

0718232 - 1

На правах рукописи

ПЕТУХОВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

**БИОСИНТЕЗ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ И ХИТИНАЗ
SERRATIA MARCESCENS**

03.00.07— микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Петухова

Казань — 2000

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов
Казанского государственного университета им. В. И. Ульянова – Ленина

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Д. В. Юсупова

Официальные оппоненты: доктор химических наук
В.П. Варламов

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



0000947789

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
М.Н. Давыдова

Ведущая организация: институт микробиологии РАН, Москва

Защита диссертации состоится « 26 » октября 2000 г. в 14³⁰ часов
на заседании Диссертационного Совета К 053.29.19. при Казанском государственном
университете им. В. И. Ульянова - Ленина, 420008 г. Казань , ул. Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного
университета

Автореферат разослан 20 октября 2000 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета,
кандидат биологических наук

А.Н. Аскарова

0718232-1



ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Внеклеточные ферменты бактерий широко используются человеком в его практической деятельности. Энтеробактерии *Settia marcescens* являются продуцентами большого числа внеклеточных ферментов, расщепляющих высокоустойчивые полимерные соединения. *S.marcescens* синтезирует и секретирует в среду нуклеазы, протеазы, хитиназы, липазы, используя их для утилизации высокомолекулярных соединений окружающей среды и в качестве факторов агрессии при инвазии и колонизации других организмов.

Эндонуклеаза *S.marcescens* (КФ 3.1.30.2.) расщепляет ДНК и РНК, может быть использована при исследовании структуры нуклеиновых кислот, для удаления нуклеиновых кислот из биологических объектов, а также для получения олиго- и мононуклеотидов. Фермент находит применение в ветеринарии в качестве противовирусного препарата, обладает выраженной противоопухолевой активностью (Аликин с соавт., 1998).

Кроме того, *S.marcescens* выделяет в среду высокоактивные ферменты, расщепляющие хитин — хитиназы (КФ 3.2.1.14.) (Monreal, Reese, 1969; Gal et al., 1997), которые привлекают внимание исследователей в связи с широкими возможностями их применения. Хитин - высокоустойчивый полимер N-ацетил-D-глюкозамина входит в состав покровных тканей членистоногих, нематод, клеточных стенок фитопатогенных грибов. Поэтому, исследования по хитиназам, которые обладают высокой противогрибковой активностью, являются частью общей программы по изысканию эффективных способов борьбы с вредителями культурных растений (Ordentlich et al., 1987; Setrit et al., 1993; Shapira et al., 1994). Значительный интерес представляет использование хитиназ для превращения хитина в легкорастворимые источники азота и углерода, получения продуктов расщепления хитина и хитозана. Продукты расщепления хитина и его деацетилированного производного - хитозана с успехом используются в биотехнологии: при очистке сточных вод от белковых, жировых, нефтяных и других загрязнений, иммобилизации ферментов, сорбции тяжелых металлов и др.; в сельском хозяйстве — в качестве биостимулятора и средства борьбы с вредителями сельскохозяйственных растений, созданы препараты «Нарцисс»,

«Золушка», почвенные брикеты для выращивания рассады; в медицине — для диагностики и лечения злокачественных опухолей и язвы желудка, при производстве лекарственных форм антисклеротического, антикоагулянтного и антиартрозного действия и др.; косметике — использование в качестве увлажнителя, эмульгатора, антистатика и смягчающего средства (Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана, 1999). Запасы хитина занимают второе место после целлюлозы на нашей планете. В настоящее время в мире интенсивно ведутся исследования по поиску среди микроорганизмов перспективных продуцентов хитиназ, изучению свойств ферментов. Одним из наиболее активных и часто используемых в исследовательских целях является комплекс внеклеточных хитиназ *S.marcescens*.

Несмотря на значительные успехи по клонированию генов эндонуклеазы и отдельных хитиназ *S.marcescens*, получению высокоочищенных ферментов и характеристике их свойств, наименее изученным остается вопрос о механизмах регуляции синтеза этих ферментов.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы состояла в установлении механизмов регуляции синтеза эндонуклеазы и хитинолитических ферментов *S.marcescens*, а также в разработке эффективных методов получения хитиназ и определении их фунгицидного действия.

В связи с поставленной целью в работе решались следующие задачи:

1. Физиолого-биохимическая характеристика штаммов *S.marcescens* с повышенной эндонуклеазной и хитиназной активностью.
2. Изучение влияния на биосинтез эндонуклеазы *S.marcescens* соединений с различным механизмом действия на ДНК.
3. Изучение влияния соединений, индуцирующих SOS-ответ, на динамику и уровень синтеза других внеклеточных гидролаз *S.marcescens*.
4. Исследование влияния индуктора SOS-функций клетки - митомицина C и субстрата фермента - хитина на биосинтез белков с хитиназной активностью.
5. Получение частично очищенных хитиназ путем аффинной сорбции на хитине.
6. Разделение хитиназ путем изоэлектрического фокусирования.
7. Изучение фунгицидной активности хитиназ.

Научная новизна работы. Впервые исследовано влияние на рост и биосинтез внеклеточной эндонуклеазы *S.marcescens* соединений с различным механизмом действия на ДНК — налидиксовой кислоты, ультрафиолетового света и N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина. Показано, что независимо от механизма действия, все соединения, вызывающие повреждения ДНК либо блокирующие ее репликацию, индуцируют синтез эндонуклеазы в широком диапазоне концентраций.

Установлено, что под влиянием митомицина С и налидиксовой кислоты — индукторов SOS-ответа, в культуральной жидкости *S.marcescens* увеличивается удельная активность хитиназы, липазы, лецитиназы и щелочной фосфатазы; снижается активность протеаз и изменяется динамика ферментативной активности в процессе роста. Методом ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях показано, что митомицин С индуцирует синтез большого количества внеклеточных белков. Индуцирующий эффект митомицина С ингибируется хлорамфениколом.

В культуральной жидкости *S.marcescens* обнаружено четыре белка с хитиназной активностью с молекулярными массами 58, 52, 38 и 21 кДа — хитиназы А, В, С и С₁ соответственно. Хроматографией на хитине хитиназы А и В отдалены от хитиназ С и С₁ и очищены от сопутствующих белков. Методом изо-электрического фокусирования хитиназа А получена в очищенном состоянии. Хитиназа А имеет две изоформы с рI 6.25 и 4.85-5.25, хитиназа В — одну изоформу с рI 4.85-5.25 и по механизму действия является эндохитиназой. Впервые показано, что митомицин С индуцирует синтез всех четырех белков с хитиназной активностью. Установлено, что препарат, содержащий очищенные хитиназы А и В, подавляет рост всех изученных культур фитопатогенных микромицетов. Митомицин С не влияет на биосинтез хитобиазы, она регулируется по типу индукции субстратом.

Охарактеризованы физиолого-биохимические свойства мутантных штаммов с повышенной эндонуклеазной и хитиназной активностью.

Практическая значимость работы. Охарактеризованы мутантные штаммы *S.marcescens* с конститутивным синтезом эндонуклеазы и всех четырех хитиназ. Разработаны эффективные методы получения культуральной жидкости *S.marcescens* с повышенной активностью эндонуклеазы и хитиназы, содержащей все четыре белка с хитиназной активностью, опробованные в полупроизводственных условиях на Вышневолоцком заводе ферментных препаратов. Способ получения культуральной

жидкости с хитиназной активностью защищен Государственным патентом. Штамм 28-13 рекомендован Министерством медицинской промышленности для использования на предприятиях отрасли в качестве продуцента внеклеточной эндонуклеазы.

Исследования получили финансовую поддержку программы «Университеты России — фундаментальные исследования» (1992-2000 гг.), а также АН и фонда НИОКР Республики Татарстан (1998-2000 гг.).

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на IX Конференции межвузовского межотраслевого проекта «Ферменты микроорганизмов» (Казань, 1991), Конференции Российской Федерации «Биосинтез ферментов микроорганизмами» (Москва, 1993), XI Конференции Российской Федерации «Ферменты микроорганизмов, 98» (Казань, 1998), Пятой конференции «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Москва - Щелково, 1999), итоговых научных конференциях Казанского университета (1992, 2000), Международной конференции студентов и аспирантов «Ломоносов-2000» (Москва, 2000).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста, состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа содержит 20 рисунков, 10 таблиц. Список литературы содержит 154 источника, из них 51 на русском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали пигментообразующий прототрофный штамм *Septatia parcescens* Вù-211 ATCC 9986 из коллекции бактериальных культур Армянской Академии Наук; мутантные штаммы 28-13 (ВКПМ В-4870) и Д5, полученные на кафедре микробиологии Казанского государственного университета методом индуцированного мутагенеза из исходного штамма Вù-211 ATCC 9986 с последующим отбором колоний с повышенной хитиназной и эндонуклеазной активностью; штаммы микромицетов из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Казанского государственного университета: *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Fusarium graminearum*, *Alternaria brassicicola*, *Bipolaris sorokiniana*.

Питательные среды. Среда 1, модифицированная среда Бантинг (Bunting, 1940;

Юсупова с соавт., 1972). Среда 2, солевая среда с коллоидным хитином в качестве единственного источника азота и углерода (Чигалейчик, Пириева, 1976). Среда 3, глюкозо-картофельный отвар (Литвинов, 1969). Среда 4 – мясо-пептонный агар (МПА).

Условия культивирования. Бактерии выращивали в конических колбах (соотношение объема среды к объему колбы 1:5) при температуре 30°C в термостатируемом шкафу-качалке при 200 об.·мин⁻¹. О величине биомассы судили по величине D_{650} , измеренной на ФЭК «Spectromom-410» (Венгрия), за единицу биомассы принимали поглощение в 1-см кювете равное единице. Число жизнеспособных клеток определяли посевом на МПА. Подсчет колоний проводили через 48 ч с момента посева.

В опытах с кратковременной культурой отмытых клеток бактерии, выращенные в течении шести часов, отделяли от питательной среды центрифугированием, дважды отмывали стерильным 0.14 М раствором NaCl и ресуспендировали в питательной среде того же состава, сохраняя исходную концентрацию клеток. При исследовании влияния на рост и биосинтез внеклеточной эндонуклеазы *S.marcescens* ДНК-повреждающих агентов с различным механизмом действия: УФ, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (НГ), митомицина С (МС) и налидиксовой кислоты (Нал), клетки отмывали дважды 0.1 М натрий-фосфатным буфером рН 7.5 и ресуспендировали в этом же буфере до конечной плотности 0.10-0.15 оптических единиц на мл. После облучения УФ и обработки индуцирующими агентами клетки разводили питательной средой 1 в отношении 3:1 и инкубировали в темноте в условиях, оптимальных для биосинтеза эндонуклеазы.

Получение бесклеточных экстрактов. Клетки отмывали 0.14 М раствором NaCl до удаления следов внеклеточных гидролаз и разрушали многократным замораживанием с последующим оттаиванием, либо ультразвуком. В бесклеточном экстракте (БЭ) определяли активность ферментов. Величину активности рассчитывали на единицу биомассы или мг белка.

Время генерации (g), удельную скорость роста (μ) рассчитывали по Перту (1987), удельную скорость синтеза фермента (ε) — по аналогии с удельной скоростью роста.

Концентрирование белков культуральной жидкости (КЖ) проводили насыщением ее сульфатом аммония до 90 % и выдерживанием при температуре +4°C в течение 12-и часов. Образовавшийся осадок (САФ) диализовали против дистиллированной воды, а потом против 0.125 М трис-НС1 буфера рН 6.8 до отрицательной реакции на анион SO_4^{2-} . После диализа белки высушивали лиофильно. Белок определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951).

Эндонуклеазную и эндохитиназную активности определяли вискозиметрически по действию на высокополимерную ДНК и гликольхитин в микровискозиметре Оствальда (Бенинг, 1964). **Хитиназную активность** определяли также по количеству образующихся при гидролизе хитина редуцирующих сахаров с динитросалициловым реагентом (ДНС-метод) (Чигалейчик, 1976а). **Активность эндонуклеазы** определяли также по образованию кислоторастворимых продуктов расщепления ДНК и РНК, поглощающих при $\lambda=260$ нм (Лещинская с соавт., 1980). **Активность хитобиазы** определяли, используя в качестве субстрата п-нитрофенил-N-ацетил- β -D-глюкозаминид (Стояченко и др., 1991). Активность фермента выражали в мкМ п-нитрофенола, выделившегося за мин. **Протеазную активность** определяли по видоизмененному методу Ансона (Каверзнева, 1971). **Липазную активность** определяли согласно методике Винклера и Стукмана (Winkler, Stuckmann, 1979), используя в качестве субстрата п-нитрофенилпальмитат. **Лецитиназную активность** определяли турбидиметрическим методом с ячно-желточным раствором в качестве субстрата (Касыров, 1965). **Фосфатазную активность** определяли, используя в качестве субстрата п-нитрофенилфосфат натрия (Лещинская с соавт., 1980).

Коллоидный хитин получали по методике Чигалейчика с соавторами (1976а). **Гликольхитин** получали из хитина по методике Ямады и Имото (Yamada, Imoto, 1981).

Электрофоретическое разделение белков проводили с помощью вертикального электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в присутствии 1% Ds-Na (Laemli, 1970). **Денситограммы электрофореграмм** получали на микрофотометре ИФО-450. **Определение хитиназной активности белковых фракций** в геле после электрофореза в денатурирующих условиях (Laemli, 1970) проводили согласно методике Труделя и Асселина (Trudel, Asselin, 1989).

Изоэлектрическое фокусирование в гранулированном геле (Ригетти, 1986) проводили на приборе Multiphor 2117 фирмы LKB.

Частичную очистку хитиназ проводили путем адсорбции на коллоидном хитине (Roberts, Cabib, 1982).

Фунгистатическую активность хитиназ проверяли методом бумажных дисков (Литвинов, 1969).

Статистическую обработку результатов проводили согласно общепринятым методам (Плохинский, 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика штаммов *S.marcescens* с повышенной активностью эндонуклеазы и хитиназы

Высокопродуктивный по эндонуклеазе штамм *S.marcescens* 28-13 (ВКПМ В-4870) получен из исходного Вù 211 ATCC 9986 штамма методом индуцированного мутагенеза с последующим отбором колоний с наиболее высокой эндонуклеазной активностью (Порфирьева с соавт., 1989). Изучены физиолого-биохимические особенности мутантного штамма. Исследования показали, что мутантный штамм отличается от исходного более длительной лаг-фазой роста, большим временем генерации и более крупными размерами клеток, что свидетельствует о нарушении нормальной скорости деления клеток, возможно, в результате нарушения процессов репликации ДНК. Штамм-суперпродуцент характеризуется меньшим выходом биомассы, пониженной протеолитической активностью, повышенной активностью щелочной фосфатазы в культуральной жидкости, конститутивным синтезом внеклеточной эндонуклеазы и хитиназы и повышенной чувствительностью к антибиотикам пенициллинового ряда, налидиксовой кислоте, митомицину С и рифампицину. Содержание белка в культуральной жидкости мутантного штамма в два раза выше его содержания у исходного штамма (табл. 1). Мутантный штамм 28-13 рекомендуется в качестве продуцента внеклеточной эндонуклеазы и хитиназы. Разработан принципиально новый способ получения культуральной жидкости *S.marcescens* с хитиназной активностью с использованием в качестве продуцента штамма 28-13, который оформлен патентом и опробован в полупроизводственных условиях на Вышневолоцком заводе ферментных препаратов.

Таблица 1

Содержание белка и ферментативная активность культуральной жидкости штаммов, %

Штамм	Биомасса	Белок	Эндонуклеаза	Протеаза	Хитиназа	Фосфатаза
ATCC 9986	100	100	100	100	100	100
28-13	77	208	26103*	62	197	4385*

* $\sigma \leq 10\%$

Методом индуцированного мутагенеза с последующим отбором колоний с повышенной хитиназной активностью из исходного штамма Вù 211 ATCC 9986 получен мутантный штамм Д5, который синтезирует хитиназу конститутивно в отсутствие индукторов на простой по составу полусинтетической среде 1. По свойствам мутантный штамм Д5 идентичен штамму 28-13. Характеристика штамма Д5 представлена далее при исследовании хитинолитического комплекса *S.marcescens*. Анализ полученных результатов позволяет предположить, что штаммы 28-13 и Д5 представляют собой регуляторные мутанты с дерепрессированным синтезом эндонуклеазы и хитиназы. Штамм Д5 может быть использован в лабораторных и полупроизводственных условиях в качестве продуцента хитиназ *S.marcescens*.

2. Биосинтез внеклеточной эндонуклеазы *S.marcescens*

Исследование влияния на рост и биосинтез внеклеточной эндонуклеазы *S.marcescens* Вù 211 ATCC 9986 агентов с различным механизмом действия на ДНК (УФ, НГ, МС и Нал) показало, что все исследованные агенты снижают число жизнеспособных клеток и выход биомассы *S.marcescens* и индуцируют резкое повышение синтеза внеклеточной эндонуклеазы. От механизма действия агента зависела интенсивность индукции эндонуклеазы (рис.1), которую выражали через коэффициент индукции (K_n). K_n определяли как отношение величин эндонуклеазной активности (в расчете на единицу биомассы) опытных и контрольных образцов.

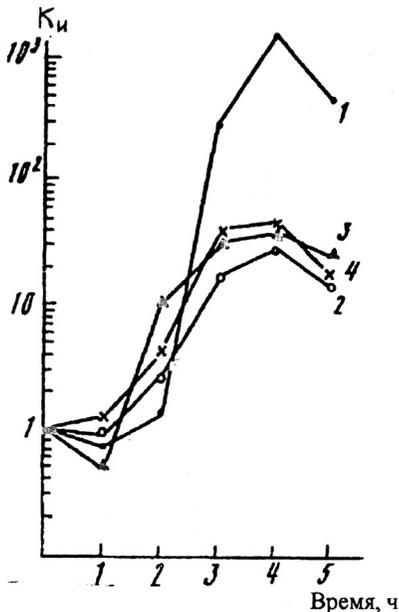


Рис. 1 Динамика индукции эндонуклеазы при воздействии различных агентов
 1 - МС, $10 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$; 2 - Нал, $20 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$;
 3 - НГ, $2 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$; 4 - УФ, $7.4 \text{ Дж} \cdot \text{м}^{-2}$

K_n распределяется следующим образом: 30 (Нал), 40 (НГ), 60 (УФ) и 800 (МС) единиц. Увеличение эндонуклеазной активности в среде регистрируется через 60 мин после УФ-облучения и через 120 мин контакта клеток с МС, Нал и НГ. Уровень индукции достигает наибольшего значения на четвертый час с момента обработки индуктором. Все перечисленные агенты являются индукторами SOS-функций клетки. Результаты исследования влияния ДНК-повреждающих агентов на клетки *S.marcenscens* свидетельствуют о высокой устойчивости этого микроорганизма к УФ, НГ, МС и Нал.

Исследовалось влияние различных концентраций Нал и МС ($0.05 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) на динамику роста *S.marcenscens* и накопления в среде эндонуклеазы. Результаты показали (рис. 2), что фермент не синтезируется активно делящимися клетками в экспоненциальной фазе роста. Биосинтез эндонуклеазы начинается при замедлении деления клеток и соответственно при снижении удельной скорости роста. При сопоставлении динамики удельной скорости роста и удельной скорости синтеза эндонуклеазы четко прослеживается обратная зависимость между этими величинами. Нал, добавленная в среду одновременно с посевным материалом, подавляет деление клеток и вызывает снижение числа колониеобразующих клеток на 75-99% в зависимости от концентрации ($2-30 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$). Преодолев фазу задержки роста, вызванную Нал, сохранившие жизнеспособность клетки начинают делиться с высокой скоростью (время генерации 26-38 мин, удельная скорость роста $1.3-1.6 \text{ ед} \cdot \text{ч}^{-1}$ против 40 мин и

1.04 ед. · ч⁻¹ в контрольной культуре) и на 22-24-й час роста достигают и превышают уровень клеток контрольной культуры. Дальнейшие исследования показали, что в процессе роста бактерий на средах с Нал сохраняются и накапливаются клетки устойчивые к Нал, не отличающиеся по времени генерации от клеток исходной культуры. Таким образом, индукция синтеза эндонуклеазы предшествует началу деления клеток, преодолевших фазу задержки роста.

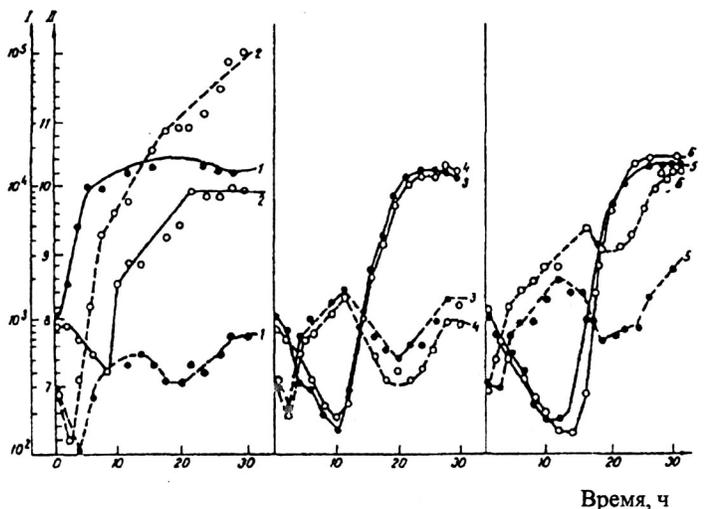


Рис.2 Динамика роста и эндонуклеазной активности *S.marcescens* ATCC 9986 в присутствии различных концентраций налидиксовой кислоты.

По оси ординат: I - удельная эндонуклеазная активность (пунктирные линии), II - lg числа колониеобразующих клеток (сплошные линии); 1 - контроль, 2 - 2 мг·мл⁻¹ (g=27), 3 - 6 мг·мл⁻¹ (g=38), 4 - 10 мг·мл⁻¹ (g=27.7), 5 - 20 мг·мл⁻¹ (g=32), 6 - 30 мг·мл⁻¹ (g=26); g - время генерации клеток, мин.

3. Влияние соединений, индуцирующих SOS-ответ, на динамику и уровень синтеза других внеклеточных гидролаз *S.marcescens*

Выяснялось также влияние агентов, блокирующих репликацию ДНК, индукторов SOS-ответа - МС и Нал на динамику и уровень синтеза других внеклеточных гидролитических ферментов *S.marcescens*. Исследования показали, что штамм Вù 211 ATCC 9986 наряду с эндонуклеазой синтезирует протеазы, липазу, лецитиназу; в

культуральной жидкости обнаруживаются следовые количества щелочной фосфатазы, которая у *S.marcescens* локализуется в периплазме (Tsang et al., 1979), и хитиназы, что согласуется с литературными данными об индуцибельном синтезе фермента (Monreal, Reese, 1969). Под влиянием МС и Нал в культуральной жидкости *S.marcescens* повышается хитиназная, липолитическая, лецитиназная и фосфатазная активности и снижается активность сериновой и металлопротеазы. Хлорамфеникол (ХФ), добавленный в среду одновременно с МС, подавляет его индуцирующий эффект и снижает активность гидролитических ферментов в культуральной жидкости до контрольных значений, что свидетельствует о биосинтезе под влиянием МС ферментного белка *de novo*.

В условиях индукции синтеза гидролаз под влиянием МС, в бесклеточных экстрактах, полученных при разрушении клеток, липаза, лецитиназа и хитиназа использованными нами методами не обнаруживались. Эти данные свидетельствуют о том, что ферменты, по-видимому, не накапливаются в клетках (периплазме), а сразу после синтеза и пересечения цитоплазматической мембраны секретируются в культуральную жидкость. В отличие от перечисленных ферментов, в бесклеточных экстрактах *S.marcescens* обнаруживается высокий уровень эндонуклеазы и фосфатазы.

Высокая активность эндонуклеазы в отмытых клетках *S.marcescens* на четвертый час инкубации с МС свидетельствует о том, что видимо за четыре часа инкубации фермент накапливается в периплазме, не успевая выделиться в среду. Эти данные согласуются с результатами, полученными в последствии американскими исследователями, которые также отмечают, что эндонуклеаза *S.marcescens* накапливается в периплазме клеток и затем медленно освобождается в среду в течение одного-двух часов (Suh et al., 1996).

Электрофорез в ПААГ с Ds-Na белков 24-часовой культуральной жидкости показал, что МС индуцирует у *S.marcescens* синтез большого числа белковых субъединиц. Индуцируемые МС изменения в профиле внеклеточных белков отсутствовали при добавлении в среду одновременно с МС хлорамфеникола, что свидетельствует о биосинтезе белков *de novo* под влиянием МС (рис.3). Сравнение спектров внеклеточных белков, полученных при выращивании исходного штамма Вù 211 АТСС 9986 в присутствии МС и Нал, показало однотипность их изменения.

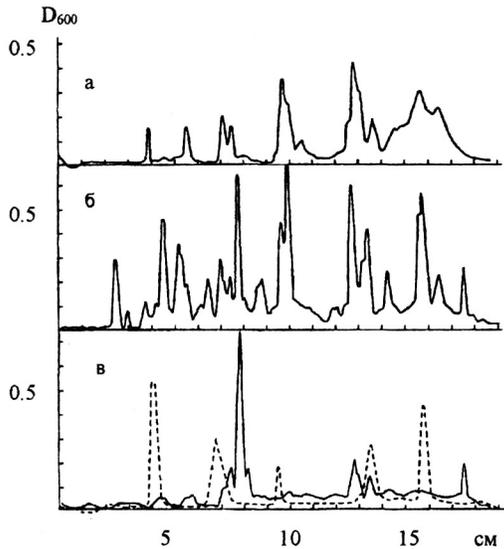


Рис.3. Денситограммы электрофореграмм белков культуральной жидкости *S.marcescens*

а - среда без МС (контроль), б - среда с МС, в - среда с МС+ХФ.

Пунктирная линия - белки-маркеры (67.0, 43.0, 29.5,20.1,14.3 кДа)

4. Хитинолитический комплекс *S.marcescens* и особенности его биосинтеза

Serratia marcescens — один из перспективных продуцентов внеклеточных хитинолитических ферментов среди микроорганизмов. Хитиназы *S.marcescens* являются индуцируемыми ферментами и синтезируются лишь при наличии в среде хитина или высокомолекулярных продуктов его расщепления (Montreal, Reese, 1969). Исследовано влияние хитина и индуктора SOS-функций клетки - МС на внеклеточную хитиназную активность и активность хитобиазы *S.marcescens* Вù 211 ATCC 9986. При выращивании бактерий на полноценной среде 1 без добавления хитина и МС обнаруживается следовая хитиназная активность (ДНС- и вискозиметрическим методами) (табл. 2). На среде с МС достигается максимальный уровень хитиназной активности в условиях наших опытов. Хитин также индуцирует синтез фермента при добавлении его в среду в качестве единственного источника углерода и азота.

Добавление МС в среду с хитином увеличивает активность фермента вдвое. Под влиянием МС и хитина наблюдается увеличение эндохитиназной активности и суммарной хитиназной активности, измеренной ДНС-методом. В бесклеточных экстрактах во всех вариантах опыта хитиназная активность ни одним из использованных методов не обнаруживается, то есть хитиназа, по-видимому, не накапливается в периплазме клеток. Исследование активности хитобиазы показало, что удельная активность фермента внутри клетки многократно превышает внеклеточную активность. На среде с хитином внутриклеточная хитобиазная активность в 20-30 раз превышает активность, достигнутую на среде без хитина. МС не индуцирует синтез хитобиазы (табл. 2).

Таблица 2

Индукция синтеза ферментов хитинолитического комплекса *S.marcescens* под влиянием митомицина С и хитина

Варианты опыта	Хитиназная активность, ед. · мг ⁻¹ белка			Хитобиазная активность, ед. · мг ⁻¹ белка	
	ДНС-метод		Вискозиметрический метод	КЖ	БЭ
	КЖ	БЭ			
среда1					
Контроль	1.5 ± 0.03	1.6 ± 0.02	13.4 ± 0.25	8 ± 0.16	109 ± 3.20
Контроль+МС	24.9 ± 0.50	2.0 ± 0.03	216.0 ± 5.00	92 ± 2.50	62 ± 3.00
среда2					
Контроль	11.0 ± 0.20	2.6 ± 0.03	100.0 ± 3.00	60 ± 1.50	3009 ± 48.0
Контроль+МС	19.7 ± 0.35	2.0 ± 0.02	183.0 ± 4.00	741 ± 20.0	2639 ± 50.0

Изучение состава внеклеточных хитиназ *S.marcescens* методом электрофореза с 12.5%-ном ПААГ с гликольхитином в денатурирующих условиях с последующей реиатурацией и обнаружением хитиназной активности в геле показало (рис.4), что при росте на среде 1 (без МС и хитина) в культуральной жидкости обнаруживается один белок с хитиназной активностью с молекулярной массой 38 кДа (рис.4а). В

присутствии МС индуцируется синтез четырех белков с хитиназной активностью с молекулярными массами 58, 52, 38 и 21 кДа, обозначенных как А, В, С, С₁ (рис. 4б). Первые два белка по молекулярной массе совпадают с хитиназами А и В (Fuchs et al., 1986; Harpster, Dunsmuir, 1989). Хитиназы выявляются в культуральной жидкости на 12-й час роста культуры (переход к стационарной фазе роста). Использование МС позволяет получить культуральную жидкость *S.marcescens* с высоким уровнем всех четырех белков с хитиназной активностью. Спектр внеклеточных белков мутантного штамма Д5 идентичен белковым спектрам штамма 28-13 и исходного штамма АТСС 9986 при воздействии МС (рис. 4в). Обнаружение в культуральной жидкости мутантного штамма Д5 в отсутствии индукторов всех четырех белков с хитиназной активностью (рис. 4в) и одновременная индукция синтеза всех четырех хитиназ под влиянием МС у исходного штамма позволяет высказать предположение, что структурные гены этих хитиназ экспрессируются одновременно (координированно).

Исследовалась динамика роста и биосинтеза отдельных хитиназ у природного и мутантного штаммов *S.marcescens* с целью подбора условий, оптимальных для биосинтеза ферментов. В условиях экспрессии генов хитиназ под влиянием индукторов, либо использовании мутантного штамма с конститутивным синтезом хитиназ, на среде 1 у *S.marcescens* хитиназная активность, и в частности, эндохитиназная активность обнаруживаются в среде в конце экспоненциальной фазы роста, а наиболее высокий уровень ферментов в среде наблюдается в стационарную фазу на 18-24-й час роста (рис.5). В этих условиях в культуральной жидкости накапливаются четыре белковых субъединицы с хитиназной активностью (рис.4). Таким образом, хитиназы *S.marcescens*, также как эндонуклеаза, относятся к ферментам, синтезируемым клетками в процессе перехода от экспоненциальной к стационарной фазе роста, когда начинают экспрессироваться гены, продукты которых необходимы для выживания в возрастающе неблагоприятных условиях (Strauch, 1992), что характерно для многих внеклеточных гидролаз бактерий.

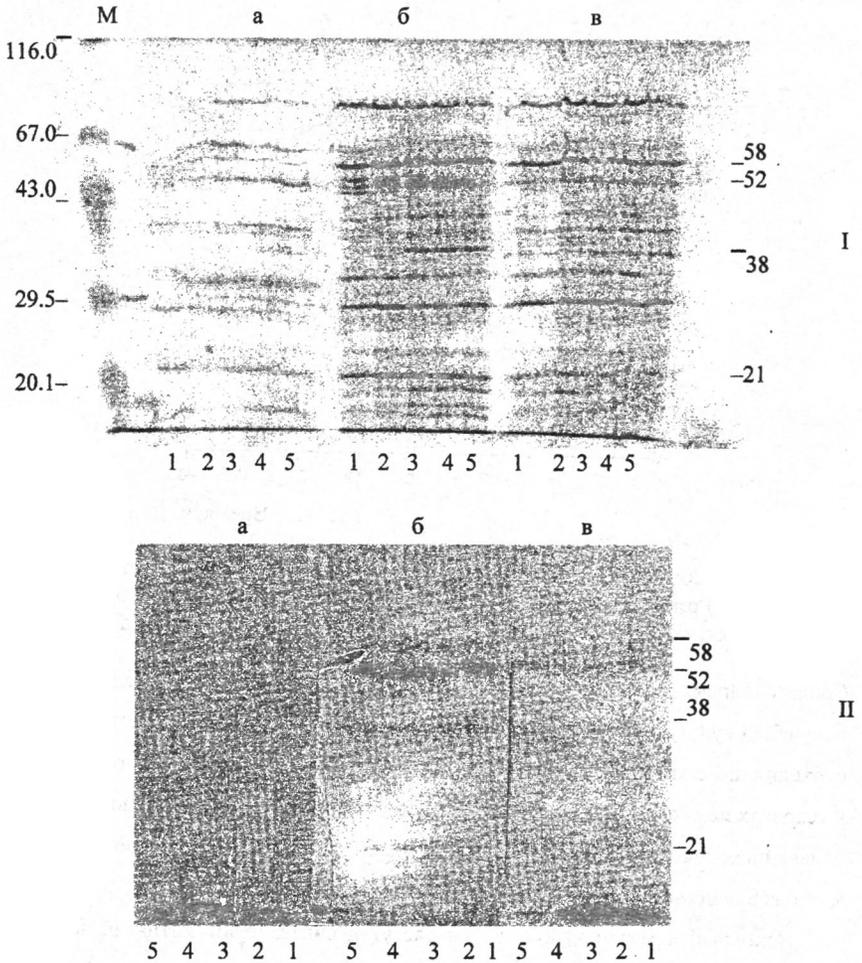


Рис.4 Изменение состава внеклеточных белков с хитиназной активностью в процессе роста *S.marcescens*. Электрофорез в 12.5%-ном ПААГ с гликольхитином в денатурирующих условиях с последующей ренатурацией и обнаружением хитиназной активности в гелях. I - Окраска кумасси бриллиантовым синим R-250. II - Окраска Calcofluor white M2R. Штаммы бактерий: а,б - ATCC 9986, в - Д5. Время выращивания: 1- 6, 2-12, 3- 18, 4- 24, 5- 48 часов. Питательная среда а, в - среда 1, б - среда 1 + МС. М - белки-маркеры. Цифрами указаны молекулярные массы (кДа)

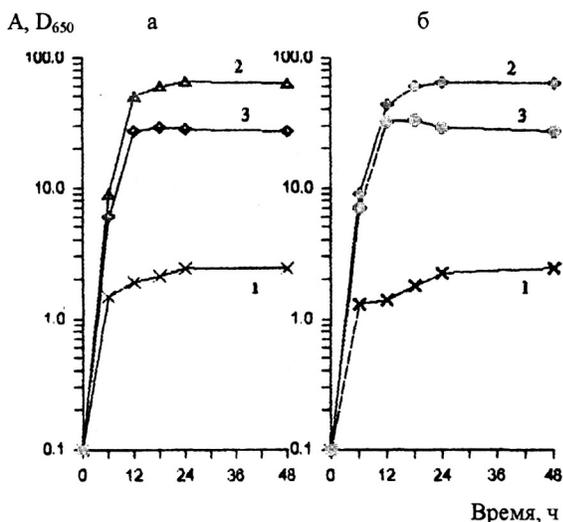


Рис.5. Рост и хитиназная активность (ДНС-метод) при развитии мутантного (а) и исходного (б) штаммов на среде 1 без МС (а) и в присутствии МС (б). 1 - D_{650} , 2 - активность хитиназы в расчёте на мл культуральной жидкости, 3 - на единицу D_{650}

Среда 1 и время культивирования - 20-24 часа являются наиболее подходящими для получения культуральной жидкости *S.marcescens*, содержащей все четыре белковые субъединицы с хитиназной активностью, при использовании мутантного штамма или в условиях индукции синтеза хитиназ у природных штаммов. Значительный интерес в дальнейшем представляет поиск дешёвых и доступных индукторов биосинтеза хитиназ *S.marcescens*, равноценных митомицину С.

Исходный и мутантный штаммы растут и синтезируют хитиназы на солевой среде с хитином (среда 2) в качестве единственного источника азота и углерода (рис.6). При развитии на этой среде мутантный штамм отличается короткой лаг-фазой роста (около двух часов против восьми у исходного штамма), ранним появлением и высоким уровнем эндохитиназной активности в культуральной жидкости по сравнению с исходным штаммом. Эта разница между штаммами исчезает при добавлении в среду с хитином МС. При этом резко повышается уровень эндохитиназной активности в культуральной жидкости (рис. 7) и сокращается лаг-фаза роста исходного штамма.

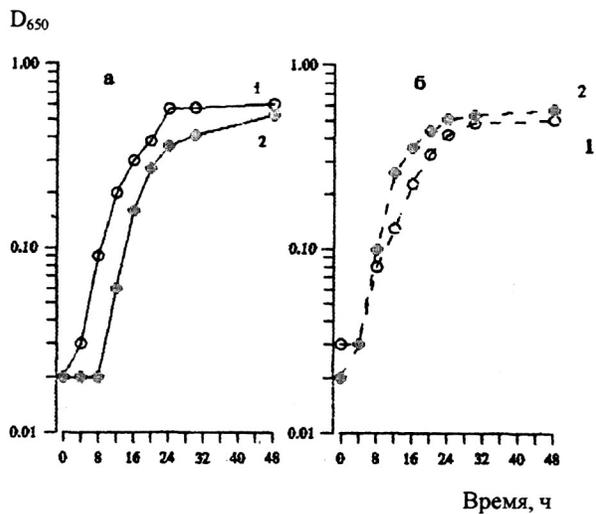


Рис. 6. Рост мутантного (1) и исходного (2) штаммов при развитии на среде 2 без MC (а) и в присутствии MC (б)

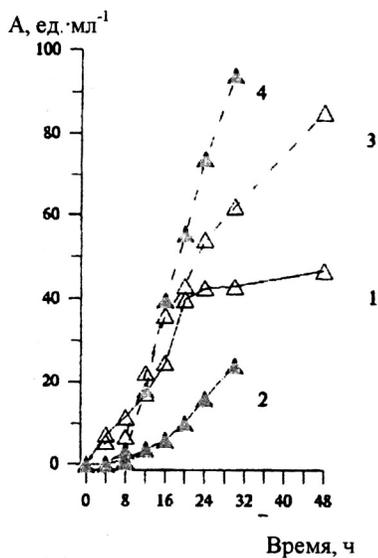


Рис.7. Эндохитиназная активность при развитии мутантного (1,3) и исходного (2,4) штаммов на среде 2 без MC (1,2) и в присутствии MC (3,4).

Мутантный штамм Д5 был использован в дальнейшем при получении, очистке и характеристике хитиназ. Проведена очистка хитиназ культуральной жидкости *S.marcescens* Д5 путем осаждения белков сульфатом аммония при 90 %-ном насыщении с последующей адсорбцией на хитине (Roberts, Cabib, 1982). При этом, степень очистки хитиназ возросла в 12.3 раза при измерении хитиназной активности ДНС-методом и 18.5 раз — вискозиметрическим методом. Разница в степени очистки указывает на то, что в данном случае мы имеем дело со смесью двух или нескольких белков, различающихся по своей способности адсорбироваться на хитине. Данные электрофореза частично очищенных хитиназ (рис.8) показали, что в препарате содержатся два белка с хитиназной активностью с молекулярными массами 58 и 52 кДа (хитиназы А и В). Хитиназы с молекулярными массами 38 и 21 кДа, присутствующие в САФ, не связываются с хитином и остаются в супернатанте. Таким образом, хроматографией на хитине хитиназы А и В отделены от хитиназ С и С₁ и очищены от сопутствующих белков.

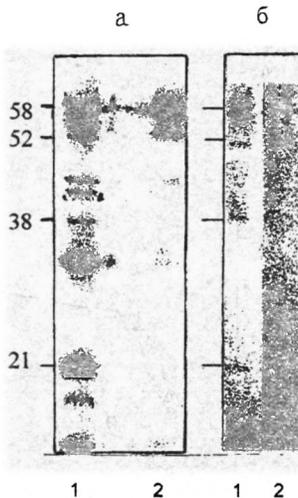


Рис. 8. ПААГ-электрофорез фракций, полученных в процессе очистки хитиназ на хитине

1 - САФ, 2 - очищенные хитиназы; а - окраска кумасси бриллиантовым синим R-250, б - окраска Calcofluor white M2R; цифрами указаны молекулярные массы белков (кДа) с хитиназной активностью.

Методом изоэлектрофокусирования хитиназа А получена в очищенном состоянии. Хитиназа А имеет две изоформы с pI 6.25 и 4.85-5.25 и по механизму действия является экзохитиназой. Хитиназа В — эндохитиназа с pI около 5.0. Одно и то же значение pI и близкие значения молекулярной массы являются, по-видимому, причиной, осложняющей разделение этих белков.

Исследование фунгистатической активности САФ, очищенных хроматографией на хитине хитиназ А и В и надосадочной жидкости, содержащей хитиназы С и С₁, показало, что препарат, содержащий хитиназы А и В, подавляет рост всех изучаемых культур фитопатогенных микромицетов. Не исключено, что для проявления выраженной фунгистатической активности необходимо сочетание хитиназ с различным механизмом действия (экзо- и эндохитиназы).

ВЫВОДЫ

1. Штаммы с повышенной активностью эндонуклеазы и хитиназы отличаются от исходного большей чувствительностью к Нал и МС, более длительной лаг-фазой роста и временем генерации, более крупными размерами клеток, низкой протеолитической активностью и конститутивным синтезом эндонуклеазы и хитиназы.

2. Внеклеточная эндонуклеаза синтезируется в постэкспоненциальную фазу роста бактерий и индуцируется различными по механизму действия агентами, вызывающими повреждение ДНК, либо остановку ее репликации — индукторами SOS-функций клетки. Под влиянием индукторов увеличивается активность фермента и в клетках бактерий.

3. Индукция синтеза эндонуклеазы под влиянием налидиксовой кислоты предшествует началу деления клеток, преодолевших задержку роста, вызванную действием препарата.

4. Под влиянием митомидина С и налидиксовой кислоты в культуральной жидкости *S.marcescens* помимо эндонуклеазы повышается активность липазы, лецитиназы и щелочной фосфатазы; снижается активность протеаз. Хлорамфеникол

подавляет индуцирующий эффект.

5. У *S.marcescens* Вù 211 ATCC 9986 в отсутствии МС и хитина хитинолитические ферменты не синтезируются. Показано, что биосинтез хитиназ помимо хитина индуцируется митомицином С, а биосинтез хитобиазы индуцируется субстратом и не входит в систему SOS-ответа клетки.

6. В условиях экспрессии генов хитиназ у штамма *S.marcescens* ATCC 9986 под влиянием митомицина С, а также у мутантного штамма Д5 с конститутивным синтезом этих ферментов, хитиназная активность, в том числе и активность эндохитиназы, обнаруживается в среде в конце экспоненциальной фазы, а наиболее высокий уровень ферментов достигается в стационарной фазе. В этих условиях в культуральной жидкости обнаруживается четыре белка с хитиназной активностью с молекулярными массами 58, 52,38 и 21 кДа.

7. Хитиназа А (58 кДа) *S.marcescens* обнаружена в культуральной жидкости в виде двух изоформ с рI 6.25 и 4.85-5.25 и является экзохитиназой, хитиназа В (52 кДа) — в виде одной изоформы с рI 4.85-5.25 и относится к эндохитиназам. Оба фермента обладают выраженной фунгистатической активностью.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Юсупова Д.В., Порфирьева О.В., Соколова Р.Б., Трухина Е.В., Тюлина И.Л., Синявина О.С., Гребеньков В.И., Ожерельев С.Ю. Способ получения культуральной жидкости *Serratia marcescens*, обладающей хитиназной активностью / Патент № 1804479, приор. 02.01.91, регистр. 23.03.93.

2. Юсупова Д.В., Порфирьева О.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В. Физиолого-биохимические особенности штаммов *Serratia marcescens* с повышенной активностью внеклеточной эндонуклеазы // Деп. в ВИНТИ 23.07.91, № 3122-В91

3. Петухова Е.В., Соколова Р.Б., Юсупова Д.В. Индукция синтеза внеклеточных белков *Serratia marcescens* под влиянием налидиксовой кислоты // Деп. в ВИНТИ 13.06.92, №1569-В92.

4. Юсупова Д.В., Порфирьева О.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В. Особенности

синтеза внеклеточной хитиназы *Serratia marcescens* // Биологические науки. - 1992. - №2. - С.51-57.

5. Юсупова Д.В., Порфирьева О.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В. Эндонуклеаза *Serratia marcescens*. Новые продуценты фермента // Биотехнология. - 1992. - №1. - С.26-29.

6. Юсупова Д.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В., Черепнева И.Е. Индукция синтеза внеклеточной эндонуклеазы *Serratia marcescens* под влиянием агентов, вызывающих повреждение ДНК // Биотехнология. - 1992. - №5. - С.78-80.

7. Юсупова Д.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В. Влияние налидиксовой кислоты и митомицина С на рост и биосинтез внеклеточных белков *Serratia marcescens* // Антибиотики и химиотерапия. - 1993. - Т.38, №8-9. - С.16-21.

8. Юсупова Д.В., Порфирьева О.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В. Влияние соединений индуцирующих SOS-ответ на динамику и уровень синтеза внеклеточных гидролаз *Serratia marcescens* // Прикладная биохимия и микробиология. - 1995. - Т.31, №3. - С.316-322.

9. Gabdrakhmanova L.A., Petukhova E.V., Sokolova R.B., Yusupova D.V. Biosynthesis of endochitinase of *Serratia marcescens* // Microbios. - 1998. - №96. - С.157-163.

10. Юсупова Д.В., Порфирьева О.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В. Влияние соединений, индуцирующих SOS-ответ на динамику и уровень синтеза внеклеточных гидролаз *Serratia marcescens* / Тез. докл. научн. конф. «Биосинтез ферментов микроорганизмами». - Москва, 1991. - С.120.

11. Юсупова Д.В., Соколова Р.Б., Порфирьева О.В., Трухина Е.В. Хитиназа *Serratia marcescens*. Особенности синтеза / Материалы IX конференции межвузовского (межотраслевого) проекта «Ферменты микроорганизмов (Нуклеазы)». - Казань, 1991. - С.5-8.

12. Петухова Е.В., Соколова Р.Б., Юсупова Д.В. Рост и биосинтез эндохитиназы *Serratia marcescens* / Сб. докл. XI Всерос. конф. «Ферменты микроорганизмов». - Казань, 1998. - С.43-49.

13. Петухова Е.В., Габдрахманова Л.А., Соколова Р.Б., Сафина Д.В., Юсупова Д.В. Внеклеточные хитиназы *Serratia marcescens* и особенности их синтеза / Материалы Пятой конф. «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана» - Москва, 1999. - С.279-281.

14. Петухова Е.В., Пономарева А.З. Характеристика мутантных штаммов *Serratia marcescens* с повышенной хитиназной активностью / Материалы Пятой конф. «Новые перспективы в исследовании хитина и хитозана. - Москва, 1999. - С.281-282.

15. Герасименко Д.В., Петухова Е.В. Динамика биосинтеза внеклеточных хитиназ *Serratia marcescens* / Материалы XXXVIII Междунар. научн. студен. конф. «Студент и научно-технический прогресс». - Новосибирск, 2000. - С.71-72.

16. Герасименко Д.В., Петухова Е.В. Биосинтез внеклеточных белков *Serratia marcescens* с хитиназной активностью / Материалы Междунар. научн. конф. студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов». - Москва, 2000. - С.22-23.

Петухова

Подписано в печать 13.09.2000. Формат 60/84/16.

Усл. печ. л. 1,5. Договор № 20. Тираж 90.

Лаборатория оперативной печати ТГГИ.
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373