

РГБ - ОА

18 янв 2000

БОГОМОЛЬНАЯ ЛИДИЯ МИХАЙЛОВНА

**Влияние условий культивирования и некоторых
экзогенных факторов на биосинтез и секрецию изоформ
эндонуклеазы *Serratia marcescens***

03.00.07 - микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

КАЗАНЬ – 2000

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного
университета им. В.И.Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук
М.Н. Филимонова

Официальные оппоненты: к.б.н. доц.каф.микробиологии КГМУ
Амерханова Н.Н.

д.б.н. с.н.с. Коксин В.П.

Ведущая организация: Казанский Институт биохимии и биофизики КНЦ РАН

Защита диссертации состоится 13 декабря 2000 г.
в 14.30 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 13 ноября 2000 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

секретарь

А.Н. Аскарова

Е 042.534.810.3, 0

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Внеклеточная эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens* (эндонуклеаза Sm) изучается на протяжении многих лет. Интерес к этому ферменту вызван уникальностью его свойств. В частности известно, что каталитическая активность эндонуклеазы Sm в 4 раза превышает таковую стафилококковой нуклеазы и в 34 раза – ДНКазы I. Ферментный препарат находит применение в молекулярной биологии для удаления ДНК из белковых препаратов (Manual "Benzonuclease", 1989). На примере эндонуклеазы Sm показана возможность использования в биотехнологии модифицированных "генов-убийц", кодирующих нуклеазы, разрушающие при определенных условиях геном клетки-хозяина и предотвращающих возможность переноса генов от клетки к клетке (Ahrenholtz I. et al., 1994). Известно, что отдельные нуклеазы, в их числе эндонуклеаза Sm, являются эффективными антивирусными агентами (Аликин и др., 1998).

В настоящее время известны основные биохимические свойства (Nestle M., Roberts W.K., 1969, Лещинская И.Б. и др., 1974), пространственная структура (Miller M.D., Krause K.L., 1996, Shlyapnikov S.V. et al., 2000), каталитически значимые аминокислоты (Friedhoff P. et al., 1994, Friedhoff P. et al., 1996), предложены механизмы действия (Kolmes B. et al., 1996, Шляпников С.В. и др., 1999) эндонуклеазы Sm, разработана эффективная схема её очистки (Филимонова М.Н. и др., 1980, Friedhoff P. et al., 1994). Показано, что эндонуклеаза секретируется в окружающую среду в виде двух основных изоформ, Sm2 и Sm1. Известно, что единственным различием структуры изоформ является строение N-концевой аминокислотной последовательности. Изоформы различаются по молекулярной массе, оптимуму pH действия, оптимальной концентрации активатора (Mg^{2+}), кинетическим параметрам гидролиза ДНК, предпочтением к природе азотистых оснований (Банникова Г.Е. и др., 1990, Филимонова М.Н. и др., 1991, 1996, 1997, Filimonova M.N. et al., 1994, Педерсен Ю. И др., 1995 а-г).

Выдвигаются предположения, что синтез и секреция изоформ регулируется факторами внешней среды и физиологическим состоянием клеток (Suh Y. et al., 1995). В связи с вышеизложенным представляло значительный интерес изучить влияние разнообразных экзогенных факторов на образование и экспорт из клетки изоформ эндонуклеазы *Serratia marcescens*.

Цели и задачи исследования. Данная работа проведена с целью установления влияния на биосинтез и секрецию изоформ эндонуклеазы *Serratia marcescens* различных экзогенных эффикторов, включая компоненты питательной среды, условия культивирования, ингибиторы дыхания и репликации ДНК.

В соответствии с поставленной целью решались следующие экспериментальные задачи:

1. Отбор штаммов бактерий и питательной среды, обеспечивающей секрецию эндонуклеазы в два этапа;
2. Подбор маркеров целостности цитоплазматической и наружной мембраны клеток;
3. Исследование влияния на синтез и секрецию изоформ эндонуклеазы *Serratia marcescens* природы источников азотного и углеродного питания, субстратов и продуктов их гидролиза (ДНК, РНК, мононуклеотидов), уровня аэрации в процессе культивирования бактерий;
4. Изучение влияния на синтез и секрецию изоформ фермента веществ, вызывающих ингибирование дыхания клеток (азид натрия) и репликации ДНК (налидиксовая кислота);

Научная новизна работы. Показано, что биосинтез и секреция изоформ эндонуклеазы *Serratia marcescens* зависит от состава питательной среды и условий культивирования. Установлено, что ответом клетки на изменение факторов внешней среды, а именно, добавление в среду нуклеиновых кислот, мононуклеотидов, использование альтернативных источников азотного и углеродного питания, добавление веществ, вызывающих ингибирование дыхания клеток (азид натрия) и репликации ДНК (налидиксовая кислота), является увеличение уровня синтеза молекулярной формы Sm1. Только при снижении аэрации было отмечено увеличение биосинтеза обеих изоформ.

Практическая ценность работы. Показано, что изменение условий культивирования может привести к направленному синтезу отдельных молекулярных форм эндонуклеазы. Кроме того установлено, что при культивировании бактерий на средах с нуклеиновыми кислотами, а также при добавлении веществ, вызывающих ингибирование дыхания клеток (азид натрия) и репликации ДНК (налидиксовая кислота) практически весь синтезированный фермент - эндонуклеаза выделяется в окружающую среду. Этот прием можно

использовать для повышения выхода фермента при его последующем выделении из культуральной жидкости.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены на Форуме по прикладной биотехнологии (Брюгге, Бельгия, 1998), IX Европейском конгрессе по биотехнологии (Брюссель, Бельгия, 1999), VIII Конференции по промышленному использованию ферментов (Барселона, Испания, 1999), V Международной конференции по рибонуклеазам (Варрентон, США, 1999), XXXVIII Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2000), Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов» (Москва, 2000), XVIII Международном Конгрессе по биохимии и молекулярной биологии (Бирмингем, Великобритания, 2000), I Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2000).

Публикации. Опубликовано 10 работ по материалам диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста; состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка литературы и приложения. Работа содержит 20 таблиц, 25 рисунков. Список литературы включает 177 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали штамм *Serratia marcescens* W1050.

Для культивирования клеток *Serratia marcescens* использовали среды: минимальную, обогащенную гидролизатом казеина и дрожжевым автолизатом и LB. Минимальная среда содержала (%): 0,47 - NaCl, 0,11 - NH₄Cl, 0,04 - Na₂SO₄, 0,0095 - MgCl₂, 0,0011 - CaCl₂, 0,28 - K₂HPO₄ · 3H₂O, 0,5% глюкозы, pH 7,5. Обогащенная среда (среда А), содержала дополнительно к минимальному составу 0,1% гидролизата казеина и 0,3% дрожжевого автолизата. Среда LB (%) содержала 1 - триптона, 0,5 - дрожжевого экстракта, 1 - NaCl.

С целью изучения влияния азотного и углеродного питания на биосинтез и секрецию изоформ нуклеазы проводили культивирование на средах, содержащих

альтернативные источники углерода – пируват, цитрат, лактат натрия в количестве, эквиволярном по отношению к углероду в составе глюкозы; на средах, содержащих альтернативные источники азота - $(\text{NH}_4)_2\text{H}(\text{PO}_4)_2$, KNO_3 , мочевины в эквиволярном по отношению к азоту в составе NH_4Cl количестве; на среде, содержащей в качестве единственного источника азота и углерода 0,1% гидролизат казеина. Для того, чтобы изучить влияние субстратов и конечных продуктов гидролиза на биосинтез и секрецию изоформ нуклеазы проводили культивирование на средах, содержащих 0,5% ДНК или РНК, 0,1% УМФ или ГМФ. Для изучения влияния веществ, ингибирующих репликацию ДНК и дыхание клеток, проводили культивирование на средах в присутствии налидиксовой кислоты и азида натрия соответственно.

Растворы налидиксовой кислоты и азида натрия готовили отдельно и вносили в среду до конечной концентрации 2 мкг/мл и 5 мМ соответственно вместе с посевным материалом.

Проводили культивирование при 30 °С в течение 36-92 часов. Для изучения влияния аэрации на биосинтез и секрецию изоформ нуклеазы проводили культивирование на среде А без принудительного перемешивания, рН среды поддерживали на уровне начального (рН=7,5) при помощи стерильного раствора NaOH. В качестве контрольной использовали культуру, выращенную на среде А, при перемешивании (200 об/мин.).

Прирост биомассы измеряли по оптической плотности на КФК-2 при длине волны 590 нм. Вес сухой биомассы определяли высушиванием клеточной суспензии до постоянного веса. Продуктивность (удельную активность) в отношении синтеза фермента рассчитывали как отношение активности фермента к величине сухой биомассы. Уровень биосинтеза нуклеазы рассчитывали как сумму продуктивности в культуральной жидкости и периплазме.

Фракции белков периплазмы и цитоплазмы получали, как описано (Шнайтман, 1983, Телеснина Г.Н. и др, 1992).

Нуклеазную активность определяли по количеству кислоторастворимых продуктов (Nestle M. and Roberts W.K., 1969, Лещинская И.Б. и др., 1974) и плащечным методом с использованием этидиум бромид (Т.К. Ball et al., 1990). Наличие сукцинатдегидрогеназы в клеточных фракциях определяли, как описано (Филлипович Ю. и др., 1975). Активность β-галактозидазы определяли в соответствии со стандартным методом (Миллер, 1976). Активность аспаратаминотрансферазы определяли, как описано (Нгуен и др., 1978). Активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (ГФДГ) определяли, как описано

(Кочетов Г.А., 1980). Активность β -лактамазы определяли, как описано (Чайковская С.М., Венкина Т.Г., 1962). Активность щелочной фосфатазы (ФМЭ) определяли, как описано (Лещинская И.Б. и др., 1980).

Для выявления молекулярных форм нуклеазы Sm1 и Sm2 проводили электрофорез клеточных фракций *S.marcescens* в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в отсутствии денатурирующих агентов (Маурер, 1971). В качестве маркерных белков использовали гомогенные нативные препараты Sm1 и Sm2, которые были любезно предоставлены д.б.н. Филимоновой М.Н. Продолжительность электрофореза 8 часов при силе тока 50 мА. Впитывание образцов проводили в течение 20 минут – 1 часа при силе тока 24 мА. Определение локализации нуклеазы проводили с помощью метода энзимограмм, как описано (Гааль Э. и др., 1982, Филимонова и др., 1991). Полученные энзимограммы сканировали при помощи сканера "Scanexpress 6000 SP", изображения переводили в черно-белую гамму и представляли в виде негатива в программе "PhotoPlus 1.2". Для определения соотношения изоформ при электрофорезе пятна, соответствующие локализации нуклеазы вырезали и взвешивали на электронных весах "ER-180A".

Статистический анализ проводили с использованием стандартных математических методов в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Отбор штамма *Serratia marcescens*, условий синтеза эндонуклеазы в два этапа, биохимических маркеров цитоплазмы и периплазмы

Из трех штаммов *Serratia marcescens* (B10M1, 24 и W1050) и трех питательных сред (минимальная, А и LB) для дальнейшей работы были выбраны *S.marcescens* штамм W1050 и среда А, представляющая собой минимальную среду, обогащенную гидролизатом казеина (0,1%) и дрожжевым автолизатом (0,3%), по признаку максимального синтеза эндонуклеазы и ее секреции в два этапа – на рисунке это выражается в виде двух последовательно расположенных пиков – первый пик – в конце логарифмической фазы роста, а второй - в фазе стационарного роста (рис.1).

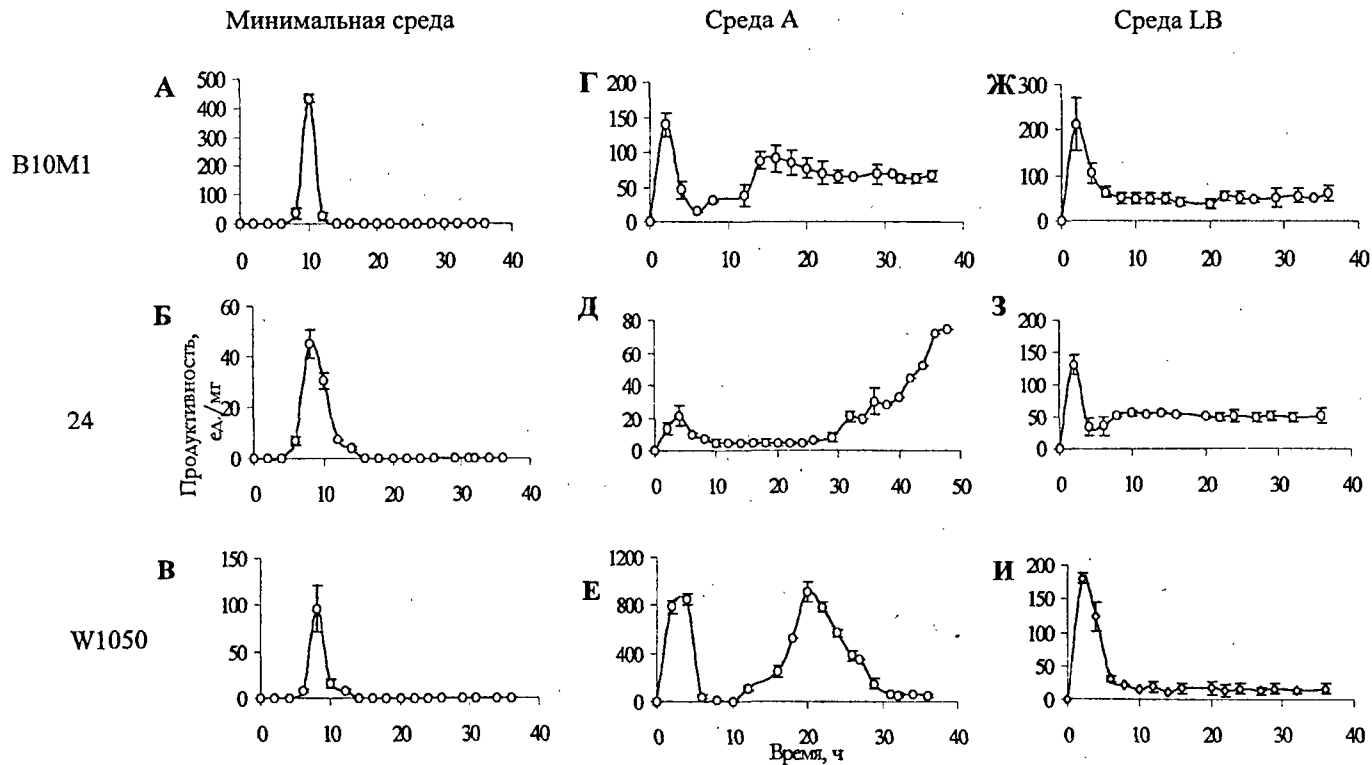


Рис.1. Динамика продуктивности культуры в отношении синтеза нуклеазы при культивировании на средах А (Г-Е), LB (Ж-И) и минимальной (А-В) *Serratia marcescens* штаммов В10М1 (А, Г, Ж), 24 (Б, Д, З) и W1050 (В, Е, И)

В цитоплазме, периплазме и культуральной жидкости определяли содержание аспаратаминотрансферазы, β -галактозидазы и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (ГФДГ), β -лактамазы и щелочной фосфатазы (ФМЭ) (табл.1). В результате этих исследований были выбраны биохимические маркеры целостности цитоплазматической мембраны (глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа) и наружной мембраны (щелочная фосфатаза). Считали, что появление нуклеазной активности в периплазме и среде является результатом секреции через цитоплазматическую и наружную мембраны, если содержание ГФДГ в периплазме и ФМЭ в культуральной жидкости не превышало значений, определенных для минимальной среды и среды А.

Таблица 1

Активность ферментов – потенциальных биохимических маркеров целостности цитоплазматической мембраны и наружной мембраны клеток *Serratia marcescens*

| Фермент | | Цитоплазма, ед. | Периплазма, ед. | Культуральная жидкость, ед. |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Аспаратаминотрансфераза | | 0,5±0,06 | 0,75±0,05 | - |
| β -галактозидаза | | 210,3±4,4 | 147,5±5,8 | - |
| Глюкозо-6-фосфат- дегидрогеназа | | $10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$ | $10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-5}$ | - |
| β -лактамаза | В отсутствии ампициллина | - | 6,0±0,5 | - |
| | В присутствии ампициллина | 49,4±8,5 | 190,1±4,3 | 149,7±2,9 |
| Щелочная фосфатаза | | - | 10,6±0,3 | - |

Согласно данным литературы, появление изоформ эндонуклеазы Sm1 и Sm2 в периплазме и культуральной жидкости разделено во времени – сначала появляется изоформа Sm2 и лишь на более поздних стадиях роста – изоформа Sm1, при этом лишь изоформа Sm2 выделяется из клетки путем секреции, а изоформа Sm1 попадает в культуральную жидкость только в результате лизиса клеток (Suh Y. et al., 1995). Исследование динамики накопления эндонуклеазы в

периплазме и культуральной жидкости показали (рис.2), что при культивировании бактерий на минимальной среде появление изоформы Sm1 является результатом изменения проницаемости мембраны, а при культивировании на среде А – следствием секреции. Таким образом, наши данные отличаются от имеющихся в литературе.

Кроме того, добавление гидролизата казеина и дрожжевого автолизата в среду приводило к увеличению уровня синтеза изоформы Sm1 приблизительно в 10 раз, а изоформы Sm2 – в 4 раза.

Таким образом, полученные результаты указывают на зависимость уровня биосинтеза и секреции изоформ эндонуклеазы от состава среды.

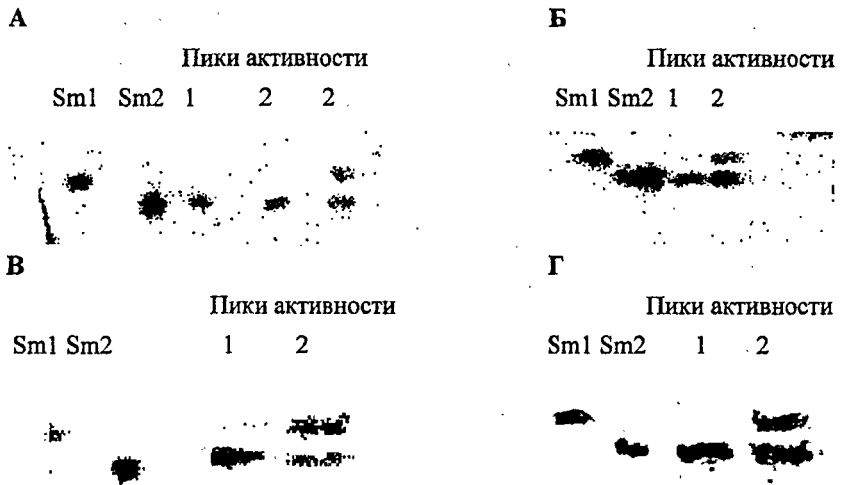


Рис.2. Энзимограмма фракций нуклеазы в периплазме (А, В) и культуральной жидкости (Б, Г) при культивировании клеток на минимальной среде (А, Б) среде А (В, Г)

Время блоттинга: А – 60 минут, Б - 20 минут, В - 30 минут, Г – 6 минут.

2. Влияние субстратов и продуктов гидролиза на биосинтез и секрецию изоформ эндонуклеазы

Было изучено влияние ДНК и РНК на биосинтез и секрецию изоформ фермента. Результаты электрофореза фракций показали (рис.3), что добавление нуклеиновых кислот в среду приводило к появлению в периплазме во фракции

первого пика обеих изоформ, в отличие от контроля, где в первом пике обнаруживалась только изоформа Sm2. Стоит также отметить, что преобладание той или иной молекулярной формы во фракциях пиков в культуральной жидкости зависело от типа нуклеиновой кислоты. Так, на среде с ДНК в культуральной жидкости преобладала изоформа Sm2, а на среде с РНК – изоформа Sm1. Было установлено, что добавление нуклеиновых кислот в состав питательной среды приводило к увеличению уровня биосинтеза изоформы Sm1 в 2-3 раза. Однако, сделать заключение о субстратной индукции в данном случае не представляется возможным.

Поскольку преобладающим мононуклеотидом в продуктах гидролиза РНК для изоформы Sm2 является гуанозин-, а Sm1 – уридинмонофосфат, указанные нуклеотиды были выбраны для испытания в качестве потенциальных репрессоров биосинтеза и секреции изоформ эндонуклеазы *S. marcescens*.



Рис.3. Энзимограмма фракций нуклеазы в периплазме (А, В) и культуральной жидкости (Б, Г) при культивировании клеток на среде с ДНК (А, Б) и РНК (В, Г)

Время блоттинга: А, В – 30 минут, Б, Г – 6 минут.

Появление нуклеазы в периплазме и культуральной жидкости при культивировании бактерий на среде с мононуклеотидами было обнаружено на фоне изменения проницаемости цитоплазматической и наружной мембран. Электрофоретический анализ (рис.4) показал, что картина распределения изоформ во фракциях пиков нуклеазной активности в периплазме и

культуральной жидкости зависела от природы мононуклеотидов. В культуральной жидкости во фракции первого пика на среде с ГМФ содержалась изоформа Sm2, а на среде с УМФ – только изоформа Sm1. Мононуклеотиды, добавленные в среду в качестве дополнительного источника питания, не вызывали репрессии синтеза эндонуклеазы, однако изменяли биосинтез отдельных молекулярных форм. Так, биосинтез изоформы Sm1 увеличивался в среднем на 80% при снижении биосинтеза изоформы Sm2 на 20-30%.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что биосинтез изоформ эндонуклеазы не подвергается значительной стимуляции субстратом и не ингибируется продуктами гидролиза субстратов. В обоих случаях ответом клетки было увеличение уровня биосинтеза изоформы Sm1.

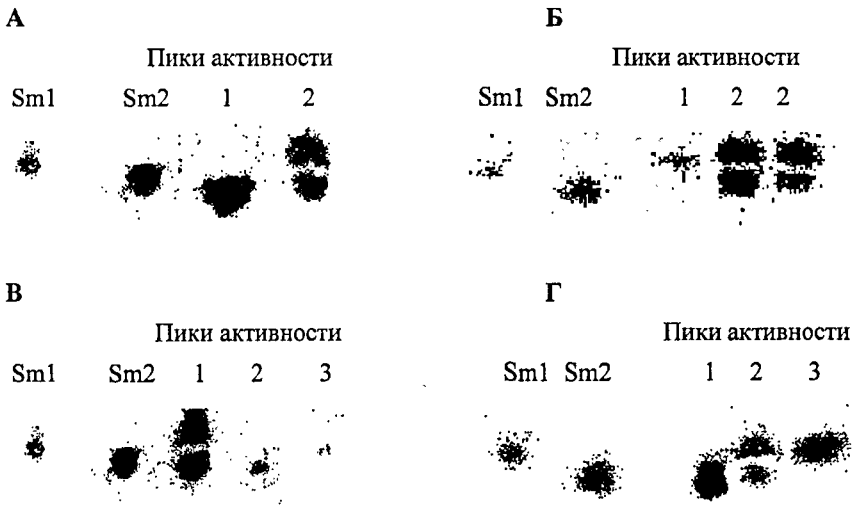


Рис.4. Энзимограмма фракций нуклеазы в периплазме (А, В) и культуральной жидкости (Б, Г) при культивировании клеток на среде с УМФ (А, Б) и ГМФ (В, Г)
 Время блоттинга: А, В – 30 минут, Б, Г – 10 минут.

3. Влияние источников азотного и углеродного питания на биосинтез и секрецию изоформ эндонуклеазы

Представляло интерес провести исследование влияния альтернативных источников азотного питания на биосинтез и секрецию изоформ эндонуклеазы. Показано (табл.2), что замена NH_4Cl на мочевины и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ увеличивала уровень биосинтеза изоформы Sm1 в 1,4-1,8 раза. Нитрат (KNO_3) стимулировал уровень синтеза обеих изоформ в 8-9 раз. Ответом клетки на добавление нитратов стало появление изоформы Sm1 в первом пике нуклеазной активности в культуральной жидкости (рис.5).

Таблица 2

Биосинтез изоформ эндонуклеазы *Serratia marcescens* при культивировании на средах с разными источниками азота и углерода

| Источник | | Биосинтез, % | |
|-------------------------------|----------------|-----------------|--------------|
| азота | углерода | Sm1 | Sm2 |
| NH_4Cl | Глюкоза | 100,00±15,54 | 100,00±3,64 |
| Мочевина | Глюкоза | 143,99±4,73 | 64,32±1,11 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | Глюкоза | 180,08±16,05 | 107,19±3,76 |
| KNO_3 | Глюкоза | 968,00±42,90 | 801,61±10,06 |
| Гидролизат казеина | | 439,91±31,75 | 275,72±7,45 |
| NH_4Cl | Цитрат натрия | 885,47±18,02 | 374,46±3,53 |
| NH_4Cl | Пируват натрия | 1355,54 ±120,81 | 806,91±28,34 |
| NH_4Cl | Лактат натрия | 3409,86±91,26 | 552,31±21,41 |

При подборе питательной среды было установлено, что обогащение среды минимального состава гидролизатом казеина и дрожжевым автолизатом приводило к двухэтапному накоплению эндонуклеазы в среде. Использование гидролизата казеина в качестве единственного источника азотного и углеродного питания приводило к увеличению уровня биосинтеза обеих молекулярных форм (табл.2). Электрофоретический анализ фракций показал, что единственным отличием от контроля было приблизительно равное соотношение изоформ во фракциях второго пика нуклеазной активности в периплазме и культуральной жидкости (рис.6).

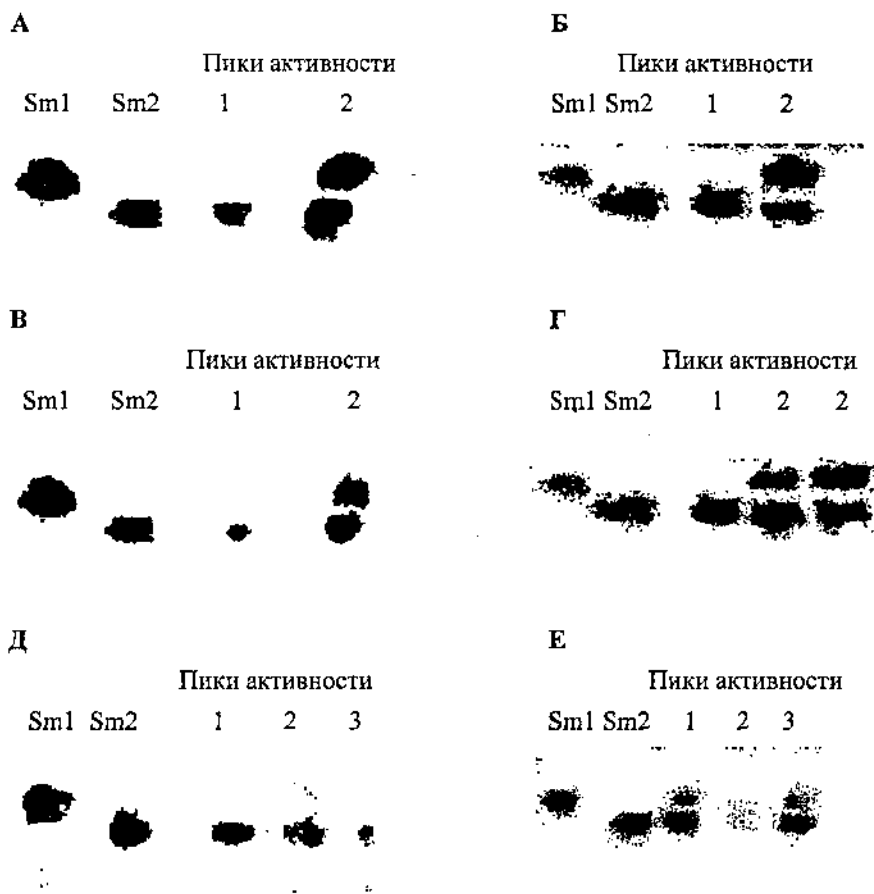


Рис.5. Энзимограмма фракций нуклеазы в периплазме (А, В, Д) и культуральной жидкости (Б, Г, Е) при культивировании клеток на среде с мочевиной (А, Б), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (В, Г) и KNO_3 (Д, Е)

Время блоттинга: А, В – 60 минут, Д – 40 минут, Б, Г – 20 минут, Е – 15 минут.

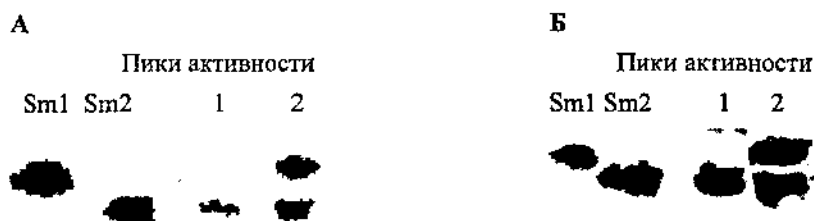


Рис.6. Энзимограмма фракций нуклеазы в периплазме (А) и культуральной жидкости (Б) при культивировании клеток на среде с гидролизатом казеина
 Время блоттинга: А – 60 минут, Б – 20 минут.

Замена глюкозы в минимальной среде на цитрат, пируват и лактат натрия приводила к увеличению уровня биосинтеза эндонуклеазы, как отмечали и другие исследователи (Юсупова Д.В. и др., 1983), а также её молекулярных форм (табл.2). Максимальное увеличение уровня биосинтеза изоформы Sm1 (в 34 раза) обнаружено на среде с лактатом натрия, а изоформы Sm2 (в 8 раз) на среде с пируватом натрия. Распределение изоформ в пиках активности эндонуклеазы в периплазме и культуральной жидкости зависело от источника углеродного питания (рис.7). На минимальной среде бактерии синтезировали изоформы Sm1 и Sm2 в соотношении 1 : 4. Замена глюкозы на пируват, цитрат и лактат натрия изменяла это соотношение в сторону увеличения изоформы Sm1 (максимальное соотношение 3 : 2), то есть, меняя источник углерода, можно моделировать условия для направленного получения той или иной молекулярной формы нуклеазы.

Таким образом, проведенные исследования позволяют отметить, что природа источника азотного и углеродного питания оказывает влияние на биосинтез и секрецию изоформ эндонуклеазы. Максимальное увеличение биосинтеза обеих изоформ обнаружено при замене NH_4Cl на KNO_3 , а также при замене глюкозы на лактат натрия.

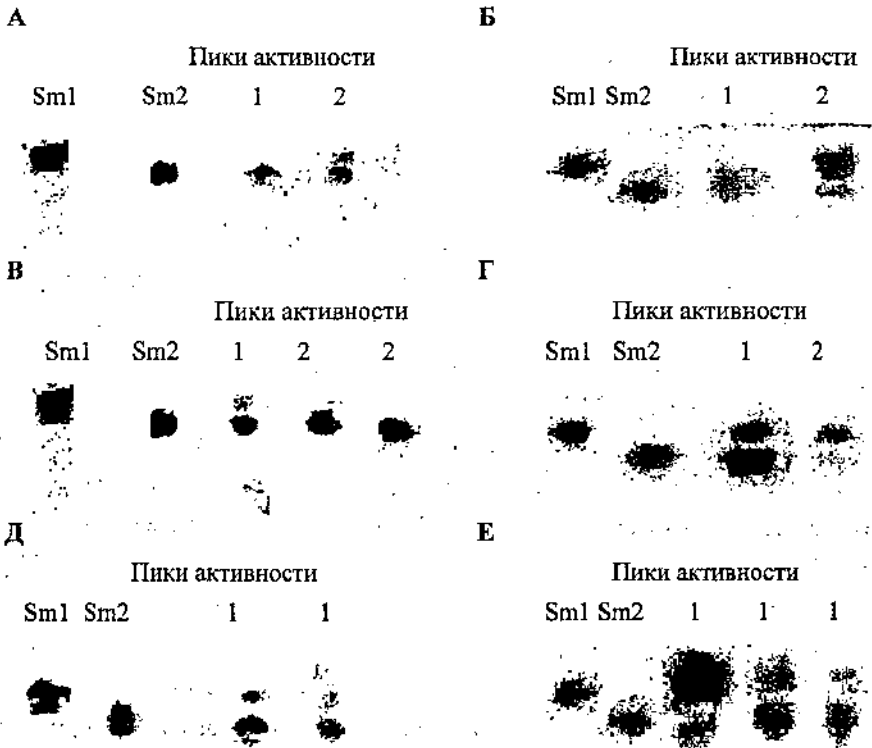


Рис.7. Энзимограмма фракций нуклеазы в периплазме (А, В, Д) и культуральной жидкости (Б, Г, Е) при культивировании клеток на среде с пируватом (А, Б), цитратом (В, Г) и лактатом натрия (Д, Е)

Время блоттинга: А, В, Г – 30 минут, Б, Г, Д – 15 минут.

4. Влияние веществ, вызывающих ингибирование дыхания (азид натрия) и репликации ДНК (налидиксовая кислота), а также уровня азрации на биосинтез и секрецию изоформ эндонуклеазы

Важным фактором, влияющим на биосинтез ферментов у бактерий, является азрация. Показано, что в результате культивирования бактерий в условиях пониженной азрации увеличивался биосинтез обеих изоформ в 2,6-3 раза. Электрофоретический анализ фракций показал, что распределение изоформ во фракциях первого и второго пиков нуклеазной активности в периплазме и

культуральной жидкости не отличалось от контроля (среда А), во фракции третьего пика, отсутствующего в контроле, преобладала изоформа Sm1 (рис.8).

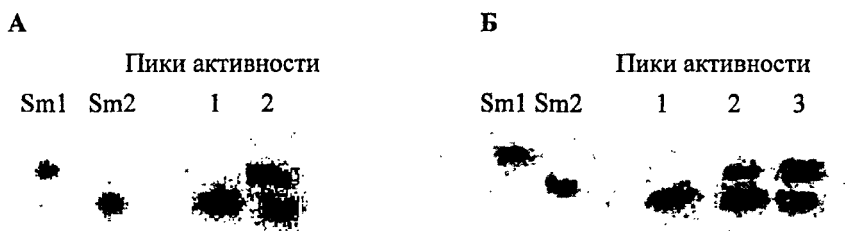


Рис.8. Энзимограмма фракций нуклеазы в периплазме (А) и культуральной жидкости (Б) при культивировании бактерий в условиях пониженной аэрации
Время блоттинга: А – 30 минут, Б – 6 минут.

Азид натрия, являющийся одновременно ингибитором дыхания и окислительного фосфорилирования, при добавлении вместе с посевным материалом вызывал увеличение уровня биосинтеза нуклеазы примерно в 2,3 раза. Уровень синтеза отдельных молекулярных форм увеличивался в разной степени - изоформы Sm1 приблизительно в 3,3 раза, а изоформы Sm2 - в 1,7 раза. Добавление NaN_3 приводило к изменению проницаемости цитоплазматической и наружной мембран, появление нуклеазной активности в периплазме и культуральной жидкости, таким образом, нельзя объяснить только процессом секреции. Известно, что азид натрия ингибирует синтез ДНК в клетках прокариот (Ciesla Z. et al. 1974), однако не вызывает SOS-ответ клетки (Szwacka M. et al., 1979). Тем не менее, азид натрия при добавлении в питательную среду вместе с посевным материалом, стимулировал биосинтез эндонуклеазы и её отдельных молекулярных форм.

При добавлении классического индуктора SOS-ответа - налидиксовой кислоты вместе с посевным материалом, наблюдалось увеличение биосинтеза нуклеазы в 5 раз. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными в группе Юсуповой Д.В. с соавторами (1991, 1993). При добавлении налидиксовой кислоты увеличивался уровень синтеза обеих молекулярных форм эндонуклеазы (в 4-6 раз), однако биосинтез изоформы Sm1 изменялся в большей

степени. Показано что при добавлении налидиксовой кислоты происходило изменение проницаемости цитоплазматической и наружной мембран клетки. Поэтому нуклеазная активность, обнаруженная в периплазме и в культуральной жидкости, являлась не только результатом активной секреции.

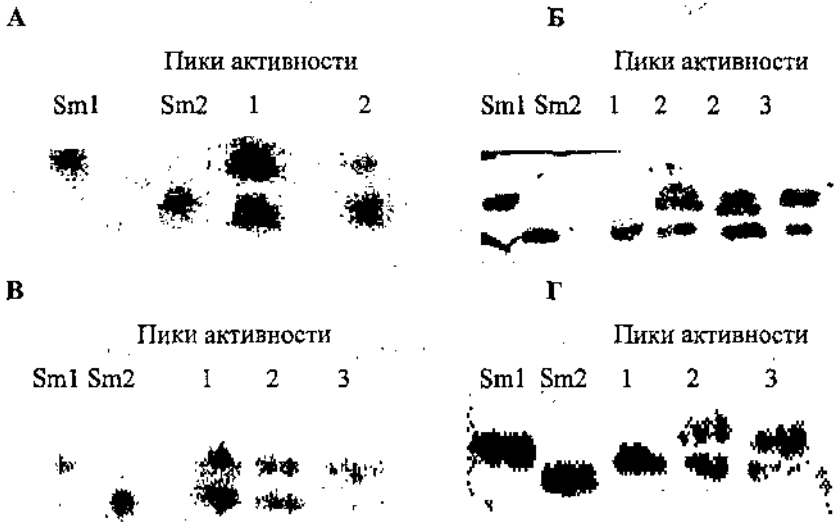


Рис.9 Энзимограмма фракций нуклеазы в периплазме (А, В) и культуральной жидкости (Б, Г) при культивировании бактерий в присутствии азид натрия (А, Б) и налидиксовой кислоты (В, Г)

Время блоттинга: А, В – 30 минут, Б, Г – 6 минут.

Анализ электрофореза фракций (рис.9) показал, что ответом клетки на добавление ингибитора дыхания (азид натрия) или репликации ДНК (налидиксовая кислота) является появление изоформы Sm1 во фракции первого пика нуклеазной активности в периплазме.

Таким образом, ингибитор дыхания клеток (азид натрия) и ингибитор репликации ДНК (налидиксовая кислота), а также пониженная аэрация вызывают увеличение уровня биосинтеза обеих молекулярных форм эндонуклеазы.

ВЫВОДЫ

1. Подобран штамм *Serratia marcescens* - W1050 и состав питательной среды, обогащенной гидролизатом казеина (0,1%) и дрожжевым автолизатом (0,3%), при культивировании на которой накопление фермента происходит в два этапа.

2. Подобраны биохимические агенты: глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа - как маркер целостности цитоплазматической мембраны, щелочная фосфатаза - как маркер целостности наружной мембраны.

3. Показано, что биосинтез изоформ эндонуклеазы не подвергается значительной стимуляции субстратом и не ингибируется продуктами гидролиза субстратов. В обоих случаях обнаружено увеличение биосинтеза изоформы Sm1 в 1,6-3,0 раза.

4. Установлено, что природа источников азотного и углеродного питания оказывает влияние на биосинтез и секрецию изоформ эндонуклеазы: максимальное увеличение биосинтеза обеих изоформ обнаружено при замене NH_4Cl на KNO_3 , а также при замене глюкозы на лактат натрия.

5. Показано, что ингибитор дыхания клеток (азид натрия) и ингибитор репликации ДНК (налидиксовая кислота), а также пониженная аэрация вызывают увеличение уровня биосинтеза эндонуклеазы и её молекулярных форм.

6. Установлено, что ответом клетки на неблагоприятные условия внешней среды является увеличение уровня синтеза молекулярной формы Sm1.

Публикации по теме диссертации

1. Филимонова М.Н., Гарусов А.В., Сметанина Т.А., Андреева М.А., Богомольная Л.М., Лещинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Сравнительный анализ субстратной специфичности// Биохимия - 1996. - т.61. - вып.10. - с.1800-1806.

2. Филимонова М.Н., Губская В.П., Нуретдинов И.А., Бенедик М.Дж., Богомольная Л.М., Андреева М.А., Лещинская И.Б. Изоформы нуклеазы *Serratia marcescens*. Роль ионов Mg^{+2} в механизме гидролиза// Биохимия - 1997. - т.62. - вып.9 - с.1148-1154.

3. Bogomolnaya L.M., Filimonova M.N. The path for directed preparation of two different isoform of *Serratia marcescens* nuclease/ FAB proceeding , FAB-98, September, 24-25, Belgium , 1998, Part I, pp.. 1333 – 1337.

4. Bogomolnaya L.M., Filimonova M.N. The path for preparation of isoforms Sm2 of *Serratia marcescens* nuclease/ ECB 9 Book of abstracts, 9th European Congress on Biotechnology, July 11-15, Brussels, Belgium, 1999.

5. Bogomolnaya L., Filimonova M. The path for directed preparation of two different isoform of *Serratia marcescens* nuclease/ VIII Meeting on Industrial Applications of Enzymes, November 30 – December 1, Barcelone, Spain, 1999

6. Bogomolnaya L., Filimonova M. Endonuclease of *Serratia marcescens*. Biosynthesis and properties of the isoforms/ Book of abstract, 5th International Meeting on ribonucleases, May 12-16, Airlie Center Warrenton, Virginia, USA, 1999, p.92

7. Богомольная Л.М. Изоформы эндонуклеазы *Serratia marcescens*./ Материалы XXXVIII международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”, Новосибирск, 11-13 апреля 2000 г., 2000, ч.1 (Биология), С.69-70.

8. Богомольная Л.М., Филимонова М.Н. Эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens*. Влияние факторов среды на биосинтез и секрецию изоформ фермента/ Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам “Ломоносов”, 12-15 апреля 2000 г., г.Москва, вып.4., Изд-во МГУ, 2000, С.14-15

9. Bogomolnaya L.M., Filimonova M.N. Bioenergetic processes as a factor regulating secretion of isoforms of *Serratia marcescens* nuclease/ Book of abstract,

18-th International Congress of biochemistry and molecular biology "Beyond the genome", 16-20 July, Birmingham, UK, 2000, p.624

10. Богомольная Л.М., Филимонова М.Н. Влияние факторов окружающей среды на биосинтез изоформ нуклеазы бактерий *Serratia marcescens*/ Тезисы докладов I Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века", 20-21 октября, г.Казань, 2000, С.25-26

