

На правах рукописи

Романова Юлия Джафаровна

**Механизмы регуляции активности эндонуклеазы бактерий
*Serratia marcescens***

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Казань – 2009

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов при кафедре микробиологии биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Филимонова Мария Николаевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Зубаиров Дилявер Мирзабдуллович

доктор ветеринарных наук, профессор
Алимов Азат Миргасимович

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики
КНЦ РАН.

Защита состоится «___» _____ в ___ ч. на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, _____

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н. И. Лобачевского Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина

Автореферат разослан «___» _____

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук _____ Абрамова З.И.

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность проблемы. Эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens* – это одна из наиболее изученных бактериальных нуклеаз, проявляющих широкую субстратную специфичность, сведения о которой представлены в большинстве банков данных [Brenda; RSDB; Protein Data Bank; SCOP]. Известны многие физико-химические и биохимические свойства, структура, каталитически значимые аминокислотные остатки, разработаны модели механизма действия данного фермента [Nestle N. et al., 1969a, 1969b; Лещинская И. Б. и др., 1974; Филимонова М. Н. и др., 1980, 1981, 1995, 1996, 1997, 1999, 2001, 2003; Biedermann K. et al., 1989; Miller M. D. et al., 1994; Friendhoff P. et al., 1994, 1996; Kolmes B. et al., 1996; Lunin V. Y. et al., 1997; Шляпников С. В. и др., 1999]. Эндонуклеаза *S. marcescens* представляет ряд эволюционно родственных и широко распространенных в мире про- и эукариот нуклеаз, различающихся физиологической ролью [Lacks S. et al., 1974, 1975; Rosenthal A. L., 1977; Low R. L. et al., 1987; Vincent R. D., 1988; Puyet A. et al., 1990; Muro-Pastor et al., 1992, 1994; Ruiz-Carrillo A. et al., 1987, 1993; Ikeda et al., 1996; Meiss G. et al., 1998; Филимонова М.Н., 1999]. Эндонуклеазу производят и применяют в пчеловодстве и молекулярно-биологических исследованиях [Manual “Benzon Nuclease”, 1989; Панфилова З. И. и др., 1983; Детиненко Л.Д. и др., 1995]. Продемонстрирована перспективность использования данного фермента в качестве противовирусного препарата при лечении животных [Аликин Ю. С. и др., 1998]. Установлена противоопухолевая активность [Габдуллина Г. К., 1980]. Вместе с этим механизмы регуляции активности эндонуклеазы изучены недостаточно. Недавно были установлены особенности регуляции ДНКазной активности катионами магния, а также соединениями, содержащими катионы ртути и кобальта [Филимонова М. Н. и др., 1997, 2001, Filimonova M. et al., 2003].

Недостаток информации о механизмах регуляции активности эндонуклеазы тормозит формирование объективных представлений о функционировании данного фермента вне- и внутри клетки, ограничивает эффективность и сферы его применения и, вероятно, препятствует его дальнейшему продвижению в

практику. Таким образом, механизмы регуляции активности эндонуклеазы требуют углубленного исследования. Изложенное определяет **актуальность настоящей работы**, в которой представлены результаты анализа действия мононуклеотидов, различающихся природой азотистых оснований, углеводного остатка и числом фосфатных групп, и катионов магния на активность эндонуклеазы по отношению к субстратам, отличающимся друг от друга вторичной структурой, степенью спирализации и полимерности.

1.2 Цель работы. Целью настоящей работы стало исследование ключевых механизмов регуляции активности эндонуклеазы *Serratia marcescens*. В соответствии с целью решали следующие **задачи**:

1. Определить оптимальное соотношение $Mg/P_{\text{субстрата}}$ для гидролиза РНК.
2. Провести сравнительный анализ влияния катионов магния на конформацию высокомолекулярной ДНК, суммарной и транспортной РНК.
3. Провести кинетический анализ гидролиза высокомолекулярной ДНК, суммарной и транспортной РНК.
4. Провести оценку гидролиза ДНК и РНК при их одновременном присутствии в среде.
5. Изучить гидролиз нуклеиновых кислот: высокомолекулярной ДНК и суммарной РНК, - в присутствии мононуклеотидов, различающихся типом азотистых оснований, углеводного остатка и числом фосфатных групп.

1.3 Научная новизна. Впервые установлено оптимальное для гидролиза РНК соотношение $Mg/P_{\text{РНК}}$. Показано, что при оптимальном для проявления активности содержании катионов магния происходит изменение вторичной структуры субстратов: высокомолекулярной ДНК - в пределах В-конформации, суммарной и транспортной РНК – в пределах А-конформации.

Установлен механизм регуляции активности эндонуклеазы катионами магния. Показано, что независимо от конформационных особенностей, степени полимерности и спирализации субстрата, прочность связывания эндонуклеазы с субстратом постоянна и не зависит от наличия в среде катионов магния. Установлено, что в отсутствии катионов магния эндонуклеаза проявляет

специфичность к типу гидролизуемого субстрата. Показано, что присутствие Mg^{2+} отражается на скорости распада фермент-субстратного комплекса с образованием продукта. Установлено, что нуклеозидмонофосфаты не влияли на активность эндонуклеазы по отношению к ДНК и подавляли активность - к РНК, ингибируя фермент по бесконкурентному типу в случае CMP, GMP, UMP и частично конкурентному типу в случае AMP и d AMP. Выявлено, что дезоксирибонуклеозидтрифосфаты не влияли на активность эндонуклеазы ни по отношению к ДНК, ни к РНК, а CTP, GTP, UTP - только к ДНК, и, напротив, подавляли РНКазную активность. Показано, что АТР играет роль положительного эффектора в присутствии РНК и отрицательного – в присутствии ДНК, ингибируя или активируя эндонуклеазу по частично смешанному типу. Установлены механизмы регуляции активности эндонуклеазы мононуклеотидами, различающимися типом азотистых оснований, углеводного остатка и числом фосфатных групп.

1.4 Практическая значимость. Установленные механизмы регуляции эндонуклеазы повышают эффективность ее применения и способствуют ее дальнейшему продвижению в практику. Результаты определения оптимального соотношения $Mg^{2+}/P_{РНК}$ были использованы при разработке антимикробного препарата на основе эндонуклеазы, защищенного Патентом РФ №2337139.

1.5 Решение поставленных задач позволило сформулировать следующие **основные научные положения, выдвигаемые на защиту:**

- При оптимальном для проявления активности содержании Mg^{2+} происходит изменение вторичной структуры субстратов. При этом прочность связывания эндонуклеазы с субстратом в отличие от скорости продуктивного распада фермент-субстратного комплекса, которая многократно меняется, не зависит от наличия в среде Mg^{2+} , конформационных особенностей, степени полимерности и спирализации субстрата, что лежит в основе механизма регуляции эндонуклеазы Mg^{2+} .
- Мононуклеотиды могут служить эффекторами эндонуклеазы, регулируя ее активность, предпочтительно по отношению к РНК, по частично

конкурентному, бесконкурентному или частичному смешанному типу, что зависит от их содержания в среде и химического состава, а также содержания в среде Mg^{2+} и представляет суть механизмов регуляции активности эндонуклеазы мононуклеотидами.

1.6 Апробация работы. Основные положения диссертации представлены на научных конференциях “Материалы и технологии XXI века” (Казань, 2004), “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии” (Казань, 2004), “Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение” (Казань, 2005), “Студент и научно-технический прогресс” (Новосибирск, 2007), «Биология - наука 21 века», (Пушино, 2007).

1.7 Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 9 работ, в числе которых 1 патент, 3 статьи, 5 тезисов.

1.8 Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 106 страницах и включает в себя: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, выводы, заключение, список литературы (131 источник, в том числе 84 иностранных). Диссертация содержит 11 таблиц и 24 иллюстрации.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследования

Работа выполнена в 2003 – 2008 гг. в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов при кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина.

На начальных этапах исследование влияния нуклеозидмонофосфатов на активность эндонуклеазы проводилось при участии Игнатъевой И.В. В определении оптимальной концентрации Mg^{2+} для РНКазной активности эндонуклеазы участвовала Сусарова А.Н. Спектры кругового дихроизма определяли в ИОФХ им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН под руководством профессора Нуретдинова И.А. и с помощью к.х.н. Губской В.П. Автор выражает искреннюю благодарность названным сотрудникам и студентам.

2.1.1 Материалы исследований

Объектом исследования служил гомогенный препарат эндонуклеазы *S.marcescens* (изоформа Sm2), предварительно выделенный и охарактеризованный [Филимонова М.Н. и др., 1991; Педерсен Ю. и др., 1995].

В качестве **субстратов** использовали препараты суммарной РНК (НПО «Вектор», Россия) и («US Biochemical Corporation», США), транспортную РНК (тРНК) дрожжевую («ICN», США), высокомолекулярную ДНК из молок лосося тип XIV («Sigma», США) и ДНК из эритроцитов цыплят («Reanal», Венгрия).

В работе использовали 5'AMP, 5'CMP, 5'GMP, 5'UMP, 5'CTP, 5'GTP («Sigma», США), 5'dAMP, 5'dTMP, 5'dGMP, 5'dCMP, 5'dATP, 5'dTTP, 5'dGTP, 5'dCTP («ICN», США), 5'ATP, 5'UTP («US Biochemical Corporation», США).

2.1.2 Методы исследований

Активность эндонуклеазы определяли методом кислоторастворимых фракций или по гиперхромному эффекту в соответствии с рекомендациями [Лещинская И. Б. и др., 1974; Filimonova M. et al., 2003].

Концентрацию ДНК и РНК в усредненных нуклеотидах рассчитывали, исходя из молярного коэффициента поглощения нуклеотидного звена при 260 нм [Filimonova M. et al., 2003].

Концентрацию эндонуклеазы рассчитывали исходя из молекулярной массы [Педерсен Ю. и др., 1995] и молярного коэффициента поглощения [Филимонова М. Н. и др., 1981].

Оптимальное содержание Mg^{2+} для гидролиза РНК определяли методом кислоторастворимых фракций в отсутствии и присутствии в реакционной смеси 0,58; 2,9; 5,8; 11,6 мМ Mg^{2+} . Активность в отсутствии Mg^{2+} принимали за 100%.

Все последующие исследования проводили при соотношении Mg^{2+} /фосфор_{субстрата} 40 : 1.

При определении кинетических параметров гидролиза ДНК, суммарной и транспортной РНК скорость гидролиза субстратов оценивали по гиперхромному эффекту, определяя прирост поглощения инкубационной смеси при 260 нм и длине оптического пути 10 мм. Гидролиз инициировали

добавлением нуклеазы до концентрации 6,3 нМ к реакционной смеси, включавшей 0,001; 0,002; 0,006 % субстрата. При проведении гидролиза в отсутствие Mg^{2+} в реакционную смесь добавляли 10-кратный к концентрации субстрата избыток ЭДТА для удаления следов поливалентных металлов, включая Mg^{2+} . K_m и K_{cat} рассчитывали по методу Лайнуивера-Берка.

Субстратное предпочтение при одновременном присутствии в среде ДНК и РНК определяли, сравнивая динамику прироста поглощения при 260 нм кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК и ДНК, находящихся в реакционной смеси по отдельности и вместе (взятых в равных долях), при соотношении нуклеаза/субстрат 4,24 – 8,47 пмоль/мг. За 100 % принимали поглощение реакционной смеси перед внесением фермента. Содержание продуктов, включающих дезоксирибозу, определяли по методу Дише [Досон Р. и др., 1991], а рибозу по методу Мейбаум [Збарский И. Б. и др., 1968].

Влияние нуклеотидов на активность нуклеазы определяли, добавляя их в реакционную смесь непосредственно перед внесением фермента (или воды в контроле на субстрат) в эквимольном к концентрации субстрата количестве и, дополнительно, увеличив концентрацию нуклеозидтрифосфатов вдвое. Для того, чтобы соотношение $Mg^{2+}/P_{\text{субстрата}}$ было строго выдержано к нуклеотидам перед внесением в реакционную смесь добавляли Mg^{2+} в эквимольном количестве.

Ингибиторный анализ проводили, определяя кинетические параметры гидролиза субстратов в присутствии нуклеотидов.

Для определения типа ингибирования строили графики зависимости двойных обратных величин начальной скорости реакции от концентрации субстрата по методу Лайнуивера-Берка, применяя линейный регрессионный анализ из средств статистического анализа данных программы «Sigma Plot» для «Windows» (США).

Константы ингибирования для CMP, GMP и UMP рассчитывали, построив график зависимости S/V от I при ряде фиксированных концентраций субстрата по методу Корниш-Боуден, для AMP, dAMP и ATP – построив график двойных обратных величин зависимостей длин отрезков, полученных по методу

Лайнуивера-Бэрка, от концентрации ингибитора [Диксон М. и др., 1982], а также с помощью уравнений [Крупянок В. И., 2007].

Спектры кругового дихроизма (КД) определяли на приборе Jasco-J 500 A (“Japan Spectroscopic Co.”, LTD, Япония) при 25° С и длине оптического пути 2 мм. Спектр каждого образца определяли в трех повторностях. Молярную эллиптичность рассчитывали общепринятым методом .

Статистический анализ данных, полученных не менее чем из 6 повторностей эксперимента, проводили, используя подпрограмму статистического анализа графической программы «Sigma Plot» для уровня достоверности 95%. Достоверность разницы полученных значений оценивали с помощью t-теста Стьюдента из пакета статистического анализа программы «Microsoft Excel 2000».

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Исследование механизма регуляции активности эндонуклеазы катионами Mg

Определение особенностей регуляции ДНКазной активности катионами магния и соединениями, содержащими катионы ртути и кобальта [Филимонова М. Н. и др., 1997, 2001; Filimonova M. et al., 2003], приближало к пониманию механизма регуляции активности эндонуклеазы Mg^{2+} в целом и свидетельствовало о необходимости получения дополнительной информации. Так, следовало выяснить, будет ли роль Mg^{2+} при гидролизе РНК идентичной, повлияет ли на результат степень спирализации РНК, как присутствие в среде Mg^{2+} отразится на интимном взаимодействии фермента и субстрата. Отвечая на эти вопросы, определяли кинетические параметры гидролиза суммарной и транспортной РНК (тРНК), и высокомолекулярной ДНК в присутствии и отсутствии Mg^{2+} , анализировали изменение конформации субстратов под действием Mg^{2+} . Также определяли оптимальное соотношение Mg^{2+} /фосфат_{РНК}.

При определении оптимального содержания Mg^{2+} для гидролиза РНК было установлено, что в присутствии 0,58 мМ Mg^{2+} , что соответствовало

соотношению Mg^{2+} /фосфат_{РНК} 2:1, активность нуклеазы возрастала более чем в 3 раза по сравнению с активностью в его отсутствии. Дополнительное 5-кратное увеличение содержания Mg^{2+} вызывало возрастание активности примерно в 2 раза. Последующее увеличение содержания Mg^{2+} в 2 - 4 раза приводило к изменению активности в пределах ошибки опыта. Таким образом, оптимальной для проявления активности по отношению к РНК была концентрация Mg^{2+} 2,9 - 11,6 мМ, что соответствовало соотношению концентраций Mg^{2+} /фосфат_{РНК} (10-40):1. Полученные результаты совпадали со значениями оптимального содержания Mg^{2+} и соотношения Mg^{2+} /фосфат_{ДНК} для проявления ДНКазной активности изоформ Sm1 и Sm2 эндонуклеазы [Филимонова М. Н. и др., 1997].

Изменение активности по отношению к РНК, так же как и по отношению к ДНК [Филимонова М. Н. и др., 1997], сочеталось с изменением конформации субстрата под действием Mg^{2+} .

Изменение конформации субстратов под действием Mg^{2+} анализировали с помощью кругового дихроизма (КД) и адсорбционной спектроскопии. Как следовало из спектров КД, суммарная и тРНК и в отсутствие Mg^{2+} и при его оптимальном содержании находились в А-форме. Об этом свидетельствовало наличие большой положительной полосы разностного дихроичного поглощения в области 260-265 нм и небольшой отрицательной полосы - в области 225 - 240 нм. Добавление Mg^{2+} до соотношения Mg^{2+} /фосфат_{РНК} 12:1 приводило к смещению в коротковолновую область центра большой положительной полосы и увеличению разностного дихроичного поглощения на 10-12%. Изменение спектров КД сочеталось с изменением УФ спектров препаратов и свидетельствовало об изменении вторичной структуры РНК, которое происходит в результате образования комплексов Mg^{2+} с фосфатными группами. Аналогично под действием Mg^{2+} было определено изменение вторичной структуры ДНК. При добавлении Mg^{2+} до соотношения Mg^{2+} /фосфат_{ДНК} 12:1 в спектре КД наблюдали уменьшение на 13-14% разностного дихроичного поглощения положительной полосы с центром при 275 нм. Изменения в спектрах КД ДНК под действием Mg^{2+} свидетельствовали о том, что изменения в структуре ДНК происходили в

пределах В-конформации. Таким образом, исследование показало, что при добавлении Mg^{2+} до соотношения $Mg^{2+}/\text{фосфат}_{\text{ДНК}}$ 12:1 происходит изменение вторичной структуры как ДНК, так и РНК. Дальнейшее увеличение этого соотношения приводило к изменению спектров КД ДНК и РНК в пределах ошибки опыта.

Кинетический анализ гидролиза ДНК и РНК. Результаты определения кинетических параметров гидролиза РНК и ДНК представлены в табл. 1.

Табл. 1 Кинетические параметры гидролиза РНК, ДНК и тРНК при $Mg^{2+}/P_{\text{субстрата}}$ 40:1 (1) и в отсутствии Mg^{2+} (2)

Субстрат	Km, мг/мл		K_{cat} , сек ⁻¹ на 1 мМ нуклеазы	
	1	2	1	2
РНК	0,032	0,038	86,2	1,4
тРНК	0,035	0,048	126,7	0,07
ДНК	0,027	0,043	143,6	6,7

Как видно из табл. 1, константа Михаэлиса-Ментен имела близкие значения для всех исследованных субстратов, независимо от присутствия в среде Mg^{2+} . Это позволяет заключить, что присутствие в среде Mg^{2+} не является необходимым условием для образования комплекса эндонуклеазы с субстратом, а конформация субстрата, тип углеводного остатка и величина заряда сахаро-фосфатного остова спирали не оказывают большого влияния на прочность связывания фермента с субстратом. Напротив, отсутствие в среде Mg^{2+} отражалось на скорости продуктивного распада фермент-субстратного комплекса и способствовало проявлению специфичности эндонуклеазы в отношении исследованных субстратов. В частности, в отсутствие Mg^{2+} K_{cat} гидролиза тРНК была меньше K_{cat} гидролиза суммарной РНК, высокомолекулярной ДНК, а также тРНК в присутствии Mg^{2+} , соответственно, почти в 20-, 100- и 1000 раз. Гидролиз высокомолекулярной ДНК, суммарной и транспортной РНК при соотношении $Mg^{2+}/\text{фосфат}_{\text{ДНК}}$ 40:1 характеризовался близкими значениями K_{cat} .

Исследование гидролиза ДНК и РНК при их одновременном присутствии в среде проводили при оптимальном содержании в среде магния, определяя динамику накопления кислоторастворимых дезоксирибо- и рибонуклеотидов. Результаты представлены на рисунке 1. Как видно из рис. 1, в присутствии альтернативного субстрата: РНК или ДНК, соответственно, - накопление продуктов гидролиза, как ДНК, так и РНК уменьшается в 2 - 3 раза,

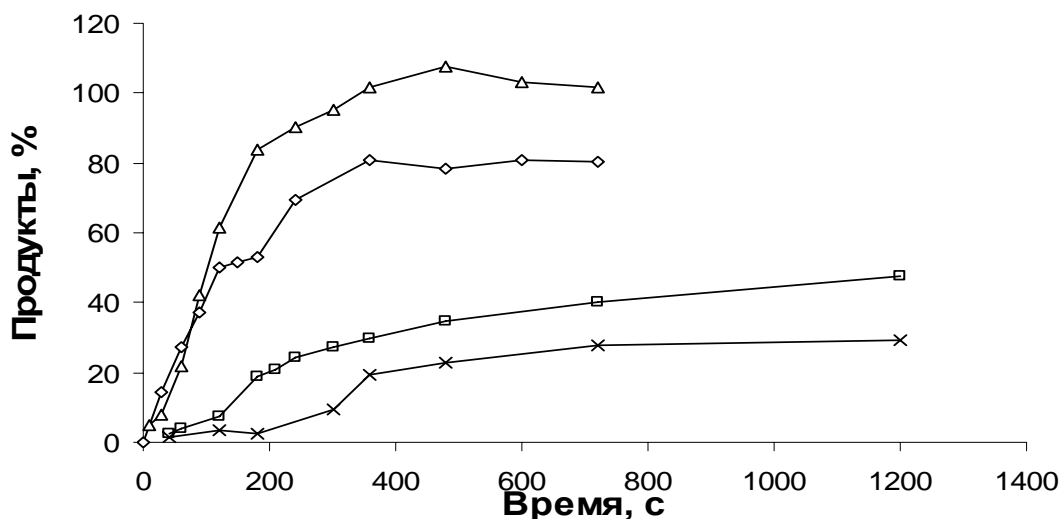


Рис. 1 Динамика накопления продуктов гидролиза ДНК в отсутствии (Δ) и присутствии (□) РНК и РНК в отсутствии (◇) и присутствии (X) ДНК

что, прежде всего, можно объяснить наличием в молекуле эндонуклеазы одного и единого для этих субстратов активного центра. Картина гидролиза РНК и ДНК в присутствии альтернативного субстрата имеет много общего. В частности, в дополнение к изменению скорости накопления кислоторастворимых продуктов, в присутствии альтернативного субстрата изменяется форма кривой накопления продуктов гидролиза. Обе кривые имеют сигмоидальный характер и отличаются друг от друга участком, соответствующим поздней стадии гидролиза.

Таким образом, исследование механизма регуляции активности эндонуклеазы катионами Mg показало, что изменение вторичной структуры РНК под действием Mg^{2+} сочеталось с изменением РНКазной активности эндонуклеазы, что совпадало с ранее установленной [Филимонова М. Н. и др., 1997] и подтвержденной в настоящей работе тенденцией в отношении ДНК.

Полученные результаты служат подтверждением идентичности механизмов регуляции РНКазной и ДНКазной активностей Mg^{2+} и указывают на то, что ни степень полимерности, ни степень спирализации субстрата не имеют большого влияния на исследуемый механизм. Проведенный анализ позволил сформулировать схему механизма регуляции активности эндонуклеазы катионами магния (рис. 2).

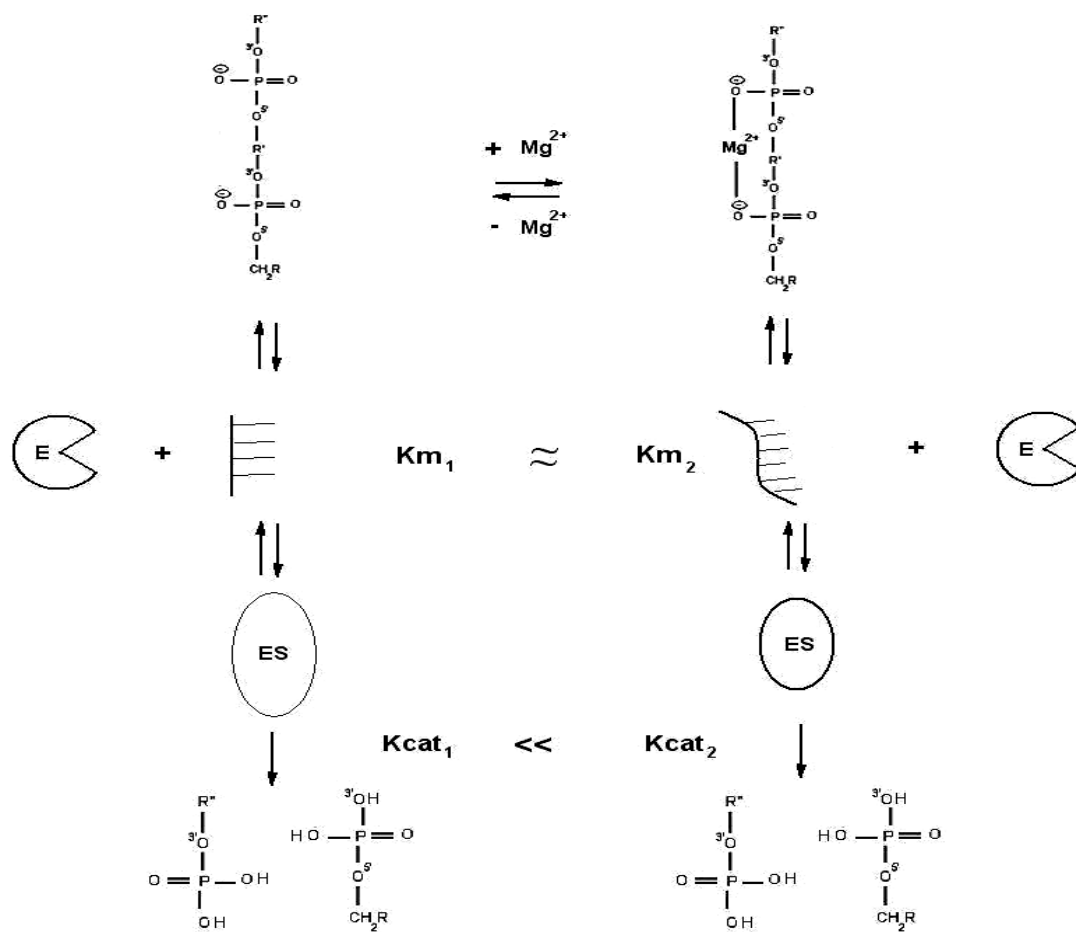


Рис. 2 Механизм регуляции активности эндонуклеазы катионами Mg^{2+} . Условные обозначения: E – фермент, ES – фермент-субстратный комплекс

Как видно из рис. 2, Mg^{2+} , образуя комплексы с фосфатными группами субстрата: ДНК или РНК,- вызывает такое изменение его вторичной структуры, которое приводит к многократному возрастанию скорости продуктивного распада фермент-субстратного комплекса. В отсутствии Mg^{2+} скорость продуктивного

распада фермент-субстратного комплекса зависит от типа гидролизуемого субстрата, что свидетельствует о проявлении эндонуклеазой субстратной специфичности и указывает на необходимость с осторожностью относиться к распространенному мнению [Nestle N. et al., 1969; Лещинская И. Б. и др., 1974; Friedhoff P. et al., 1996; Brenda; RSDB; Protein Data Bank; SCOP] о широкой специфичности данного фермента.

3.2 Влияние нуклеотидов на активность эндонуклеазы

Анализ действия нуклеозидмонофосфатов на активность эндонуклеазы представлял интерес в связи с тем, что они входят в число продуктов гидролиза РНК и ДНК. Результаты анализа, представленные на рисунках 3 – 6 и в таблице 2, свидетельствовали о возможности регуляция активности эндонуклеазы продуктами реакции.

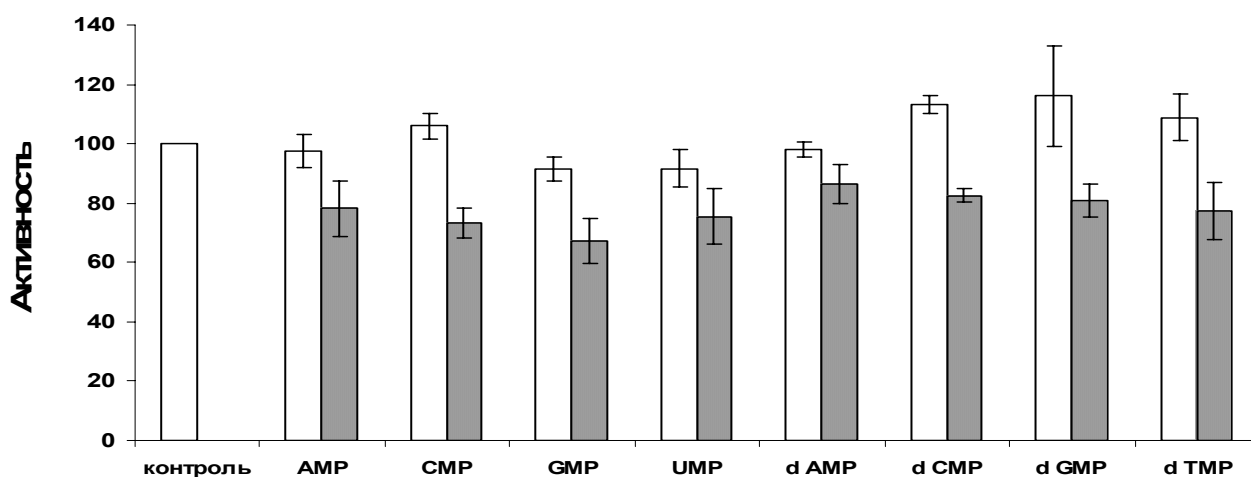


Рис. 3 Активность эндонуклеазы (%) по отношению к ДНК (□) и РНК (▨) в присутствии 0,3 мМ нуклеозидмонофосфатов. Здесь и далее за 100 % принята активность в отсутствии нуклеотидов (контроль)

Статистический анализ данных, представленных на рис. 3, показал, что разница значений, полученных в отсутствии и присутствии эквимольного к концентрации субстрата количества нуклеотидов, была достоверной лишь в отношении РНКазной активности. Под действием нуклеотидов РНКазная активность уменьшалась в 1,2 - 1,3 раза, без выраженного предпочтения к типу углеводного остатка и азотистого основания в составе нуклеотида. В связи с отсутствием аналогичного эффекта нуклеотидов на ДНКазную активность

дальнейшие исследования, в частности ингибиторный анализ, были ограничены РНКазной активностью эндонуклеазы.

Определение типа ингибирования не выявило принципиальной разницы между AMP и d AMP. Графическое изображение зависимости активности от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Бэрка напоминало конкурентный тип ингибирования (рис. 4). Наклон кривых зависимости активности от концентрации субстрата увеличивался в присутствии AMP или dAMP по сравнению с кривыми, полученными в отсутствии нуклеотидов. За исключением кривой, полученной в присутствии 1,2 мМ dAMP, остальные кривые пересекались вблизи оси ординат в точках, лежащих выше оси абсцисс, в области ее положительных значений. Однако кривая, полученная в присутствии 1,2 мМ dAMP, располагалась почти параллельно оси 1/S. Точка пересечения данной кривой с линией контроля была локализована почти на оси 1/V. Прямой зависимости между увеличением наклона кривых и содержанием в среде нуклеотидов не наблюдали.

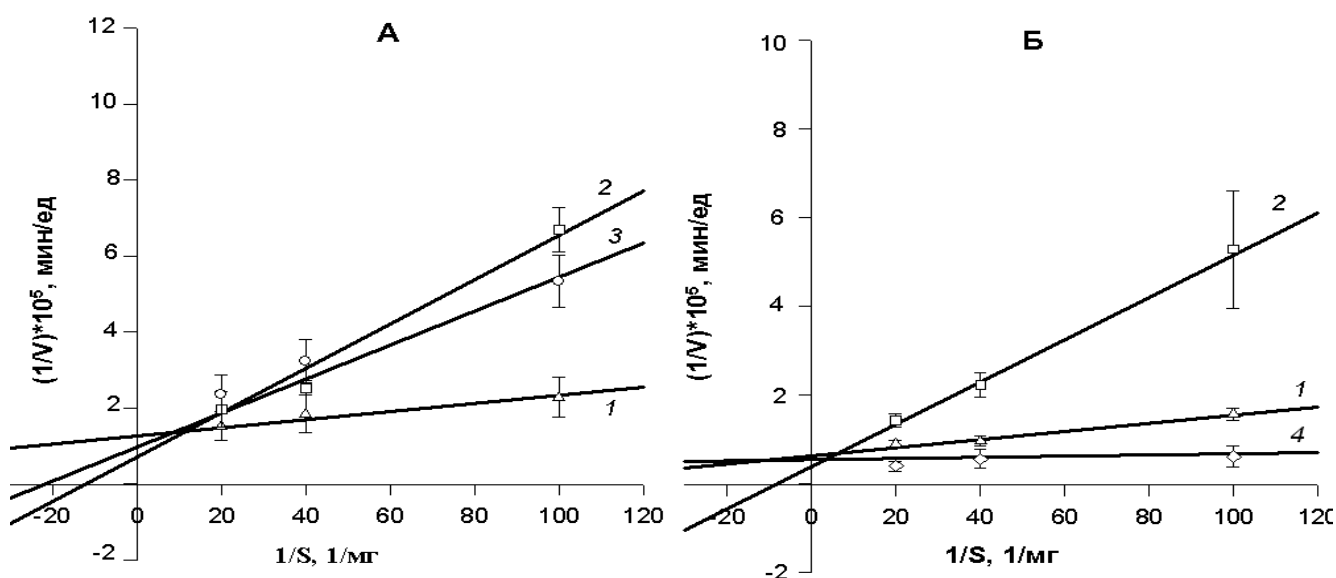


Рис. 4 Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата в присутствии (линии 2-4) и отсутствии (линия 1) AMP (А) и d AMP (Б). 1 – 0 мМ (контроль), 2 – 0,29-, 3 - 0,58-, 4 – 1,2 мМ мононуклеотида

Анализ вторичных кривых, представляющих собой графики зависимости от концентрации ингибитора наклона кривых, представленных на рис.4, и отрезков, отсекаемых этими кривыми от оси ординат, выявил следующее. Первые -, независимо от типа ингибитора, имели форму вогнутой параболы, вторые – выпуклой параболы, что, соответственно, свидетельствовало о гиперболическом ингибировании или гиперболической активации, согласно классификации Клееланда В. В. [Cleland W. W., 1979]. Таким образом, полученные результаты позволяли заключить, что под действием АМР и d АМР происходит частичное конкурентное ингибирование, при котором АМР или dАМР, образуя комплекс с эндонуклеазой, уменьшает сродство эндонуклеазы к РНК (конкурируя с РНК за центр связывания), но не предотвращает полностью ее связывание с РНК. При этом при некоторых концентрациях ингибитора продуктивный распад тройного комплекса (фермента с субстратом и ингибитором - ESI) может протекать по альтернативному пути ($EI + S = EIS = EI + P$), который быстрее обычного, в результате чего скорость ферментативной реакции возрастает.

Отсутствие принципиальной разницы между АМР и dАМР, выявленное в ходе ингибиторного анализа, согласовывалось с близостью значений констант ингибирования, представленных в табл.2, и свидетельствовало об отсутствии

Табл. 2 Константы ингибирования (мМ) РНКазной активности нуклеозидмонофосфатами, рассчитанные методами Лайнуивера-Берка (1) и Корниш-Боуден (3), а также определенные из графиков двойных обратных величин изменений наклона кривых от концентрации ингибитора (2) или из уравнения (4)

Нуклеотид	1	2	3	4
АМР	-	0,0765	-	0,0859
dАМР	-	0,0600	-	0,0341
СМР	0,602	-	0,0862	0,313
GMP	1,12	-	0,229	0,623
UMP	0,979	-	0,3107	1,32

влияния на картину ингибирования типа углеводного остатка в составе нуклеотидов, что позволило ограничить дальнейший анализ исследованием производных рибозы.

Определение типа ингибирования эндонуклеазы GMP, UMP, CMP выявило сходство этих нуклеотидов между собой и отличие от AMP и d AMP. Графики зависимости активности от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Бэрка при фиксированных концентрациях GMP, UMP, CMP и в их отсутствии представляли собой прямые, почти параллельные друг другу (рис.5), что соответствовало бесконкурентному типу ингибирования.

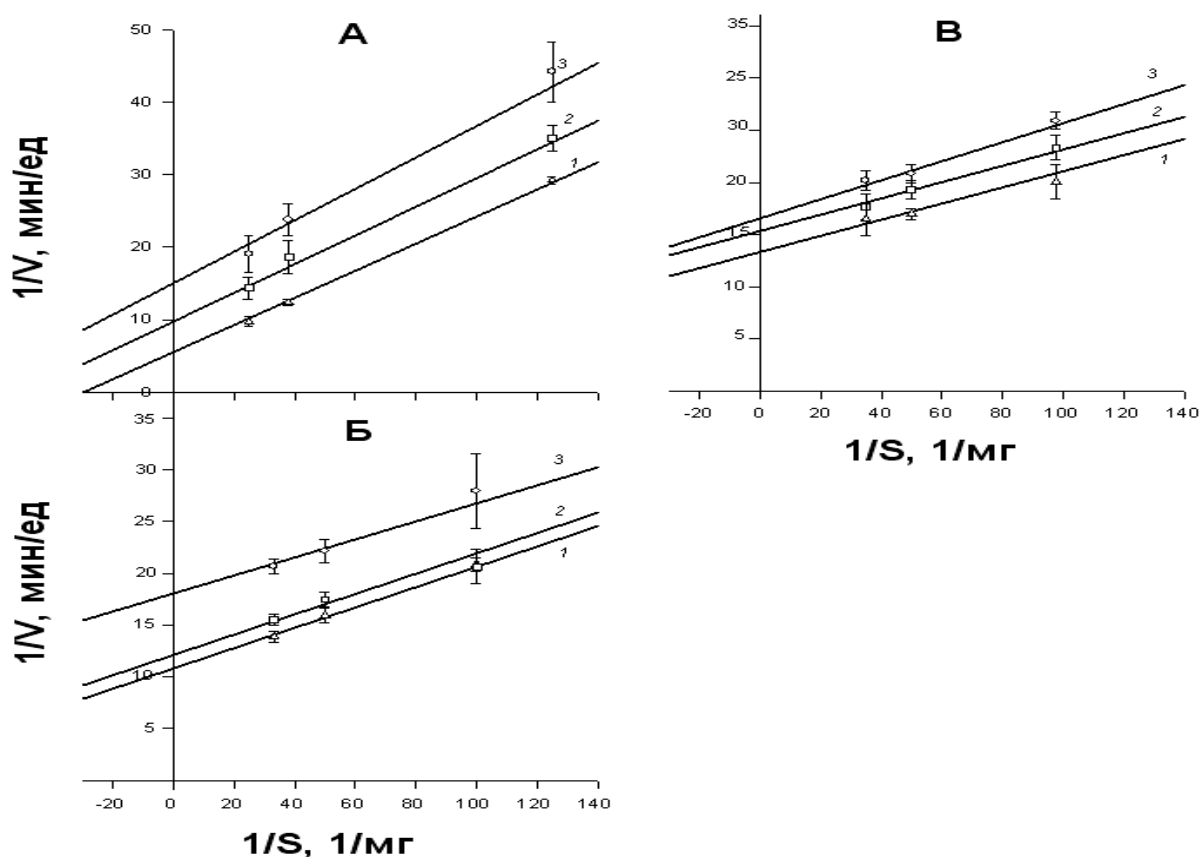


Рис. 5 Зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата в присутствии (линии 2-3) и отсутствии (линия 1) CMP (А) , GMP (Б), UMP (В). 1 – 0 мМ (контроль), 2 – 0,29 - , 3 – 0,58 мМ мононуклеотида

Определение констант ингибирования (табл. 2), независимо от метода их определения, выявило бесспорное различие между значениями AMP/d AMP и

GMP или - UMP. Близкие значения констант ингибирования были определены графическим методом или по методу Лайнуивера-Берка для GMP и UMP. Для CMP величина константы ингибирования, определенная по методу Корниш-Боуден, приближалась к константам AMP и d AMP, а при определении двумя другими методами, имела промежуточное значение между AMP/d AMP и GMP/UMP.

Таким образом, исследование изменения активности эндонуклеазы под действием нуклеозидмонофосфатов показало, что все мононуклеотиды, образующиеся в результате гидролиза ДНК или РНК, не оказывая заметного влияния на ДНКазную активность, ингибируют РНКазную активность эндонуклеазы. Причем AMP и dAMP образуют комплекс с эндонуклеазой до образования фермент-субстратного комплекса. Напротив, GMP (dGMP), UMP(dUMP), CMP(dCMP) не способны взаимодействовать с эндонуклеазой до образования фермент-субстратного комплекса, поскольку специфический(е) центр(ы) связывания с ними, становится доступным(и) лишь при образовании фермент-субстратного комплекса. Полученная информация представляет собой основные этапы одного из ключевых механизмов регуляции активности эндонуклеазы, схематически представленного на рис. 6, - механизма регуляции ферментативной активности продуктами гидролиза ДНК и РНК.

Влияние нуклеозидтрифосфатов на активность эндонуклеазы. Отсутствие специфичности эндонуклеазы к типу углеводного остатка инициировало вопрос о специфичности данного фермента к числу фосфатных групп в составе мононуклеотидов. Для ответа на этот вопрос исследовали влияние нуклеозидтрифосфатов на активность эндонуклеазы. Результаты представлены на рисунках 7-10, из которых видно, что дезоксирибонуклеозидтрифосфаты не влияли на активность эндонуклеазы по отношению к ДНК или РНК ни в эквимольном-, ни в удвоенном к концентрации нуклеиновых кислот количестве. CTP, GTP, UTP не влияли на активность эндонуклеазы по отношению к ДНК, и, напротив, вызывали уменьшение РНКазной активности почти в 1,5 раза. Такой же эффект оказывал ATP в эквимольном к концентрации субстрата количестве.

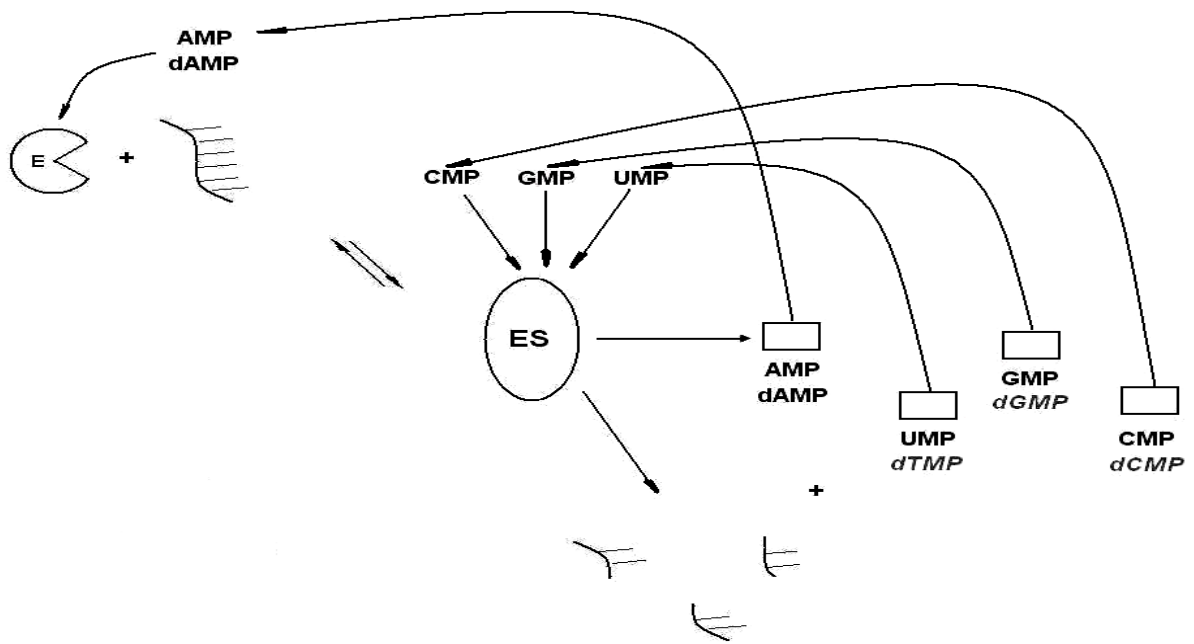


Рис. 6 Механизм регуляции активности эндонуклеазы нуклеозидмонофосфатами. Условные обозначения: E – фермент, ES – фермент-субстратный комплекс

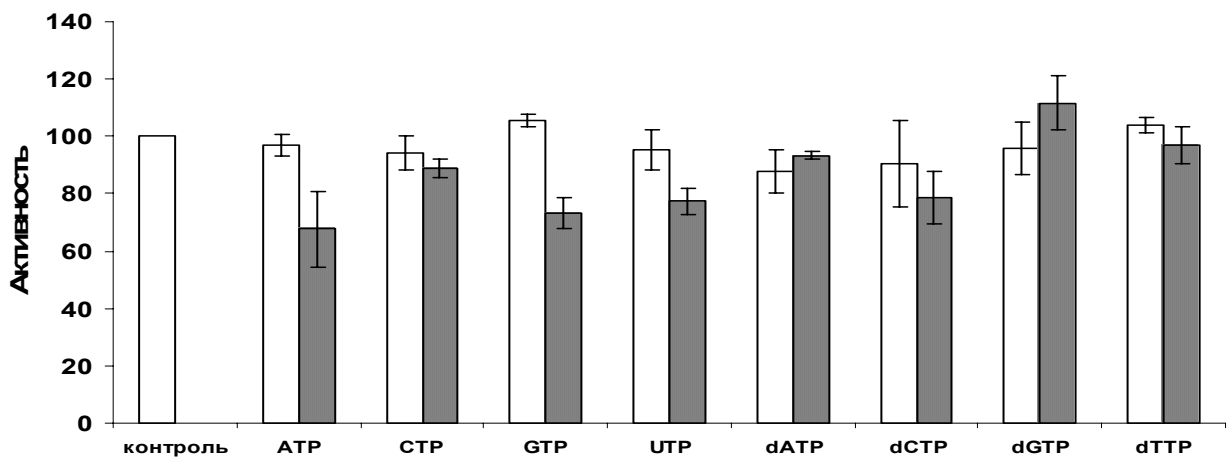


Рис. 7 Активность эндонуклеазы (%) в присутствии 0,3 мМ нуклеозидтрифосфатов по отношению к ДНК (□) и РНК (▤)

Увеличение концентрации АТФ в 2 раза, приводило к уменьшению ДНКазной активности почти в 1,5 раза и, напротив, к увеличению РНКазной активности более чем 2 раза.

Графическое изображение (рис.9) зависимости активности от концентрации ДНК в координатах Лайнуивера-Бэрка напоминало неконкурентный [Ленинджер

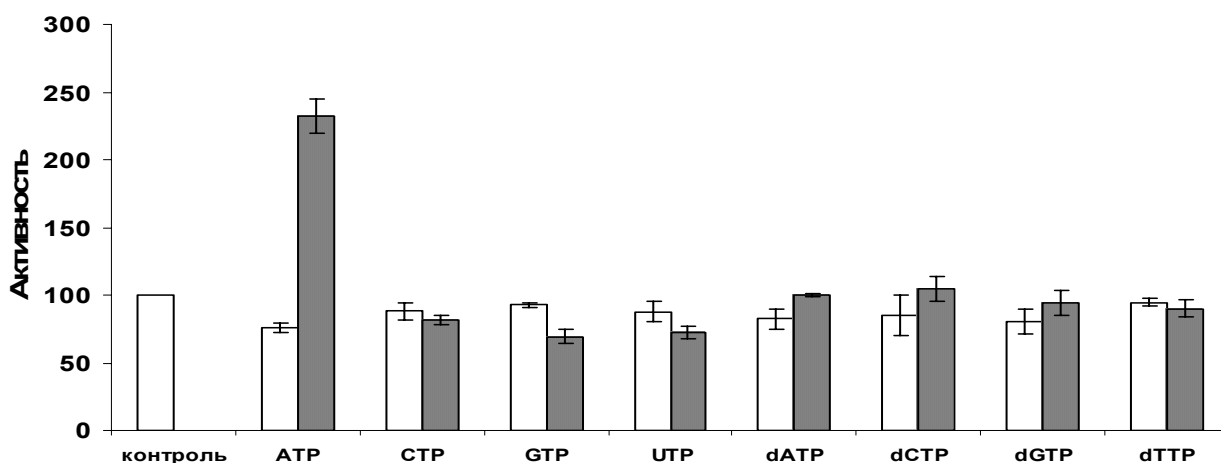


Рис. 8 Активность эндонуклеазы (%) в присутствии 0,6 мМ нуклеозидтрифосфатов по отношению к ДНК (□) и РНК (■)

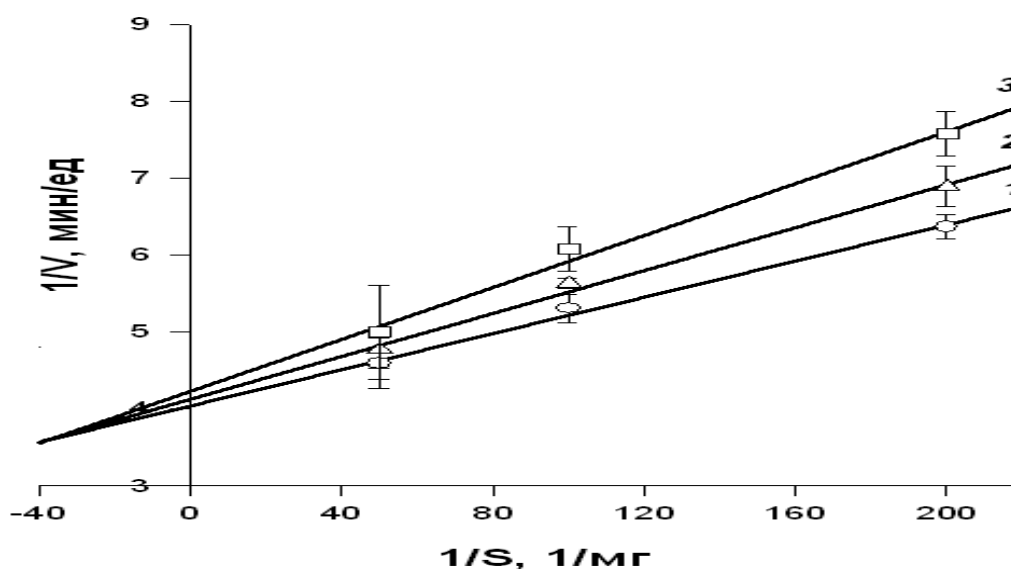


Рис. 9 Зависимость начальной скорости реакции от концентрации ДНК в присутствии (линии 2-3) и отсутствии (линия 1) АТР 1 – 0 мМ (контроль), 2 – 0,12 мМ, 3 – 0,18 мМ нуклеотида

А., 1985; Rudolph F. В., 1979] или смешанный тип ингибирования [Диксон М., и др., 1982; Корниш-Боуден Э., 1979] ДНКазной активности. Наклон кривых увеличивался с увеличением концентрации АТР. Кривые пересекались в точке, лежащей выше оси абсцисс, в области ее отрицательных значений. Анализ вторичных кривых, напоминающих гиперболу и представляющих собой графики

зависимости длины отрезка, отсекаемого от оси ординат, от концентрации АТР, позволил заключить, что смешанное (неконкурентное) ингибирование ДНКазной активности носит частичный характер [Диксон М. и др., 1982], и характеризуется константой ингибирования 0,438 мМ.

Аналогично, частичный характер носила активация эндонуклеазы АТР в отношении РНК. Как видно из рисунка 10, в присутствии АТР наклон кривых зависимости активности от концентрации РНК в координатах Лайнуивера-Берка уменьшался по сравнению с кривой в отсутствии АТР. Кривые пересекались в точках, лежащих выше оси абсцисс, в области ее положительных и отрицательных значений.

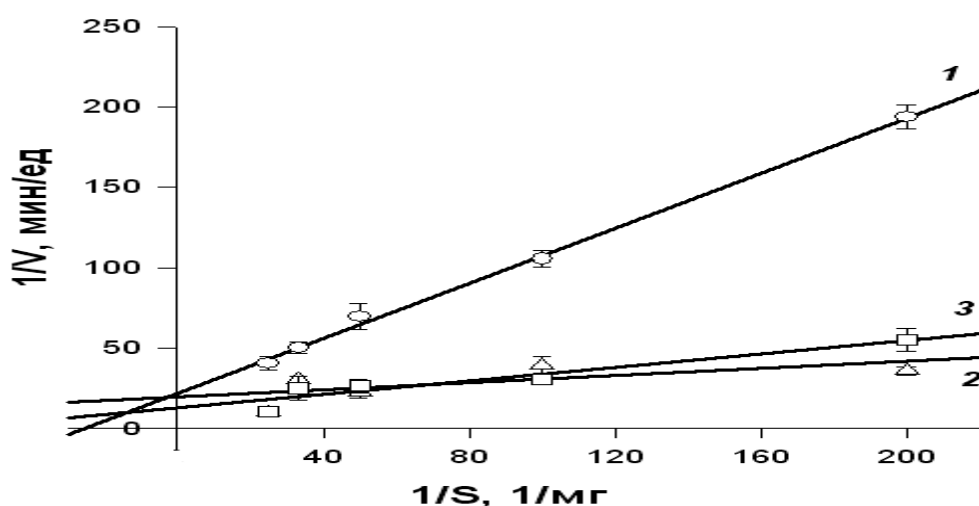


Рис. 10 Зависимость начальной скорости реакции от концентрации РНК в присутствии (линии 2-3) и отсутствии (линия 1) АТР 1 – 0 мМ (контроль), 2 – 0,58, 3 - 0,87 мМ нуклеотида

Вторичные графики зависимостей длины отрезка и наклона прямой от концентрации активатора были не линейны и свидетельствовали о случае гиперболической активации [Cleland W. W., 1979] с константой активации 0,235 мМ.

Таким образом, исследование изменения активности эндонуклеазы под действием нуклеозидтрифосфатов выявило специфичность эндонуклеазы к числу фосфатных групп в составе мононуклеотидов. В отличие от

дезоксирибонуклеозидмонофосфатов -трифосфаты не влияли на активность эндонуклеазы ни по отношению к ДНК, ни - к РНК. Напротив, АТР, в отличие от АМР/dАМР, активировал эндонуклеазу по отношению к РНК и ингибировал по отношению к ДНК по неконкуретному (смешанному) типу, при котором ингибитор обратимо взаимодействует как с ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом, изменяя сродство фермента к субстрату, а также скорость продуктивного распада фермент-субстратного комплекса, что представлено в виде схемы на рис.11.

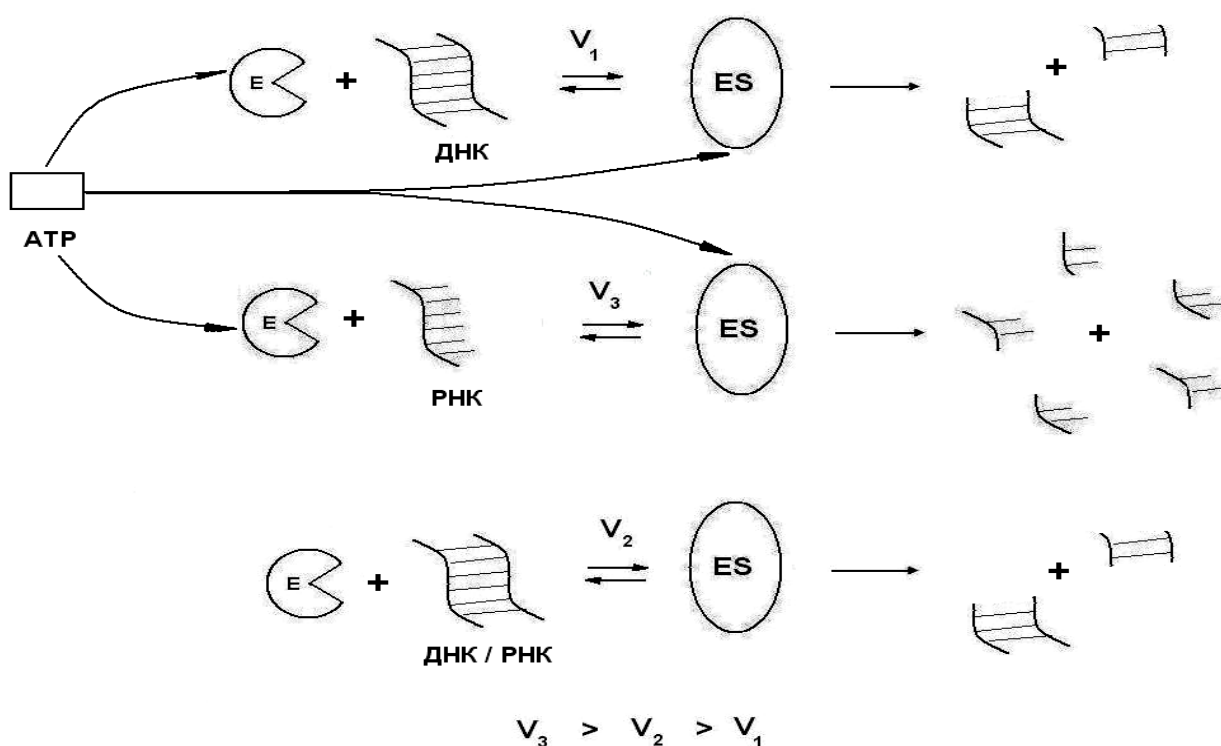


Рис. 11 Механизм регуляции активности эндонуклеазы АТР. Условные обозначения: E – фермент, ES – фермент-субстратный комплекс, V – максимальная скорость

Выводы

1. Наличие в инкубационной среде 10 – 40 –кратного избытка катионов магния по отношению к содержанию фосфатных групп субстрата является оптимальным для гидролиза эндонуклеазой как ДНК, так и РНК и приводит к многократному увеличению - до сопоставимых величин - молекулярной активности фермента.

2. Механизм регуляции активности эндонуклеазы катионами магния заключается в том, что Mg^{2+} , образуя комплексы с фосфатными группами субстрата, вызывает независимо от степени полимерности и спирализации субстрата такое изменение его вторичной структуры, которое приводит к многократному возрастанию скорости продуктивного распада фермент-субстратного комплекса.
3. В отсутствие Mg^{2+} эндонуклеаза проявляет специфичность к типу гидролизуемого субстрата, о чем свидетельствует различие каталитической константы гидролиза высокомолекулярной ДНК, суммарной и транспортной РНК, составляющей, соответственно, 6,7, 1,4 и 0,07 сек⁻¹ на 1 мМ эндонуклеазы.
4. Прочность связывания эндонуклеазы с субстратом не зависит от конформационных особенностей, степени полимерности и спирализации субстрата, а также присутствия в среде катионов магния, о чем свидетельствует идентичность значений константы Михаэлиса гидролиза высокомолекулярной ДНК, суммарной и транспортной РНК в присутствии и отсутствии Mg^{2+} .
5. Установлено, что нуклеозидмонофосфаты не влияют на активность по отношению к ДНК и подавляют активность эндонуклеазы - к РНК, ингибируя фермент по бесконкурентному типу в случае CMP, GMP UMP и частично конкурентному типу в случае AMP и d AMP.
6. Показано, что АТР выступает в роли положительного эффектора в присутствии РНК и отрицательного – в присутствии ДНК, ингибируя или активируя эндонуклеазу по частично смешанному типу.

Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Шабаева Ю. Д. Сравнительный анализ субстратов в отношении активности эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* / Шабаева Ю. Д., Филимонова М. Н. // Ученые записки КГУ. – 2005. – Т. 147, № 2. – С. 206–212.
2. Шабаева Ю. Д. Влияние мононуклеотидов на РНКазную и ДНКазную активности нуклеазы *Serratia marcescens* при оптимальной концентрации катионов магния / Шабаева Ю. Д., Игнатъева И. В., Филимонова М. Н. // Ученые записки КГУ. – 2006. – Т. 148, № 3. – С. 138–146.

3. Романова Ю. Д. О механизме регуляции активности эндонуклеазы *Serratia marcescens* катионами магния / **Романова Ю. Д.**, Губская В. П., Нуретдинов И. А., Сусарова А. А., Филимонова М. Н. // Ученые записки КГУ. – 2008. – Т. 150, № 2. – С. 176–185.
4. Шабаева Ю. Д. Антимикробный препарат / Филимонова М. Н., Ершова Е. В., Сафин Ю. И., Тойменцева А. А., **Шабаева Ю. Д.**, Сусарова А. Н., Валеев А. Р., Угрюмова В. С., Равилов А. З., Каримуллина И. Г., Фаткуллова А. А., Шишко А. А., Каримов М. З. // Патент РФ № 2337139.
5. Старшинова Н. В. Биосинтез Sma I-нуклеазы в присутствии норсульфазола и новые свойства фермента / Старшинова Н. В., **Шабаева Ю. Д.**, Игнатъева И. В., Сафин Ю. И., Тойменцева А. А., Филимонова М. Н. // 4-ая научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ: сб. тез. – Казань, 2004. – С. 77.
6. Шабаева Ю. Д. Исследование регуляции каталитической активности и биосинтеза бактериальной нуклеазы / **Шабаева Ю. Д.**, Игнатъева И. В., Старшинова Н. В., Сафин Ю. И., Тойменцева А. А., Филимонова М. Н. // Научная конференция “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии”: сб. тез. – Казань, 2004. – С. 105.
7. Валеев А. Р. Исследование регуляции активности нуклеазы *Serratia marcescens* и роста бактерий экзогенными факторами / Валеев А. Р., Ершова Е. В., Игнатъева И. В., Сафин Ю. И., Старшинова Н. В., Сусарова А. Н., Тойменцева А. А., **Шабаева Ю. Д.**, Филимонова М. Н. // 3-я международная научная конференция “Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение”: сб. тез.. – Казань, 2005. – С. 16-17.
8. Шах Махмуд Р. Биохимические свойства и биосинтез рекомбинантной эндонуклеазы *Serratia marcescens* / Шах Махмуд Р., **Шабаева Ю. Д.**, Сафин Ю. И., Касимова А. А. // XLV международная научной студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс»: сб. тез. – Новосибирск, 2007. – С. 137.
9. Романова Ю.Д. Молекулярные основы широкой специфичности эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* / **Романова Ю.Д.**, Филимонова М.Н. // 11-й Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука 21 века»: сб. тез. - Пущино, 2007. - С. 157.