Krieg. – American Society for Microbiology, 1994. – 800 p.
8. Богомольная Л.М. Влияние условий культивирования и некоторых экзогенных факторов на биосинтез и секрецию изоформ эндонуклеазы *Serratia marcescens*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Казань, 2000. – 20 с.
9. Nestle M., Roberts W. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*: I. Purification and some properties of the enzyme // J Biol Chem. – 1969. – V. 244, No 19. – P. 5213–5218.
10. Филимонова М.Н., Бенедик М.Дж. Нуклеаза *Serratia marcescens*. Отношение концентраций фермента и субстрата для проявления максимальной активности // Биохимия. – 1995. – Т. 60, № 9. – С. 1449–1500.
11. Старишинова Н.В., Филимонова М.Н. Особенности биосинтеза нуклеазы и роста *Serratia marcescens* в присутствии 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола // Микробиол. – 2005. – Т. 74, № 2. – С. 365–369.
12. Stuer-Larudsen B., Nygaard P. Purine salvage in two halophilic Archaea: Characterization of salvage pathways and isolation of mutants resistant to purine analogs // Bacteriol. – 1998. – V. 180, No 3. – P. 457–463.
13. Nyhan W.L. Nucleotide Synthesis via Salvage Pathway // Encyclopedia of Life Sciences. – John Wiley & Sons, Inc., 2005. – URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003909/abstract>.
14. Mendz G.L., Shepley A.J., Hazell S.L., Smith M.A. Purine metabolism and the microaerophily of *Helicobacter pylori* // Arch. Microbiol. – 1997. – V. 168, No 6. – P. 448–456.

Поступила в редакцию
19.01.10

Шах Махмуд Райхан – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: raihan.shah@gmail.com

Филимонова Мария Николаевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: maria.filimonova@ksu.ru