

На правах рукописи

**Самсонова Наталья Николаевна**

**Клонирование и функциональная характеристика гена *ugjG* из  
*Escherichiacoli K12*.**

03.00.03 - Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2004 г.

Работа выполнена в лаборатории №2 Научно-исследовательского института Аджиномото-Генетика (ЗАО "АГРИ").

**Научный руководитель:** кандидат химических наук

**Л. Р. Птницын**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук

**А. С. Миронов**

кандидат биологических наук

**Л. В. Генинг**

**Ведущая организация:** Центр биоинженерии РАН

Защита состоится " 1 " июня 2004 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании Диссертационного совета Д217.013.01 при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: 117548, г.Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»

Автореферат разослан " 24 " апреля 2004 г

Ученый секретарь

Диссертационного Совета

кандидат биологических наук



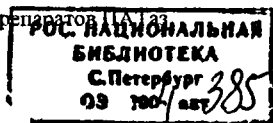
В.И.Щербакова

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Полиамины присутствуют практически во всех видах биологических организмов, от бактерий и вирусов до человека, и участвуют в огромном количестве разнообразных биологических и биохимических реакций, включая синтез ДНК, РНК и белков [Abraham, 1968; Frydman et al., 1992]. Исследование клеток прокариот и эукариот показало, что в различных организмах не только функционируют одинаковые соединения полиаминов (чаще всего это путресцин, спермидин, спермин и, существенно реже, кадаверин), но также универсальны и многие этапы биосинтеза этих поликатионов [Tabor et al., 1985; Pegg, 1986]. Хотя не вызывает сомнений тот факт, что полиамины выполняют важные физиологические функции и совершенно необходимы для обеспечения нормального клеточного роста, было показано, что избыточное накопление полиаминов в клетке ингибирует синтез белков, вызывает замедление роста, а в некоторых случаях приводит к гибели организма [He et al., 1993]. Ацетилирование полиаминов по так называемому ацетилазному пути деградации, помогает предотвратить эффект токсичности полиаминов как в про-, так и в эукариотах [Matsui et al., 1982]. Образующиеся при этом ацетилпроизводные полиаминов далее окисляются полиаминооксидазами, деацетилируются, либо экскретируются из клетки [Ignatenko et al., 1996]. У некоторых микроорганизмов охарактеризован также альтернативный аминотрансферазный путь деградации полиаминов.

Наиболее подробно изучен аминотрансферазный путь деградации путресцина в клетках *Escherichia coli*. Показано, что трансминирование путресцина, катализируемое путресцин аминотрансферазой (КФ 2.6.1.29), и последующее декарбоксилирование образующегося аминобутиральдегида приводят к образованию  $\gamma$ -аминобутирата (GABA), который в дальнейшем преобразуется в сукцинат, включаясь в цикл Кребса [Snaibe et al., 1985]. Совокупность реакций биосинтеза путресцина из аргинина и его деградации до сукцината образуют так называемый аргинин декарбоксилазный путь деградации аргинина (ADC) *Ecoli*. Было показано, что все ферменты ADC пути, за исключением аргинин декарбоксилазы, индуцируются в условиях азотного голодания [Snaibe et al., 1985]. Однако, несмотря на то, что ADC путь деградации *Ecoli* довольно хорошо охарактеризован как биохимически, так и генетически, еще не все гены этого пути картированы. Так до сих пор не были локализованы гены, кодирующие ключевые ферменты деградации путресцина - пиридоксальфосфат (PLP) - зависимую путресцин- $\alpha$ -кетоглутарат ( $\alpha$ -КГ) аминотрансферазу (ПАТазу) и аминобутиральдегид дегидрогеназу. Вследствие того, что уровень активности ПАТазы даже в индуцирующих условиях азотного голодания чрезвычайно низкий, изучение этого фермента до сих пор проводилось только в мутантных по утилизации полиаминов и GABA штаммах *Ecoli*. Возможно, по этой причине в независимо выполненных работах Kim [Kim, 1964] и Prieto-Santos [Prieto-Santos et al., 1986] приведены противоречивые биохимические характеристики частично очищенных препаратов ПАТазы.



В этой связи актуальной является задача идентификации гена *E.coli*, кодирующего ПАТазу, с использованием методов биоинформатики и генетической инженерии, выделение нативного фермента и изучение его свойств современными методами молекулярной биологии.

Цель и задачи работы.

Целью представленной работы являлась идентификация гена *Kcoli*, кодирующего ПАТазу, конструирование плазмид, обеспечивающих достаточно высокий уровень продукции фермента, а также определение основных физических и кинетических параметров очищенного препарата ПАТазы.

В процессе работы были решены следующие задачи:

- Идентификация гена, кодирующего ПАТазу, в хромосоме штамма *E.coli* K12 (ген *ygjG*);
- Изучение Ntr-зависимой регуляции экспрессии гена *ygjG*;
- Конструирование экспрессионных плазмид, обеспечивающих эффективную продукцию ПАТазы как в виде "слитого" белка с his<sub>6</sub>-tag лидерным пептидом (Ht-*YgjG*), так и нативного белка (*YgjG*);
- Разработка лабораторного метода выделения белка *YgjG* из растворимой фракции клеточных лизатов рекомбинантного штамма *E.coH*;
- Исследование и сравнительная характеристика каталитических активностей и некоторых основных физических и кинетических параметров очищенных препаратов *YgjG* и Ht-*YgjG*.

Научная новизна и практическая значимость работы.

Впервые • идентифицирован и клонирован ген (*ygjG*), кодирующий путресцин аминотрансферазу в клетках *Escherichia coli* K12. Изучена его структурная организация и выявлены регуляторные последовательности, обеспечивающие  $\sigma^{54}$  - зависимую индукцию экспрессии *ygjG* в условиях азотного голодания.

Разработана методика получения высокоочищенного препарата каталитически активного белка *YgjG* из биомассы рекомбинантного штамма *E. coli*.

Показано, что фермент эффективно катализирует путресцин: $\alpha$ -КГ аминотрансферазную реакцию, а также может использовать кадаверин и, с меньшей эффективностью, спермидин в качестве доноров аминогрупп. Фермент термостабилен, активен только в щелочном диапазоне значений pH и проявляет максимум активности при pH 9.0 и температуре 70 °C. Интересной особенностью фермента является его способность катализировать глутамагпируват аминотрансферазную реакцию (GPT, КФ 2.6.1.2). Ни одна из известных к настоящему времени полиамин аминотрансфераз не проявляет GPT активности. Субстратная специфичность *YgjG* и зависимость активности

фермента от рН совпадают с параметрами ПАТазы, выделенной Kim [Kim, 1964] из мутантного по утилизации путресцина штамма *Rcoli* В6.

Сравнение свойств очищенных препаратов YgiG и Ht-YgiG, несущего дополнительную his<sub>6</sub>-tag лидерную последовательность на N-конце белка, показало, что данная модификация • N-концевой последовательности влияет на субстратную специфичность и ферментативную активность препарата. Кроме того, элиминация первых 30 аминокислот YgiG приводит практически к полной потере активности фермента.

Полученные в работе данные могут быть использованы для исследования полиамин аминотрансфераз других микроорганизмов и для дальнейшего изучения путей метаболизма полиаминов в *E.coli*.

### **Апробация работы.**

Результаты работы были представлены на Пушкинской школе молодых ученых (Пушино, 15-19.05.02), на Научной сессии МИФИ-2003 (Москва, 12-16.01.03), на XV зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 12-19.02.03), на первом FEMS конгрессе европейских микробиологов (1<sup>st</sup> FEMS Congress of European Microbiologists, Slovenia, Lubiana, 29.06-03.07.2003).

### **Публикации.**

По результатам исследований опубликовано 5 печатных работ.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результаты и обсуждения, Выводов и Списка литературы.

Во Введении обоснована актуальность работы и сформулирована ее цель и практическая значимость. В Обзоре литературы рассмотрены современные представления об основных функциях полиаминов *in vivo*, описаны известные пути биосинтеза и катаболизма основных соединений полиаминов в микроорганизмах. Приведены сведения о полиамин аминотрансферазах, известных к настоящему времени. В разделе Результаты и обсуждение изложены результаты исследования структурной и функциональной организации гена *ugiG*, приведены физические и кинетические параметры исследованного фермента. В разделе Материалы и методы приведены материалы и методики, а также оборудование, использованные при проведении работы.

Диссертация изложена на 109 страницах, содержит 24 рисунка, 12 таблиц и список цитированной литературы из 179 наименований.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Идентификация гена, кодирующего ПАТазу, в хромосоме штамма *Kcoli* K12

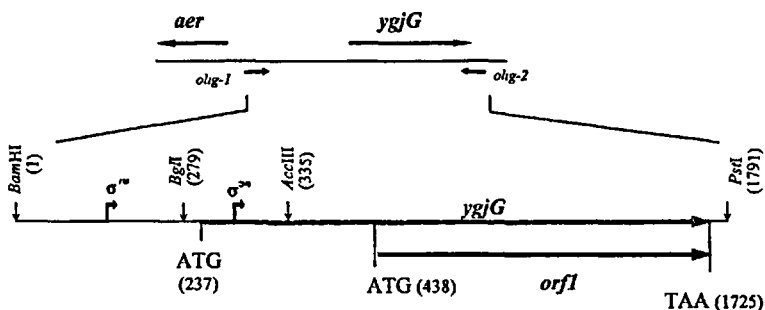
Исходя из принадлежности путресцина, содержащего дистальную аминокетильную группу в ω положении углеродной цепи, к классу субстратов для PLP-зависимых аминотрансфераз (АТаз) III группы [Mehta et al., 1993] и литературных данных о Ntr-зависимой экспрессии НАТазы *Exoli* [Snaibe et al., 1985] был осуществлен поиск гипотетических открытых рамок считывания (ORF) *Exoli*: а) обладающих существенной гомологией с консенсусной последовательностью аминотрансфераз III групп PF00202, б) экспрессия которых индуцируется в условиях азотного голодания. Проведенный нами анализ банка данных аминокислотных последовательностей *E.coli* K12 [Blattner et al., 1997] выявил единственную последовательность, удовлетворяющую обоим критериям — последовательность YgiG (SWISS-PROT Database accession number Q8XAN1) размером 496 аминокислотных остатков (а.к.о.), аннотированную как предполагаемая (putative) орнитин аминотрансфераза (ОАТаз, КФ 2.6.1.13). Найденная последовательность обладает существенной гомологией и высокой степенью схожести ( $E_{value}=5e^{-68}$ ) с консенсусной последовательностью трансаминаз III группы, а индукция соответствующей мРНК в условиях азотного голодания, согласно данным DNA-аппай [Zimmer et al., 2000], составляет от 3 до 5 раз. На основании полученных результатов нами было предположено, что YgiG может обладать ПАТ активностью.

Кодирующая YgiG последовательность гена *ygiG* (b3073, Blattner; GenBank accession number gi|1789454), размером 1491 п.н. расположена на 69,35 минуте хромосомы *Ecoli* ниже *aeg* гена (Рис. 1). Для установления типа ферментативной активности полипептида YgiG и проверки данных о Ntr-зависимой индукции, 1791-п.н. фрагмент, включающий последовательности *ygiG* и *aer-ygiG* межгенную область, был получен ПЦР-амплификацией соответствующего района хромосомы штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 с использованием олигонуклеотидов 5'-TTGGATCCGATTAATTGATTTAGATCGCA-3' и 5'-TTCTGCAGCCTGCGGGCGTACGC GTCG -3' в качестве праймеров (Рис. 1). В результате амплификации фрагмент был фланкирован сайтами для рестриктаз *Bam*III и *Pst*I. Полученный *Bam*III-*Pst*I фрагмент был клонирован под контролем промотора *Puc*svs в составе мультикопийного вектора pUC18 и нуклеотидная последовательность вставки в полученной плазмиде pUC18-ygiG была секвенирована для подтверждения правильной структуры фрагмента.

Клетки *Ecoli* TGI были трансформированы плазмидой pUC18-ygiG и плазмидой pUC18, использовавшейся в качестве контроля. Для индукции биосинтеза полипептида YgiG штаммы культивировали в следующих условиях: а) на богатой LB среде (индукция 1 мМ изопропилтиогаляктозидом (IPTG), 2 ч); б) на минимальной среде M9, содержащей пролин вместо аммония в качестве единственного источника азота (в условиях азотного голодания). Тестирование аминотрансферазной активности в клеточных лизатах проводили, используя в качестве доноров аминокетильных соединений следующие соединения с дистальными аминокетильными группами: путресцин, орнитин, ацетилорнитин (AcO), ГАВА, диаминопропан (DAP) и некоторые аминокислоты. В качестве возможных акцепторов

были проверены  $\alpha$ -КГ, пируват,  $\alpha$ -кетобутират. Продукты реакции трансминирования кетокислот анализировали при помощи тонкослойной хроматографии. Специфическая аминотрансферазная активность была обнаружена только в случае пары **путресцин- $\alpha$ -КГ** при щелочных значениях pH в штамме TGI(pUC18-ygjG). При этом наблюдалась существенная индукция ПАТ активности (около 10 раз) при росте TGI(pUC18-ygjG) в условиях азотного голодания ( $47 \text{ нмоль мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ ) по сравнению с ростом на богатой среде ( $5 \text{ нмоль мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ ). В контрольном штамме TGI(pUC18) данная активность не детектировалась ни на богатой среде, ни в условиях азотного голодания (т.е. была меньше нижнего предела разрешения методики измерения -  $1 \text{ нмоль мин}^{-1} \text{ мг}^{-1}$ ). Орнитин аминотрансферазная (O AT) активность, аннотированная для YgjG, также не детектировалась ни в одном штамме.

Таким образом, на данном этапе нашей работы было установлено, что амплификация 1,8-т.п.н. фрагмента, содержащего последовательность *ygjG*, в составе мультикопийной плазмиды действительно приводит к появлению специфической ПАТазной активности, которая индуцируется при выращивании клеток в условиях лимитации по неорганическому азоту. В связи с чем, было признано целесообразным дальнейшее изучение и проведение подробного анализа нуклеотидной последовательности клонированного 1,8-т.п.н. фрагмента, содержащего последовательность гена ПАТазы -*ygjG* (*pat*).



**Рис. 1.** Схема фрагмента хромосомы *Escherichia coli* K12 MG1655, содержащего гены *ygjG* и *aer-ygjG* межгенную область.

Стрелками показаны расположение и ориентация генов *ygjG* (g|1789454) и *aer*, и участки гомологии для олигонуклеотидов *olig-1* и *olig-2*, использованных при ПЦР амплификации фрагмента, содержащего *ygjG* и *aer-ygjG* межгенный район.

На схеме амплифицированного *Bam*HI-*Pst*I фрагмента указаны две анонсированные открытые рамки считывания *ygjG* (b3073, g|1789454) и *orf1* (g|1171884), локализация предполагаемых  $\sigma^{70}$ - и  $\sigma^{54}$ -зависимых промоторов, иницирующих кодонов и стоп кодона, а также - сайты рестриктаз, использованных при клонировании.

## 2. Функциональное изучение структурной организации 1,8-т.п.н. фрагмента, содержащего регуляторную область и последовательность гена ПА Тазы

### 2.1. Анализ нуклеотидной последовательности *ygjG* и *aer-ygjG* межцистронного района

Как результат компьютерного анализа нуклеотидной последовательности *ygjG* и *aer-ygjG* межцистронного района в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) приведены две предполагаемые промоторные последовательности специфичные для  $\sigma^{70}$  и  $\sigma^{54}$  субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы *Kcoli*, соответственно, а также сайт связывания регуляторного белка FIS (Рис. 2). Следует отметить, что если  $\sigma^{70}$ -зависимый промотор локализован в регуляторной области гена, то промотор  $\sigma^{54}$  - в 5' кодирующей последовательности *ygjG*. В соответствии с этим данными были аннотированы две рамки считывания для потенциального продукта трансляции мРНК (Рис. 1, 2). Первая из них, описанная выше как *ygjG*, кодирует полипептид размером 496 а.к.о., биосинтез которого возможен только в случае инициации транскрипции соответствующей мРНК с  $\sigma^{70}$ -зависимого промотора. Нуклеотидная последовательность *ygjG* будет обозначаться ниже как *orf*. Инициация транскрипции другой рамки - одноименного гена (gi|1171884) размером 1290 п.н. (обозначенной нами как *orf1*), кодирующей полипептид размером 429 а.к.о. (P42588), возможна с любого из промоторов. Обе рамки имеют классический стартовый кодон AUG.

Проведенный нами дополнительный анализ нуклеотидной последовательности района, расположенного слева от предполагаемой последовательности  $\sigma^{54}$ -промотора [Reitzer et al., 2001], выявил потенциальный сайт связывания регуляторного белка IHF и два сайта связывания белка-регулятора Ntr-ответа NRI, участие которых, как известно, необходимо для обеспечения инициации транскрипции  $\sigma^{54}$ -зависимой РНК полимеразой *Exoli* в условиях азотного голодания [Magasanik, 1996]. Нуклеотидные последовательности предполагаемых промоторных последовательностей, а также сайты связывания регуляторных белков и соответствующие им консенсусные последовательности указаны на Рис.2. Также при анализе нуклеотидной последовательности, расположенной справа от  $\sigma^{54}$ -промотора была выявлена еще одна возможная рамка считывания, обозначенная нами как *orf2* (Рис.2). Эта рамка кодирует полипептид размером 459 а.к.о., экспрессия которого возможна при инициации транскрипции с каждого из промоторов. Трансляция *orf2* должна инициироваться с редко используемого стартового кодона UUG, что, как правило отражает механизм регуляции скорости биосинтеза белка на трансляционном уровне [Parsons et al, 1988].

Рамки считывания *orf1* и *orf2* имеют легко узнаваемые потенциальные SD (Shine-Dalgamo) последовательности (Рис. 2), расположенные на функционально значимом расстоянии (5-13 оснований) от иницирующего кодона [Makrides, 1996], однако, теоретически каждая из трех рамок считывания может транслироваться *in vivo*.



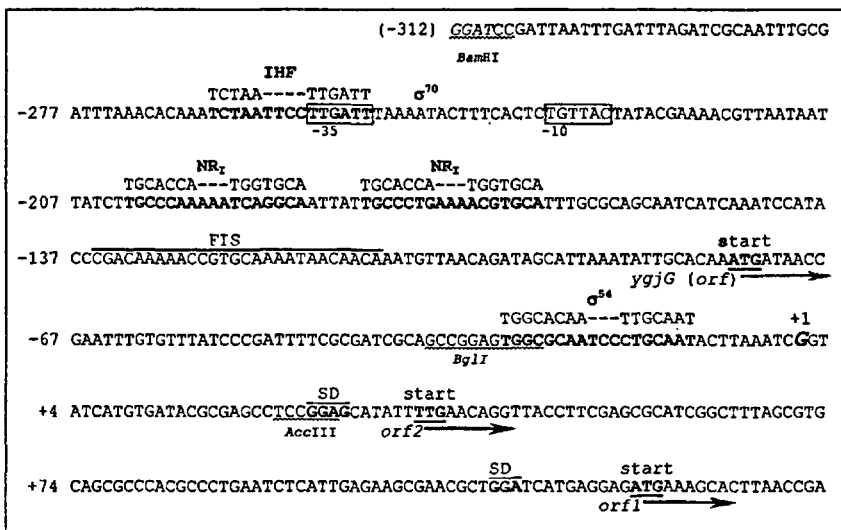


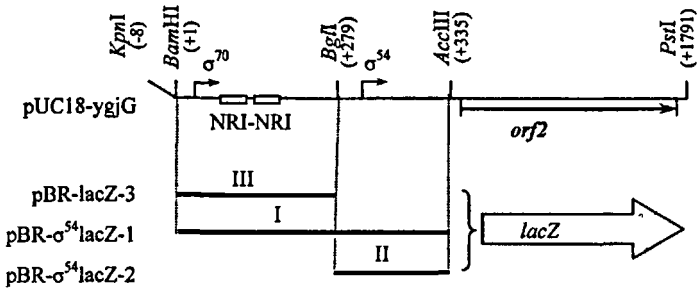
Рис. 2. Нуклеотидная последовательность 5'-концевой области *ygjG* и *aer-ygjG* межгеипной области.

Нумерация нуклеотидов приведена относительно положения "+1" старта мРНК выделенного курсивом (см. Раздел 2.3 и Рис.4). Анонсированные последовательности «-10» и «-35» предполагаемого  $\sigma^{70}$  промотора выделены рамкой, а возможный сайт связывания FIS подчеркнут сверху. Сайты рестриктаз подчеркнуты волнистой линией. Последовательности  $\sigma^{54}$  промотора и предполагаемых сайтов связывания NR<sub>1</sub> и IHf выделены жирным шрифтом, выше приведены соответствующие консенсусные последовательности. SD последовательности подчеркнуты сверху. Три вероятных стартовых кодона трансляции рамок *ygjG iprf*, *orf1* и *orf2* выделены жирным шрифтом.

## 22. Изучение регуляции экспрессии гена ПАТазаы.

Для экспериментальной проверки функциональности промоторов  $\sigma^{70}$  и  $\sigma^{54}$  были сконструированы три «гибридные» экспрессионные кассеты, в которых различные участки фрагмента *Bam*HI-*Acc*III (Рис. 1) регуляторной области гена ПАТазаы, были слиты со структурной частью гена-репортера *lacZ* (Рис 3). При этом в разных конструкциях эффективность экспрессии гена  $\beta$ -галактозидазы определялась: а) в случае кассеты I, содержащей полноразмерный фрагмент регуляторной области ПАТазаы *Bam*HI-*Acc*III, - силой обоих промоторов; б) в случае кассеты II (фрагмент *BgR*-*Acc*III) - только активностью промотора  $\sigma^{54}$ ; в) в случае кассеты III (фрагмент *Bam*HI-*Bgl*II) - только активностью промотора  $\sigma^{70}$ . Экспрессионные кассеты были клонированы в составе плазмиды pBRP [Ptitsyn et al., 1990], полученной из pBR322, путем замены *Eco*RI-*Sph*I фрагмента ДНК, содержащего промотор P<sub>mitA</sub> вместе с 5'-дистальной частью гена устойчивости к тетрациклину *tetA*, на соответствующий *Eco*BI-*Sph*I фрагмент

полилинкера плазмиды pUC18. В качестве контрольной плазмиды использовали pBR-O-*lacZ*, полученную при клонировании в векторе pBRP только структурной части гена *lacZ*.



**Рис. 3.** Схема конструирования плазмид pBR- $\sigma^{54}$ lacZ-1, pBR- $\sigma^{54}$ lacZ-2 и pBR-lacZ-3. Три различных участка регуляторной области гена ПАТазы (обозначенные как I, II, III и содержащие: предполагаемые последовательности  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{54}$  промоторов и сайтов связывания NRI) клонированы в виде слитых с *lacZ* генов в составе векторной плазмиды pBRP.

**Таблица 1.** Уровень экспрессии *lacZ* в рекомбинантных штаммах при различных условиях роста.

Штамм	Активность $\beta$ -галактозидазы, МУ <sup>a</sup>		
	LB <sup>b</sup>	M9	M9, без аммонийных солей, плюс пролин
TG1(pBR- $\sigma^{54}$ lacZ-1)	190	3,500	22,500
TG1(pBR- $\sigma^{54}$ lacZ-2)	140	400	800
TG1(pBR-lacZ-3)	110	130	170
TG1(pBR-O-lacZ)	140	190	220

<sup>a</sup> в единицах Миллера,

<sup>b</sup> условия культивирования штаммов описаны в работе [Samsonova et al, 2003], измерение активности  $\beta$ -галактозидазы проводили по методу Миллера [Miller, 1972].

Клетки *Kcoli* TG1 были трансформированы полученными плазмидами. Рекомбинантные штаммы культивировались в различных (по содержанию азота) условиях роста: на богатой LB среде, на минимальной среде M9 и в описанных выше условиях азотного голодания.

Измерение активности  $\beta$ -галактозидазы в лизатах штаммов проводили по стандартной методике [МШег, 1972]. Во всех четырех штаммах при росте на богатой среде LB, а также в штамме, несущем плазмиду pBR-lacZ-3 и контрольную плазмиду pBR-O-lacZ, при росте во всех трех средах, уровень экспрессии  $\beta$ -галактозидазы был

чрезвычайно низок (порядка 200 единиц Миллера) (Таблица 1), что свидетельствовало, во-первых, о практически полном отсутствии экспрессии гена ПАТазы при росте на богатой среде, и, во-вторых, об отсутствии промоторных последовательностей в 287-п.н. фрагменте *BamW-BgR*.

В штамме, несущем плазмиду **pBR- $\sigma^{54}$ -lacZ-2**, уровень экспрессии *lacZ* на стандартной среде M9, а также в условиях азотного голодания, был в 3 — 6 раз выше, чем в штамме с **pBR-lacZ-3**, что соответствует данным литературы о чрезвычайно низком уровне транскрипции с  $\sigma^{54}$ -зависимых промоторов при отсутствии NRI энхансера [Magasanik, 1996]. На основании этих результатов нами был сделан вывод о том, что 56-п.н. *BglI-AccIII* фрагмент действительно содержит последовательность  $\sigma^{54}$  промотора, который является основным для экспрессии ПАТазы.

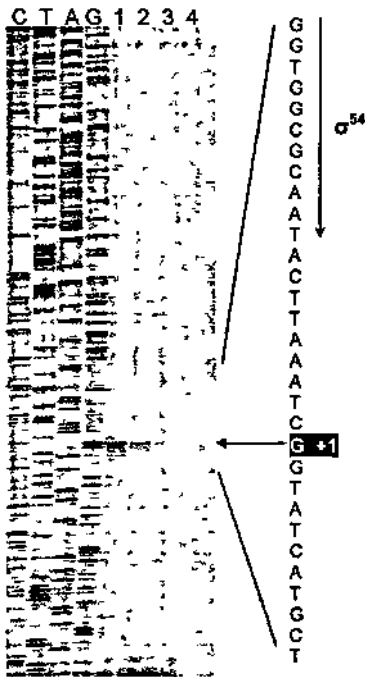
Рост штамма **TG1(pBR- $\sigma^{54}$ -lacZ-1)** на бедных средах, особенно в условиях азотного голодания, сопровождался существенным возрастанием активности Р-галактозидазы. По сравнению со штаммом **TG1(pBR- $\sigma^{54}$ -lacZ-2)**, уровень экспрессии *lacZ* в **TG1(pBR- $\sigma^{54}$ -lacZ-1)** увеличился в 9 раз на M9 среде и в 28 раз на безазотной среде с пролином. В случае использования в качестве альтернативного источника азота других аминокислот — аланина, орнитина или аргинина, увеличение активности  $\beta$ -галактозидазы в этих штаммах в условиях азотного голодания составило 22,5 раза, если в качестве альтернативного источника азота использовался аргинин или орнитин, и 19,5 раза в случае использования аланина. Следовательно, *BamHI-BglI* фрагмент чрезвычайно важен для экспрессии гена ПАТазы в условиях роста на M9 и в условиях азотного голодания, что обусловлено, по-нашему мнению, наличием в составе этого фрагмента сайтов связывания NRI и, возможно, IHF сайта. Учитывая не характерное для Ntr-зависимой регуляции расположение IHF левее сайтов NRI, нельзя исключать вероятность того, что IHF участвует не в регуляции гена ПАТазы, а в регуляции соседнего противоположно ориентированного гена *aer* [Rebbarpragada et al., 1997].

Таким образом, результаты данных экспериментов позволяют сделать вывод о том, что транскрипция мРНК гена ПАТазы инициируется только  $\sigma^{54}$  промотором при росте штаммов на минимальной среде M9, достигая максимума в условиях азотного голодания, и строго репрессируется на богатой LB среде.

### 2.3. Определение старта инициации транскрипции гена ПАТазы

Для подтверждения функциональности  $\sigma^{54}$  промотора было проведено определение положения старта транскрипции мРНК ПАТазы. Для этих экспериментов были выделены препараты мРНК штамма **TG1(pUC18-ygjG)**, выращенного на всех трех средах (описанных в Разделе 2.2). В качестве контроля использовали препарат мРНК штамм TG1(pUC18). Реакции синтеза кДНК проводили, используя радиоактивно меченый олигонуклеотид **5'-CGCTTCTCAATGAGATTCAGGGCGTGG-3'**, комплементарный последовательности «+88» - «+115» относительно 3'-фланкирующего нуклеотида  $\sigma^{54}$  промотора, выделенные препараты мРНК и рекомбинантную обратную транскриптазу

Omniscpt (Qiagen). Синтезированные фрагменты кДНК анализировали в 6% ПААГ, визуализацию и количественную оценку радиоактивных сигналов проводили с использованием мультифункционального сканера Typhoon 9210 (Amersham-Pharmacia) и программы ImageQuant (V 5 0). Анализ данных (Рис. 4) позволил идентифицировать в качестве возможного первого основания мРНК — гуанозин (G), локализованный на расстоянии 10 нуклеотидов относительно 3'-фланкирующего нуклеотида  $\sigma^{54}$  промотора. Соответствующий кДНК транскрипт детектировался только для препаратов РНК, полученных из клеток, выращенных на стандартной М9 среде и в условиях азотного голодания, причем количественное соотношение транскриптов в этих препаратах составило 1:4, соответственно.



**Рис 4.** Определение положения старта инициации транскрипции *ygiG*.

Полученные по методу достройки радиоактивно-меченого праймера препараты кДНК, а также сиквенсовые реакции, анализировали в 6% ПААГ. препараты кДНК полученные из мРНК штамма TGI(pUC18-ygiG) выращенного: в условиях азотного голодания - дорожка 1; - в минимальной среде М9 - дорожка 2, - в LB -дорожка 3. На 4 дорожке нанесен препарат кДНК полученный из мРНК штамма TGI(pUC18), выращенного в условиях азотного голодания.

Таким образом, полученные результаты подтверждают факт инициации транскрипции мРНК только с  $\sigma^{54}$ -специфичного промотора, что соответствует результатам эксперимента с использованием гена-репортера *lacZ* (Таблица 1) и результатам измерения активности ПАТазы в клетках штамма TGI(pUC18-ygiG) при различных условиях выращивания (см. Раздел 1) Следует также отметить, что наши эксперименты показывают некорректность анонсирования ORF *ygiG* (gl789454, Ы3073) как гена размером 1491 п н, кодирующего полипептид размером 496 а.к.о. (SWISS-PROT Database, Q8XAN1). Анонсированный для этой ORF  $\sigma^{70}$ -зависимый промотор также не



Клетки BL21(DE3) трансформировали полученными плазмидами pET15b-Ht-ORF1, pET15b-Ht-ORF2 и контрольной плазмидой pET15b. Биосинтез целевых белков в рекомбинантных штаммах индуцировали добавлением 1 mM IPTG и тестировали полученные лизаты штаммов на присутствие активности ПАТазы. ПАТ активность в штаммах BL21(DE3)[pET15b-Ht-ORF1] и BL21(DE3)[pET15b-Ht-ORF2] составила 0,05 и 2,16 мкмоль  $\text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$ . В контрольном штамме BL21(DE3)[pET15b] ПАТ активность не детектировалась. Электорофоретический анализ белков из клеточных лизатов штаммов показал, что спустя два часа после индукции синтеза слитых белков их удельное содержание в растворимой фракции клеточных белков составило 2,4 % для Ht-ORF1 и 8,5 % для Ht-ORF2 соответственно (Рис.6).

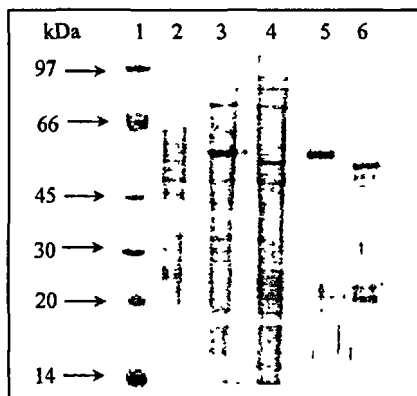


Рис. 6. Биосинтез Ht-ORF1 и Ht-ORF2 в клетках *K coLi* Очистка этих белков методом ИМАС хроматографии 1 -маркер молекулярных масс; 2,3,4— растворимая фракция клеточного лизата штаммов BL21(DE3) [pET15b], BL21(DE3)[pET15b-Ht-ORF2] и BL21 (DE3)[pET15b-Ht-ORF1], соответственно, через 2 часа после индукции синтеза слитых белков; 5,6- препараты Ht-ORF2 (3,5 мкг) и Ht-ORF1 (4 мкг) соответственно.

Для сравнения удельных активностей Ht-ORF1 и Ht-ORF2 были получены очищенные препараты слитых белков. Наличие полигистидиновых последовательностей в N-концевой части гибридных белков Ht-ORF1 и Ht-ORF2 позволило использовать для их эффективной очистки ИМАС хроматографию (immobilized-metal-affinity chromatography). Выход полипептида Ht-ORF2 составил около 80%. Было получено 4,5 мг препарата, содержащего, по результатам сканирования SDS-электрофорезного геля, до 95% целевого белка (Рис. 6). Напротив, выход препарата Ht-ORF1 составил менее 20%, что, по нашему мнению, было вызвано протеолитической деградацией рекомбинантного белка как на стадии его биосинтеза, так и в процессе его очистки. Содержание целевого белка Ht-ORF1 в полученном препарате по результатам сканирования SDS-электрофорезного геля (Рис. 6) не превышало 65%. Молекулярные массы выделенных полипептидов Ht-ORF1 (48 kDa) и Ht-ORF2 (52 kDa) соответствовали сумме расчетных значений  $M_r$ , ORF1 = 46,3 kDa, а также  $M_r$ , ORF2 = 49,6 kDa, и his<sub>6</sub>-tag лидерного пептида - 2,1 Ша, соответственно.

Анализ ПАТ активности очищенных препаратов Ht-ORF1 и Ht-ORF2, показал, что удельная активность Ht-ORF2 составляет 11,7 мкмоль  $\text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$ , в то время как

активность Ht-ORF1 – только 0,2 мкмоль  $\text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$ . По-видимому, элиминация первых 30 N-концевых аминокислот практически инактивирует фермент. Полученный результат функционального анализа продуктов трансляции Ht-ORF1 и Ht-ORF2 свидетельствует о том, что *orf2* является истинной рамкой гена *YgjG*, кодирующей биологически активный белок YgjG (ПАТазу) размером 459 а.к.о.

### 3. Характеристика каталитической активности YgjG (ПАТазы) *E.coli*

Любые модификации аминокислотной последовательности белка могут оказывать влияние на его биологическую активность. Такое влияние, однако, проявляется не всегда, или может быть выражено слабо. Согласно результатам, полученным нами при функциональном анализе продуктов трансляции *orf1* и *orf2*, N-концевая кодирующая последовательность ПАТазы имеет решающее значение в процессе формирования каталитически активного белка (факт интенсивного протеолиза Ht-ORF1 также можно рассматривать как косвенное свидетельство в пользу этой гипотезы). Поэтому, чтобы охарактеризовать каталитическую активность YgjG, а также проверить соответствие синтезирующегося *in vivo* белка ПАТазы продукту трансляции *orf1*, мы сочли необходимым выделить нативный препарат YgjG.

#### 3.1. Экспрессия и разработка метода выделения белка YgjG

С этой целью нами была реализована схема экспрессии активной ПАТазы на мультикопийном плазмидном векторе, с заменой NtrC-регулируемого промотора  $\sigma^{54}$  на сильный промотор фага T7. Для эффективной экспрессии YgjG фрагмент плазмиды pUC18-ygjG, первичная структура которого включала в себя последовательность *orf1* (а также и более короткую последовательность *orf1*) вместе с предполагаемым сайтом связывания рибосом, был ПЦР-амплифицирован с использованием праймеров 5'-ACTTCTAGACCTCCGGAGCATATTTTGAAC-3' и 5'-TTCTGCAGCCTGCGGGCGTACGCGTTCG-3' и клонирован в составе плазмидного вектора pET22b(+) (Рис. 7). Анализ ПАТ активности в клеточном лизате штамма BL21(DE3) трансформированного полученной плазмидой pET22b-ORF2 показал, что спустя два часа после индукции синтеза ПАТазы ее активность составляла порядка 340 нмоль  $\text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$ .

Разработанная нами процедура очистки YgjG из растворимой фракции тотального клеточного белка штамма BL21(DE3)[pET22b-ORF2] включала стадии фракционирования, в растворе-  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , обогащения при высокотемпературной инкубации и три хроматографических стадии очистки (Таблица 2). Все этапы очистки проводили при 4 °С. Присутствие 10 цМ PLP в буферных растворах на всех этапах очистки способствовало сохранению ПАТ активности фермента. Высокий уровень термостабильности YgjG (см. ниже) позволил ввести этап очистки с помощью термоинкубации при 60°С. Хроматографическая очистка препарата на ДЕАЕ-сефарозе и гидроксилатапите (ГАП) позволили достичь 95% чистоты YgjG (Рис. 8) с выходом 36%.

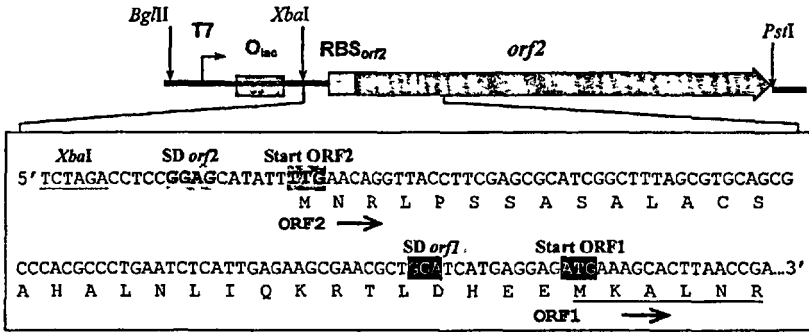


Рис. 7. Структура экспрессионной кассеты плазмиды pET22b-ORF2.

Показаны: промотор фага T7 (T7), предполагаемые SD *orf1* и SD *orf2*, инициирующие стартовые кодоны (Start ORF1 и Start ORF2), а также N-концевые аминокислотные последовательности ORF2 и ORF1 (подчеркнута). Направление трансляции показано стрелками.

Таблица 2. Очистка рекомбинантного препарата YgjG из *E.coli* K12.

Этап очистки	Блок (мг)	РАТ активность (мкмоль мин <sup>-1</sup> )	Удельная РАТ активность (мкмоль мин <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup> )	Выход (%)	Степень очистки
Лизат	41	13.93	0.34	100	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (35-65 %)	21.3	12.98	0.61	93	1.8
Температурная инкубация	5.3	12.87	2.41	92	7.1
Гидроксилапатит (1 <sup>м</sup> )	1.2	10.94	9.12	79	26.8
ДЕАЕ-сефароза	0.6	7.11	11.85	51	34.9
Гидроксилапатит (2 <sup>м</sup> )	0.36	5.08	14.1	36	41.5

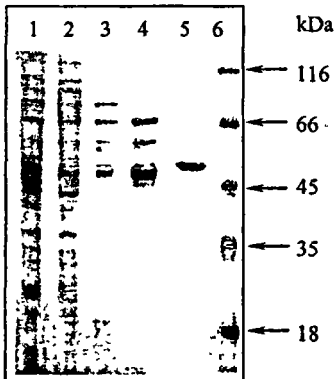


Рис. 8. SDS-PAGE электрофорез этапов очистки препарата YgjG

1 - растворимая фракция клеточного лизата (12 мкг белка), 2 - очистка сульфатом аммония (10 мкг), 3 - температурная обработка (2 мкг), 4 - препарат YgjG после первого этапа ГАП хроматографии (6 мкг), 5 - препарат YgjG после последовательно проведенных ДЕАЕ и второй ГАП хроматографии (2 мкг), 6 - маркер молекулярных масс.



Удельная ПАТ активностью очищенного препарата YgjG составила **14,1** мкмоль мин<sup>-1</sup> мг<sup>-1</sup> (Таблица 2). Полученный препарат был достаточно стабилен, сохраняя 90% активности в течение двух суток при +4 °С либо в течение 2 месяцев при -70 °С.

Молекулярная масса выделенного белка YgjG по данным SDS-электрофореза составила около 50 kDa, что согласуется с расчетным значением и подтверждает сделанное нами ранее заключение о том, что каталитически активный препарат YgjG (ПАТаза) является продуктом трансляции *orf2*.

Молекулярная масса препарата нативного YgjG, определенная с помощью гель-фильтрации на колонке Сефакрил S-300, составила **203,4±9,3 kDa**, что свидетельствует о тетрамерной структуре белка в растворе при нейтральном рН.

### 32. Характеристика субстратной специфичности и основных физических и кинетических параметров препаратов Ht-YgjG и YgjG

С целью определения влияния N-концевой гексагистидиновой последовательности на биологическую активность нативного белка YgjG мы сочли интересным провести параллельное исследование субстратной специфичности, основных физических и кинетических параметров как нативного белка YgjG так и его производного - Ht-YgjG.

Определение субстратной специфичности очищенных препаратов Ht-YgjG и YgjG проводили, используя в качестве доноров аминокрупп следующие соединения с дистальными аминокруппами: путресцин, кадаверин, спермидин, спермин, агматин, L-орнитин, ацетилорнитин, GABA, DAP, P-аланин, а также основные L-аминокислоты. В качестве возможных акцепторов были проверены **α-КГ, пируват, α-кетобутират, фенилпируват, α-кетоизовалериат, α-кетоизокапроат и α-кето-β-метилвалериат.**

Было показано, что оба фермента проявляют схожую субстратную специфичность (Таблица 3). Для обоих ферментов максимальные значения активности достигались при использовании в качестве акцептора аминокрупп - **α-КГ**, а в качестве доноров аминокрупп - путресцина (100%) или кадаверина (95-97%). Полученный результат показывает, что YgjG, также как и ПАТаза, выделенная Kim [Kim, 1964] из мутантного штамма *E.coli*, является диамин аминотрансферазой. Гораздо менее эффективно в качестве донора аминокрупп препараты YgjG и Ht-YgjG используют спермидин (27-32%). Практически не активны в качестве доноров L-аланин, агматин и L-орнитин (1-4%). Ферментативная активность не обнаруживалась в присутствии таких полиаминов как спермин и DAP. **β-аланин, GABA;** ацетилорнитин и орнитин также не активны в реакциях, катализируемых YgjG и Ht-YgjG.

Следует отметить, что YgjG также достаточно эффективно катализировал перенос аминокруппы глутамата на пируват, проявляя тем самым глутамат:пируват аминотрансферазную (GPT) активность. GPT активность препарата Ht-YgjG значительно ниже. Ни одна из известных к настоящему времени аминотрансфераз III группы не проявляет GPT активности, хотя присутствие вРТАзы (КФ 2.6.1.2), способной катализировать синтез L-аланина в грубых экстрактах клеток *Exoli*, ранее было обнаружено [Reitzer, 1996]. Фрагмент ДНК, который, как полагали, содержит ген *aJaB*,

кодирующий GPTазу, был клонирован на мультикопийном векторе [Wang, 1987]. Однако приведенные в работе данные рестрикционного анализа клонированного фрагмента [Wang, 1987] не совпадают с рестриктной картой гена *ygjG*, что свидетельствует о том, что авторами был клонирован отличающийся от нашего фрагмент хромосомы *Exoli*.

Таблица 3. Субстратная специфичность очищенных препаратов Ht-YgjG и YgjG с различными донорами и акцепторами аминокрупп.

Субстрат <sup>а</sup>	Ht-YgjG	YgjG
Донор аминокрупп <sup>б</sup>	Относительная активность (%) <sup>в</sup>	
Путресцин	100	100
Кадаверин	97	95
Спермидин	32	27
L-Аланин	4	4
Агматин	2	2
L-Орнитин	2	1
L-Глутамат <sup>г</sup>	21	30
Акцептор аминокрупп <sup>а</sup>		
$\alpha$ -Кетоглутарат	100	100
$\alpha$ -Кетобутират	12	23
Пируват	38	34

<sup>а</sup> определение субстратной специфичности проводилось в линейном диапазоне концентраций детектируемого продукта реакции при насыщающих концентрациях субстратов.

<sup>б</sup> в качестве акцептора во всех реакциях, за исключением GPT, использовался  $\alpha$ -КГ.

<sup>в</sup> РАГ активность с  $\alpha$ -КГ была принята за 100%.

<sup>г</sup> GPT активность.

<sup>а</sup> в качестве донора аминокрупп во всех реакциях использовался путресцин.

Способность кетокислот выступать в качестве акцепторов аминокрупп исследовали с использованием путресцина в качестве донора аминокрупп. Было показано, что YgjG и Ht-YgjG осуществляют перенос аминокруппы на пируват и  $\alpha$ -кетобутират. Однако, эффективность этого процесса существенно ниже, чем в случае  $\alpha$ -КГ. Такие кетокислоты, как фенилпируват,  $\alpha$ -кетоиоизвалериат,  $\alpha$ -кетоиоизокапроат и  $\alpha$ -кето- $\beta$ -метилвалериат были полностью инертны в качестве акцепторов.

Сравнение основных физических параметров препаратов YgjG и Ht-YgjG (Рис. 9) показало, что оба белка активны в диапазоне щелочных значений pH и проявляют максимальную активность при pH=9. При pH=7 активность препаратов значительно снижается (в 5 - 6 раз). Эти результаты достаточно хорошо согласуются с данными Kim [Kim, 1964], полученными для препарата ПАТазы, выделенного из мутантного по утилизации путресцина штамма *Exoli* В (способного использовать путресцин в качестве единственного источника азота и углерода). Однако согласно другим данным, оптимум

активности препарата ПАТазы, выделенного из мутантного по утилизации GABA и путресцина штамма *E.coli* K-12, наблюдался при pH 7.2 [Prieto-Santos et al., 1986]. Возможно, это несоответствие вызвано существованием отличного от YgjG фермента, также катализирующего ПАТ реакцию с максимальной активностью при pH 7.2.

Изучение температурных зависимостей ПАТ активностей очищенных препаратов YgjG и Ht-YgjG показало, что максимум активности для Ht-YgjG наблюдается при 60 °С, а для YgjG - при 70 °С (Рис. 9,Б). При физиологических значениях температур (в диапазоне 20 - 40°С) удельные активности обоих препаратов практически совпадали. При высоких температурах, 80 - 90°С, активности препаратов снижаются (до 30-40% от максимальной). Также было показано, что падение активности рекомбинантного препарата Ht-YgjG за 50 мин. инкубации при 80 °С составляет 16%, а для препарата нативного белка — только 5%, что свидетельствует о достаточно высокой термостабильности изучаемых препаратов. При этом препарат YgjG более стабилен при высоких температурах, чем Ht-YgjG, содержащий N-концевую гексагистидиновую последовательность.

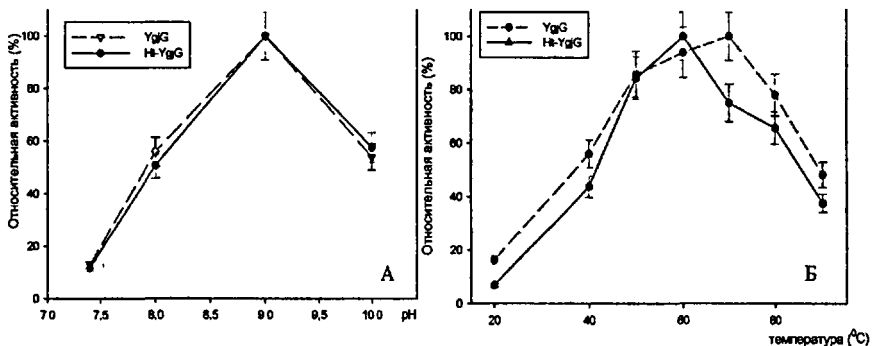


Рис. 9. Зависимость относительной ПАТ активности<sup>а</sup> очищенных препаратов YgjG и Ht-YgjG от pH (А) и температуры (Б).

<sup>а</sup> - За 100% принята максимальная активность каждого препарата при pH=9.0.

Для определения кинетических параметров ПАТ реакции, протекающей по механизму с замещением фермента ("пинг-понг-би-би" механизм) были исследованы зависимости начальных скоростей реакции от концентрации одного из субстратов при насыщающей концентрации второго субстрата [Корниш-Боуден, 1979]. Для каждой из исследованных пар сопряженных субстратов с помощью регрессионного анализа экспериментальных данных определялись, кажущиеся значения параметров  $K_m^{app}$  и  $V_{max}^{app}$ . После чего, на основе известных теоретических зависимостей [Корниш-Боуден, 1979], рассчитывались значения максимальной начальной скорости реакции  $V_{max}$  и констант Михаэлиса  $K_m$  для соответствующих субстратов. Значения каталитической константы  $k_{cat}$  (числа оборотов фермента) были определены на основании расчетных

значений  $V_{max}$  и  $M_r$  белка. Полученные кинетические параметры ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$ ) ПАТ реакции, катализируемой препаратами YgjG и Ht-YgjG представлены в Таблице 4. Для нативного белка дополнительно были определены кинетические параметры реакции трансминирования кадаверина и спермидина.

Таблица 4. Основные кинетические параметры\* Ht-YgjG и YgjG.

Фермент	$M_r$ , kDa	Субстрат	$K_m$ мМ	$V_{max}$ , μмоль мин <sup>-1</sup> мг <sup>-1</sup>	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , с <sup>-1</sup> мМ <sup>-1</sup>
YgjG	50	α-Кетолутарат	4,2 ± 0,5	20,1 ± 0,8	16,8	4,0
		Путресцин	1,9 ± 0,3	17,1 ± 0,9	14,3	7,5
		Кадаверин	6,1 ± 0,3	14,6 ± 0,3	12,2	2,0
		Спермидин	26,1 ± 6,2	12,8 ± 1,9	10,7	0,4
Ht-YgjG	52	α-Кетолутарат	7,2 ± 1,5	22,5 ± 2,0	23,3	3,2
		Путресцин	4,8 ± 0,9	19,6 ± 1,3	17,3	3,6

\* Приводятся расчетные значения кинетических параметров  $V_{max}$  и  $K_m$ .

Анализ значений  $k_{cat}/K_m$  для трех основных доноров YgjG - путресцина, кадаверина и спермидина, показывает, что путресцин является наиболее предпочтительным субстратом, и свидетельствует о том, что белок действительно является путресцин:α-KГ аминотрансферазой. Кадаверин также может служить донором аминогрупп, хотя сродство YgjG к этому субстрату в три раза ниже, чем к путресцину, а отношение  $k_{cat}/K_m$  - в четыре раза ниже. Для спермидина соответствующие параметры на порядок ниже.

Сравнение кинетических параметров YgjG и Ht-YgjG, показывает, что хотя значения  $V_{max}$  для них достаточно близки, сродство к субстратам у YgjG примерно в два раза выше. При этом, значения  $k_{cat}/K_m$  для путресцина также отличаются в два раза, а для α-KГ практически совпадают. На основании приведенных данных можно заключить, что наличие дополнительного N-концевого пептида в Ht-YgjG, не сильно сказываясь на физических свойствах белка, изменяет его кинетические параметры по сравнению с YgjG. Выше мы отмечали, что элиминация первых 30 N-концевых аминокислот практически инактивирует фермент (см. Раздел 2.4). Следовательно, N-концевая область YgjG существенна для его ферментативной активности.

Определенные значения кинетических параметров препарата YgjG могут показаться достаточно высокими, однако известно (<http://www.brenda.unikoeln.de>), что для многих ферментов, принадлежащих к подгруппе III PLP-зависимых аминотрансфераз, значения  $K_m$  характеризуются как микромолярными, так и миллимолярными величинами (например - 2,5 мМ для α-KГ и 0,48 мМ для ацетилорнитина в случае ацетилорнитин-АТазы *E.coli*).

#### 4. Влияние аллельного состояния гена *ygjG* на утилизацию путресцина

Согласно литературным данным большинство штаммов *E. coli*, в том числе и широко используемый лабораторный штамм *E. coli* K12 MG1655 [Tabor et al, 1985; Tkachenko et al, 1996], не способны использовать путресцин в качестве альтернативного источника азота. При изучении путей деградации путресцина в *E. coli*, как правило, использовались мутантные штаммы, утилизирующие путресцин [Dover et al, 1972; Snaibe et al, 1985]. Нами был получен штамм MG1655 *ptr*<sup>+</sup>, способный расти на путресцине в качестве единственного источника азота (Рис.10А) и стабильно наследующий этот фенотип. Мутация *ptr*<sup>+</sup> была картирована в районе 80 мин хромосомы при помощи *in vivo* клонирования фрагментов хромосомальной ДНК на фагмиде  $\mu$ d5005 [Groisman et al, 1986].

С целью изучения влияния аллельного состояния гена *ygjG* на фенотип клеток *E. coli* мы инактивировали *ygjG* на хромосоме штамма MG1655*ptr*<sup>+</sup>, путем замены нативного аллеля *ygjG* на ПЦР фрагмент, содержащий ген *cat* антибиотической устойчивости к хлорамфениколу при помощи Red рекомбиназы фага  $\lambda$  [Datsenko et al, 2000]. Таким образом, был получен штамм MG1655 *ptr*<sup>+</sup>*ygjG*. Делеция *ygjG* не является летальной для клеток, что соответствует литературным данным [Schneider et al, 2002]. Анализ кривых роста штаммов MG1655 *ptr*<sup>+</sup>*ygjG* и MG1655 *ptr*<sup>+</sup> на безазотной среде М9 с путресцином показал (Рис. 10,А), что элиминация *ygjG* приводит к неспособности штамма утилизировать путресцин.

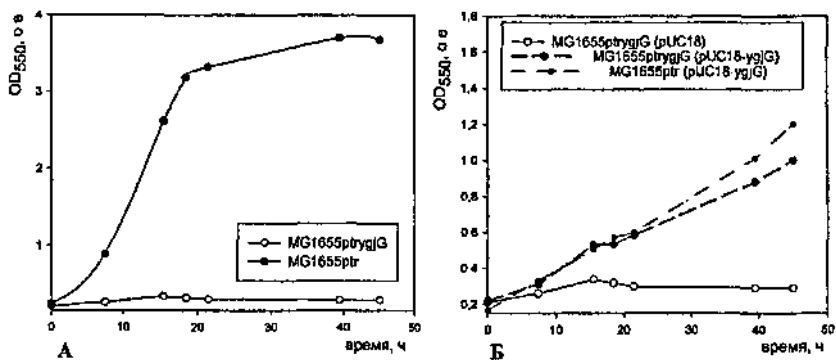


Рис.10. Кривые роста штаммов *E. coli* на среде с путресцином в качестве единственного источника азота

Влияние амплификации гена *ygjG* на способность *E. coli* утилизировать путресцин определяли на примере штамма MG1655*ptr*<sup>+</sup>*ygjG* трансформированного плазмидой pUC18-*ygjG*. Наличие природной регуляторной области перед геном *ygjG* в составе плазмиды pUC18-*ygjG*, обеспечивало индукцию экспрессии *ygjG* в условиях азотного голодания (см. Раздел 1), в результате чего полученный штамм приобрел способность

утилизировать путресцин (Рис.10,Б). Однако рост штамма **MG1655ptr<sup>+</sup> yjG** [pUC18-yjG] на безазотной среде M9, содержащей путресцин в качестве единственного источника азота, был очень медленным (время удвоения около 36 ч). Трансформация исходного штамма **MG1655ptr<sup>+</sup>** плазмидой pUC18-yjG также привела к увеличению времени удвоения штамма на среде с путресцином с 4,5 ч. до 29 ч. При этом время удвоения **MG1655ptr<sup>+</sup>**, трансформированного контрольной плазмидой pUC18, по-прежнему, составляло 4,5 ч, что свидетельствует об ингибирующем эффекте от введения мультикопийной плазмиды pUC18-yjG, вызванном, по-видимому, высокой дозой гена *yjG* и, как следствие, синтезом значительного количества продукта переаминирования путресцина -  **$\Delta^1$ -пирролина**, который, как известно, токсичен для клеток *Kcoli* [Cooper et al, 1980].

Таким образом, на основании описанных выше результатов элиминации и амплификации *yjG*, можно заключить, что кодируемый этим геном фермент - ПАТаза «отвечает» в клетках *Ecoli* за утилизацию путресцина в качестве альтернативного источника азота.

## 5. Поиск гомологов белка YjG

Изучение основных кинетических параметров YjG подтвердило (см. Раздел 3.2), что фермент является ПАТазой, катализируя путресцин:а-КГ аминотрансферазную реакцию. Согласно литературным данным, в настоящее время обнаружена единственная ПАТаза, также использующая а-КГ в качестве акцептора - ПАТаза *Klebsiella pneumoniae* [Friedrich et al., 1979]. Однако ни аминокислотная последовательность, ни кинетические параметры этого фермента не охарактеризованы. Другие известные полиамин аминотрансферазы *Pseudomonas aeruginosa* [Lu et al., 2002] и *Arthrobacter* sp. TMP-1 [Yorifuji et al., 1997] используют в качестве акцептора пируват. Единственной путресцин аминотрансферазой с секвенированной в настоящее время последовательностью является фермент из *Pseudomonas aeruginosa*, кодируемый геном *spuC*. Однако, несмотря на схожую ферментативную активность, число идентичных аминокислотных остатков и консервативных замен в аминокислотных последовательностях SpuC (PA0299) и YjG составляет только 27 % и 43 %, соответственно.

При проведении анализа генома *Kcoli* K12 [Blattner et al, 1997] были выявлены шесть белков гомологичных YjG. Это ферменты, принадлежащие группе III АТаз с изученными каталитическими активностями, что позволяет с высокой долей вероятности утверждать, что YjG - единственная ПАТаза в геноме *Kcoli*. Паралогами YjG являются АсОАТазы, кодируемые генами *argD* (gi|1789759) и *cstC* (gi|1788044), ГАВААТазы, кодируемые *goaG* (gi|1787560) и *gabT* (gi|1789016), ОАПАТаза (gi|1786991) и глутамат-1-полуальдегид АТаза (gi|1786349). Число идентичных аминокислотных остатков и консервативных замен в аминокислотных последовательностях этих белков составляет - 36/54%, 34/49%, 34/53%, 34/52%, 33/51% и 29/47%, соответственно, что характерно для АТаз.

Среда ортологов YgjG с установленными каталитическими активностями максимальной гомологией обладает ОАТаза *Bacillus subtilis* RocD (gi|16081086). Число идентичных аминокислотных остатков и консервативных замен в аминотрансферазах YgjG и RocD составляет соответственно 33 и 56%. Существенной гомологией с ПАТазой *Exoli* обладают также ОАТ (gi|11968102) *Rattus norvegicus*, AcОАТ (gi|6324432) *Saccharomyces cerevisiae*, ОАТ (gi|3319072) *Human*, ОАТ (gi|23485730) *Plasmodium yoelii*, DАРАТ (gi|2340815, 32/51) *Acinetobacter baumannii* и последовательности АТаз IП группы из других организмов. Множественное выравнивание гомологичных YgjG полипептидов выявило в составе YgjG наличие консервативных последовательностей (Рис. 11) и позволило локализовать четыре инвариантных аминокислотных остатка (Gly-245, Asp-271, Lys-300 и Arg-426), отвечающих за связывание с субстратами и коферментом PLP. Интересно, что YgjG обладает наиболее протяженной N-концевой последовательностью, что, по нашему мнению, также свидетельствует о существенной роли N-концевой структуры для каталитической активности этого фермента.

Представляется целесообразным выделить в геномах других штаммов *E.coli* и родственных микроорганизмов гипотетические последовательности, имеющие около 94-99 % идентичных а.к.о. с YgjG. Это 496 а.к.о. последовательности, кодируемые одноименными генами *yjgG* - (gi|15803614) и (gi|26249659) штаммов *Exoli* 0157:117 EDL933 и CFT073, соответственно. Три 429 а.к.о. последовательности: *Salmonella enterica* serovar Typhi СП 8 STY3396 (gi|16504294), *Salmonella typhimurium* LT2 *oat* (gi|16421775) и YgjG (gi|30064418) штамма *Shigella flexneri* 2a str.2457T. А также последовательность размером 496 а.к.о., кодируемая геном *yjgG* (gi|24114370) другого штамма *Shigella flexneri* 2a - str.301. По-видимому, для этих последовательностей, как и в случае исследованной нами ПАТазы *Exoli* K12, имеет место ошибочная локализация ORF и истинной каталитически активной рамкой в каждом случае является полипептид размером 459 а.к.о., обладающий ПАТ активностью. В составе геномов не родственных *Exoli* организмов также были обнаружены гомологичные YgjG гипотетические последовательности, что свидетельствует о важной роли путресцин-аминотрансферазы в клеточном метаболизме азота и обуславливает целесообразность более подробного изучения этих ферментов.





## ВЫВОДЫ

1. Клонирован ген *ygiG* *Kcoli* K12 MG1655 и показано, что аннотированная как орнитин аминотрансфераза ORF *ygiG* кодирует ПАТазу - белок, обладающий путресцин: **$\alpha$ -кетоглутарат** аминотрансферазной активностью и эффективно катализирующий реакцию переаминирования кадаверина.

2. Показано, что  $\sigma^{54}$ -зависимая экспрессия *ygiG* индуцируется в условиях азотного голодания. Определен старт транскрипции мРНК *ygiG* и стартовый кодон (UUG) трансляции YgiG.

3. Сконструированы рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие эффективную продукцию YgiG как в виде слитого с **his<sub>6</sub>-tag** лидером полипептида (Ht-YgiG) так и в виде нативного белка. Разработан метод выделения и очистки нативного белка и получены высокоочищенные препараты YgiG и Ht-YgiG.

4. Исследованы субстратная специфичность обоих белков и их основные кинетические параметры в реакциях трансаминирования с использованием путресцина, кадаверина и спермидина в качестве доноров и  **$\alpha$ -кетоглутарата** в качестве акцептора аминок групп. Определены рН и температурная зависимости ферментативной активности ПАТазы YgiG.

**Результаты диссертации изложены в следующих публикациях:**

1. Samsonova N.N., Smirnov S.V., Altman I.B., Ptitsyn L.R. «Molecular cloning and characterization of *Escherichia coli* K12 *ygjG* gene» //VМС Microbiology, 3:2, (2003).
2. Samsonova N.N., Smirnov S.V., Altman I.B., Ptitsyn L.R. «Characterization of *Escherichia coli* YgjG protein as putrescine:2-oxoglutarate aminotransferase with broad substrate specificities» //FEMS Letters, v. 222(S), p.346, (2003).
3. Самсонова Н.Н., Смирнов С.В., Альтман И.Б., Птицын Л.Р. «Идентификация гена *Escherichia coli* K12, кодирующего путресцин аминотрансферазу» //XV зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Тез. докл. и стэнд, сообщений, с.31, Москва, (2003).
4. Самсонова Н.Н., Смирнов С.В., Альтман И.Б., Птицын Л.Р. «Идентификация гена *Escherichia coli* K12, кодирующего путресцин аминотрансферазу» //Научная сессии МИФИ-2003. Сборник научных трудов, том 5, с.32-33, Москва, (2003).
5. Самсонова Н.Н., Смирнов С.В., Альтман И.Б., Птицын Л.Р. «Изучение регуляции транскрипции и функциональная характеристика продукта трансляции гена *ygjG Exoli* K12» //6-я Путинская школа конференция молодых ученых. Тез. докл., с.315, Москва, (2002).

Принято к исполнению 26/04/2004  
Исполнено 27/04/2004

Заказ № 160  
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900  
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93  
(095)318-40-68  
[www.autoreferat.ru](http://www.autoreferat.ru)

9.9604