

УДК 579.842.21:577.152.314:577.151.52

**БИОСИНТЕЗ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *Serratia marcescens*
ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ БИОСИНТЕЗА ПУРИНОВ***Р. Шах Махмуд, М.Н. Филимонова***Аннотация**

Для исследования биосинтеза эндонуклеазы *Serratia marcescens* в условиях блокирования биосинтеза пуринов культуру выращивали в присутствии 0.1%-ного 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола и по мере роста оценивали синтез эндонуклеазы по ее активности в питательной среде и периплазме бактерий. Показано, что при добавлении в питательную среду 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола происходит качественное и количественное изменение динамики роста культуры *S. marcescens* W1050, увеличение биосинтеза и продукции эндонуклеазы, а также уменьшение доли внеклеточного и увеличение доли внутриклеточного фермента.

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

Введение

Внеклеточная эндонуклеаза (К.Ф.3.1.30.2) грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens* является наиболее изученным ферментом в ряду бактериальных нуклеаз с широкой специфичностью [1]. Несмотря на значительный прогресс в исследовании эндонуклеазы [2–6], биосинтез и секреция этого фермента изучены недостаточно. Известно, что секреция нуклеазы в окружающую среду обычно происходит во время стационарного роста культуры [7]. Биосинтез эндонуклеазы увеличивается при SOS-ответе клеток на повреждение ДНК и блокирование ее репликации [8, 9]. Установлено, что при ингибировании биосинтеза пуринов происходит угнетение роста бактерий, снижение биосинтеза и продукции внеклеточной эндонуклеазы и смещение пика ее активности на кривой накопления в питательной среде, а также в ответ на добавление 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола (2-ПАБСТ) наблюдается дополнительная секреция эндонуклеазы в окружающую среду [10]. Вместе с этим данных о биосинтезе эндонуклеазы в целом в ответ на блокирование биосинтеза пуринов нет, хотя известно, что секреция эндонуклеазы представляет собой двухэтапный процесс, в котором часть синтезированного фермента перед секрецией в окружающую среду задерживается в периплазме на продолжительное время. Поскольку блокирование биосинтеза пуринов, вероятно, замедляет репликацию ДНК, мы предположили, что, по аналогии с SOS-ответом клетки, это может вызвать усиление биосинтеза эндонуклеазы. Таким образом, определение особенностей биосинтеза эндонуклеазы в условиях блокирования биосинтеза пуринов представляло интерес и стало целью исследования, в ходе которого

биосинтез пуринов блокировали с помощью 0.1%-ного 2-ПАБСТ и по мере роста культуры оценивали синтез эндонуклеазы по ее активности в питательной среде и периплазме бактерий.

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 с принудительной аэрацией (200 об/мин) в отсутствие (контроль) или в присутствии (опыт) 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола (ICN, США) 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 и дрожжевой экстракт – 3.

Руководствуясь рекомендациями [11], 100 мг 2-ПАБСТ растворяли в 1.5 мл 0.25 М Na₂CO₃ с нагреванием (рН раствора 9.0) и добавляли перед внесением посевного материала в питательную среду до конечной концентрации 0.1%.

Посевной материал, которым служила 12-часовая культура, выращенная на жидкой питательной среде в отсутствие сульфаниламида, вносили в свежую среду до оптической плотности 0.05, которую определяли нефелометрически на КФК-2 при 590 нм.

Интенсивность роста культуры оценивали нефелометрически в кювете толщиной 3.06 мм. Количество биомассы выражали в единицах светорассеяния.

Получение периплазмы проводили, взяв за основу ранее опубликованный метод [12, р. 78–79] и внося необходимые модификации. 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 наружной мембраны и клеточной стенки 10 мг сырой биомассы суспендировали в 0.8 мл раствора, представляющего собой 30 мМ Трис-НСl буфер, рН 8.0, и 60%-ную сахарозу. К суспензии добавляли 20 мкл фенилметилсульфонилфторида (7 мг/мл), 33 мкл 0.25 М К-ЭДТА, рН 7.0, и 16 мг лизоцима и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Подтверждением нарушения клеточной оболочки служило превращение клеток в сферопласты, которые определяли светлопольной 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 внеклеточной и внутриклеточной эндонуклеазы оценивали целостность клеточной оболочки при отделении бактериальных клеток от культуральной жидкости, для чего проводили анализ динамики маркерного белка – β-галактозидазы – в периплазме и культуральной жидкости, как рекомендовано [13].

Нуклеазную активность определяли методом кислоторастворимых фракций в соответствии с рекомендациями [14].

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:

$$A_{\text{пп}} = \frac{A \cdot 80 \cdot B_{\text{сыр}}}{0.01 \cdot V},$$

где A – активность образца, ед./мл, 80 – разбавление биомассы лизирующей смесью; $B_{\text{сыр}}$ – количество биомассы в мг, выделенной из питательной среды, 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.

Проводили выбраковку данных, находили новые значения среднего арифметического и стандартного отклонения во вновь установленном доверительном 95%-ном интервале.

Определение достоверности разницы проводили с применением критерия Стьюдента, используя значения среднего арифметического и стандартной ошибки, полученные после выбраковки.

Результаты и их обсуждение

Как видно из рис. 1, добавление в среду 0.1%-ного 2-ПАБСТ приводило к подавлению роста культуры, что согласуется с ранее полученными результатами [10] и служит косвенным подтверждением ингибирования биосинтеза пуринов. При этом продолжительность адаптационной и экспоненциальной фаз возрастала в 2–3 раза, а на кривой накопления внеклеточной эндонуклеазы, вероятно, в ответ на добавление 2-ПАБСТ, появлялся дополнительный пик активности, совпадающий по времени с адаптационной фазой роста культуры, что согласовывалось с ранее опубликованными данными [10]. Кроме этого при добавлении 2-ПАБСТ происходило изменение сроков максимального накопления вне- и внутриклеточного ферментов. В присутствии 2-ПАБСТ максимальный уровень эндонуклеазы в питательной среде и периплазме наблюдали соответственно в конце экспоненциальной и стационарной фаз, тогда как в отсутствие 2-ПАБСТ максимальное накопление внутри- и внеклеточной эндонуклеазы наблюдали в середине стационарной фазы роста культуры. При этом уровень внеклеточной эндонуклеазы, накопленной в присутствии 2-ПАБСТ, был в целом ниже, чем в отсутствие 2-ПАБСТ на протяжении всего срока наблюдения, что совпадает с ранее опубликованными данными [10]. А уровень внутриклеточного фермента, синтезированного в присутствии 2-ПАБСТ, по сравнению с уровнем внутриклеточного фермента, синтезированного в отсутствие 2-ПАБСТ, многократно увеличивался при переходе культуры к стационарному росту. С одной стороны, это свидетельствовало о перераспределении эндонуклеазы под действием 2-ПАБСТ между периплазмой и внешней средой (рис. 2), с другой – позволяло предположить усиление биосинтеза эндонуклеазы в условиях подавления биосинтеза пуринов.

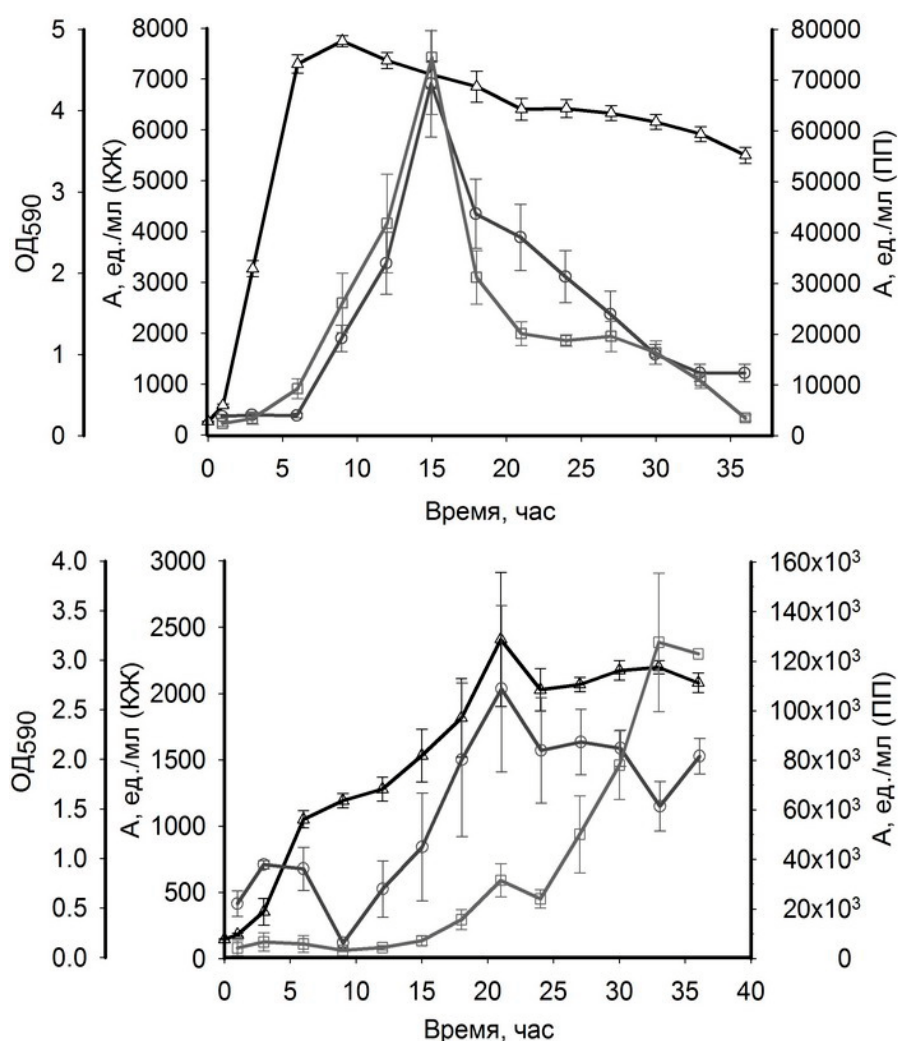


Рис. 1. Динамика роста и активности эндонуклеазы *S. marcescens* в отсутствие 2-ПАБСТ (а) и в его присутствии (б); -Δ- – OD₅₉₀, -○- – активность в культуральной жидкости (КЖ), -□- – активность в периплазме (ПП)

Сравнительный анализ динамики биосинтеза эндонуклеазы (рис. 3, а), который определяли как сумму нуклеазной активности в питательной среде и периплазме, показал, что в присутствии 2-ПАБСТ биосинтез эндонуклеазы увеличивался почти в 2 раза сразу же в ответ на добавление сульфаниламидного препарата (3-й час), а также многократно возрастал в период стационарного роста культуры (27–36-й час). В целом за 36 ч роста культуры в присутствии 2-ПАБСТ было синтезировано примерно в 1.6 раза больше эндонуклеазы, чем в отсутствие 2-ПАБСТ (рис. 3, б). Таким образом, блокирование биосинтеза пуринов приводило не только к подавлению и изменению характера роста культуры *S. marcescens*, но и к усилению биосинтеза эндонуклеазы, наиболее выраженному в периоды замедления роста культуры. Полученные результаты свидетельствовали о росте продуктивности культуры по эндонуклеазе под действием 2-ПАБСТ.

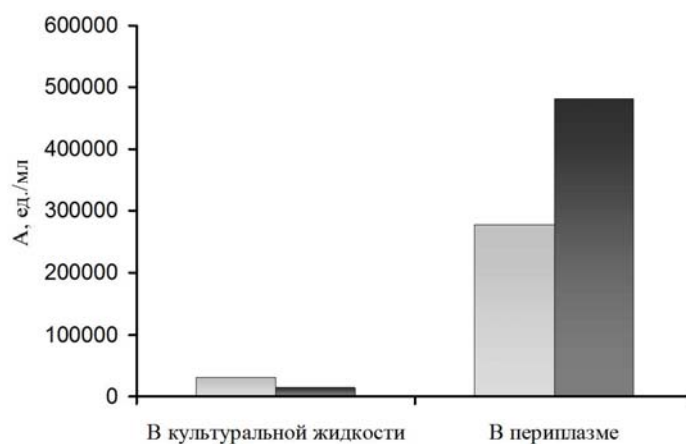


Рис. 2. Накопление эндонуклеазы в периплазме и питательной среде за 36 ч роста *S. marcescens* в отсутствие (□) и в присутствии 2-ПАБСТ (■)

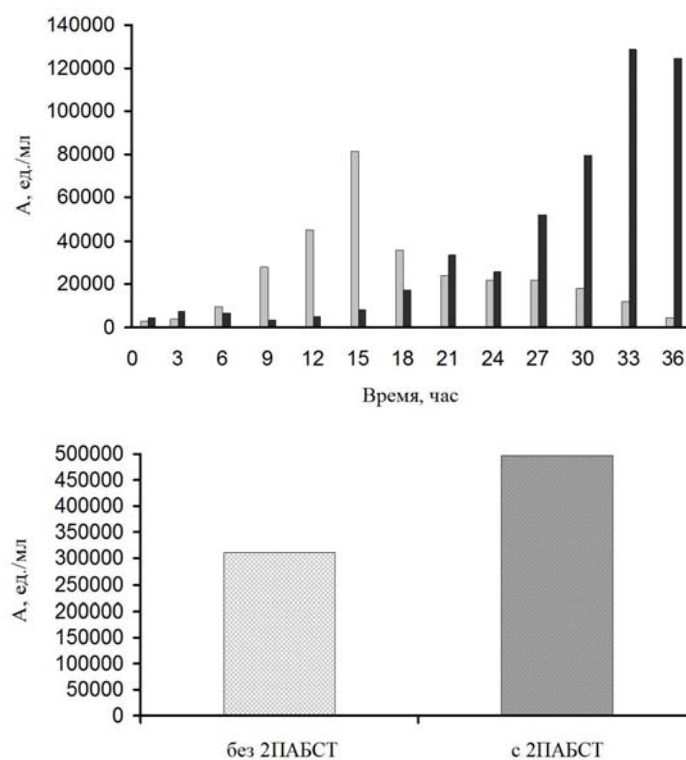


Рис. 3. Динамика биосинтеза (а) и биосинтез эндонуклеазы в течение 36 ч в отсутствие и в присутствии 2-ПАБСТ (б)

Результаты оценки продуктивности культуры по эндонуклеазе совпадали с результатами оценки ее биосинтеза. Как видно из рис. 4, а, за исключением периода роста культуры с 9-го по 18-й час, в остальное время продукция нуклеазы культурой, растущей в присутствии 2-ПАБСТ, была выше, чем в его отсутствие. В целом под действием 2-ПАБСТ продуктивность культуры возрастала примерно в 2.7 раза (рис. 4, б).

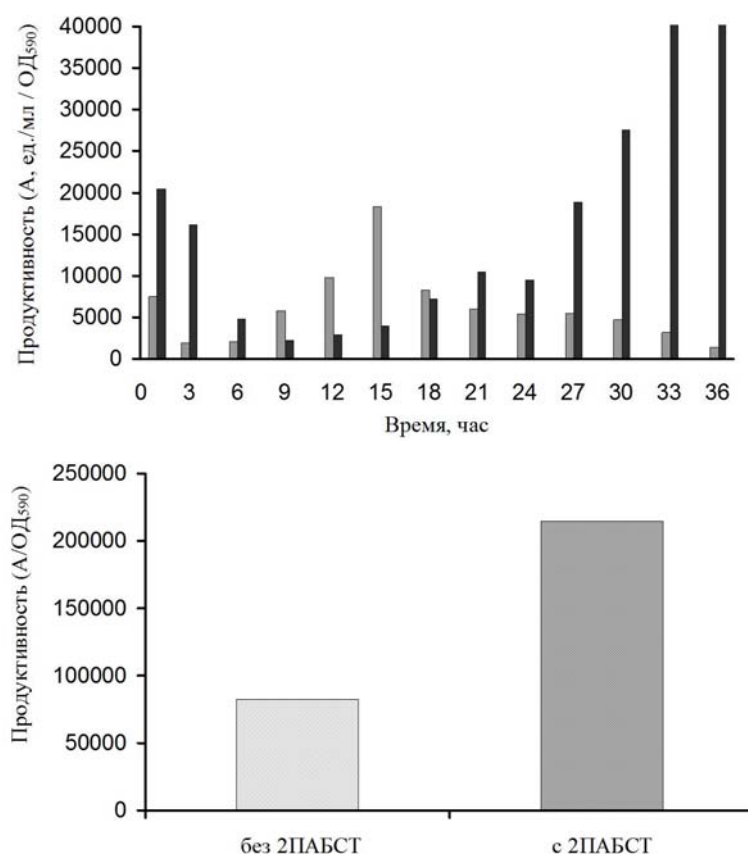


Рис. 4. Динамика продуктивности (а) и продуктивность бактерий по эндонуклеазе за 36 ч роста (б) в отсутствие и в присутствии 2-ПАБСТ

Таким образом, показано, что в результате подавления биосинтеза пуринов с помощью 2-ПАБСТ происходит качественное и количественное изменение динамики роста культуры *S. marcescens* W1050, сопряженное с увеличением биосинтеза и продукции эндонуклеазы, а также ее перераспределением между периплазмой и культуральной средой.

Summary

R. Shah Mahmud, M.N. Filimonova. Biosynthesis of *Serratia marcescens* Endonuclease upon Inhibition of Purine Biosynthesis.

To examine the biosynthesis of *Serratia marcescens* endonuclease upon the inhibition of purine biosynthesis, the culture was grown in the presence of 0.1% 2-(para-aminobenzenesulfonamide)-thiazole. During the growth, the biosynthesis of the nuclease was estimated by its activity in the nutrient medium and periplasm. It is shown that the addition of 2-(para-aminobenzenesulfonamide)-thiazole into the nutrient medium leads to a qualitative and quantitative change in the growth dynamics of *S. marcescens*, an increase in the endonuclease biosynthesis and production, and a decrease and an increase in the parts of extracellular and intracellular enzymes, respectively.

Key words: *Serratia marcescens*, endonuclease, biosynthesis, 2-(para-aminobenzenesulfonamide)-thiazole, inhibition of purine biosynthesis.

Литература

1. Филимонова М.Н. Эндонуклеаза *Serratia marcescens* // Труды объединенной междунар. науч. конф. «Новая геометрия природы», Казань, 25 авг. – 5 сент. 2003 г. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2003. – С. 67–71.
2. Miller M., Tanner J., Alpaugh M., Benedik M., Krause K. 2.1 Å structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA // Nat. Struct. Biol. – 1994. – V. 1, No 7. – P. 461–468.
3. Friendhoff P., Kolmes B., Gimadutdinow O., Wende W., Krause K., Pingoud A. Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis // Nucleic Acids Res. – 1996. – V. 24, No 14. – P. 2632–2639.
4. Педерсен Ю., Филимонова М., Роенсторф П., Бидерманн К. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens* природного и рекомбинантного штаммов. Сравнительная характеристика плазменно-десорбционной масс-спектрометрией // Биохимия. – 1995. – Т. 60, Вып. 3. – С. 450–461.
5. Филимонова М.Н., Гарусов А.В., Сметанина Т.А., Андреева М.А., Богомольная Л.М., Лецинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Сравнительный анализ субстратной специфичности // Биохимия. – 1996. – Т. 61, Вып. 10. – С. 1800–1806.
6. Филимонова М.Н., Губская В.П., Нуретдинов И.А., Бенедик М.Дж., Богомольная Л.М., Андреева М.А., Лецинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Роль ионов Mg^{2+} в механизме гидролиза // Биохимия. – 1997. – Т. 62, Вып. 9. – С. 1148–1154.
7. 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.
8. Юсупова Д.В., Соколова Р.Б., Порфирьева О.В., Пономарева А.З. Индукция синтеза внеклеточной эндонуклеазы *Serratia marcescens* агентами подавляющими репликацию ДНК // Микробиология. – 1991. – Т. 60, № 2. – С. 279–284.
9. Benedik M.J., Strych U. *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – V. 165, No 1. – P. 1–13.
10. Старшинова Н.В., Филимонова М.Н. Особенности биосинтеза нуклеазы и роста *Serratia marcescens* в присутствии 2-(пара-аминобензолсульфамидо)-тиазола // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 3. – С. 365–369.
11. Машковский М.Д. Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей. – Кишинев: Картя молдовеняскэ, 1989. – 528 с.
12. Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N. R. (eds.) Methods for general and molecular bacteriology. – Washington, D.C.: Am. Soc. Microbiol., 1994. – XII + 791 p.
13. 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.
14. Nestle M., Roberts W.K. 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.

Поступила в редакцию
28.09.09

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

E-mail: raihaan.shah@gmail.com

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

E-mail: maria.filimonova@ksu.ru