

На правах рукописи

**НЕМЦЕВА
Юлия Александровна**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В БИОСИНТЕЗЕ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ФЕРМЕНТЫ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
НУКЛЕОЗИДОВ В КЛЕТКАХ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ**

03.00.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ВЛАДИВОСТОК – 2005

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии
Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научные руководители:

кандидат биологических наук
Терентьев Л.Л.

доктор биологических наук,
профессор
Михайлов В.В.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Пивненко Т.Н.

кандидат биологических наук
Бакунина И.Ю.

Ведущая организация:

Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится «27» июня 2005 г. в «10⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета Д 005.005.01 в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159, ТИБОХ. Факс: (4232) 31-40-50. E-mail: science@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в филиале Центральной научной библиотеки ДВО РАН (г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159, ТИБОХ ДВО РАН).

Автореферат разослан «23» июля 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.х.н.

Прокопенко Г.И.
Прокопенко Г.И.

2007-4

2597151

3

6712

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последнее время морские микроорганизмы, в частности бактерии, привлекают внимание исследователей в связи с особенностями их метаболизма, обусловленными средой обитания. На жизнедеятельность морских бактерий значительное влияние оказывают такие факторы, как колебания температур океанических вод, гидростатическое давление, состав и содержание в воде различных растворенных солей. Это дает основание предполагать наличие уникальных метаболических путей, обеспечивающих рост и размножение морских бактерий, а также возможность обнаружения в их клетках ферментов, отличающихся по своим свойствам от аналогичных ферментов наземных организмов.

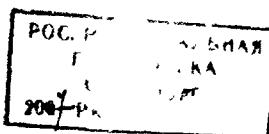
Морская вода представляет собой естественную среду, в которой имеются все компоненты, необходимые для жизнедеятельности бактериальных клеток, это растворенные пептиды, аминокислоты, углеводы, различные компоненты нуклеиновых кислот и другие органические и неорганические соединения. Находящиеся в морской воде нуклеиновые кислоты и их компоненты являются для бактерий не только источником азота, углерода и фосфора, но и используются в качестве предшественников синтеза ДНК и РНК. Биосинтез нуклеиновых кислот является одним из основных показателей продуктивности бактериальных (и не только) клеток. Увеличение количества ДНК в экстрактах клеток свидетельствует об их делении (размножении), РНК - определяет рост и метаболическую активность клетки.

Молекулярный механизм утилизации морскими бактериями экзогенных предшественников практически не изучен. Широко применяемый метод определения биосинтеза ДНК с помощью радиоактивно меченного тимидина, а также РНК - с помощью меченного уридулина, свидетельствует только о включении этих соединений в макромолекулы клетки, но не дает возможности определить, в какие именно биополимеры включается тот или иной предшественник и ферменты каких метаболических путей в этом задействованы. Экзогенные нуклеозиды транспортируются через клеточные мембранны и фосфорилируются в клетке до нуклеозидтрифосфатов, являющихся непосредственными субстратами для ДНК- и РНК-полимераз. Ключевую роль в этом процессе играют нуклеозидкиназы, катализирующие первую стадию фосфорилирования нуклеозидов до нуклеозидмонофосфатов. Хотя включение меченых нуклеозидов часто используется в качестве показателя продуктивности микробных сообществ, о наличии нуклеозидкиназ в клетках морских бактерий практически нет данных. Нет сведений ни о составе ферментов фосфорилирования нуклеозидов, ни об их свойствах и специфичности.

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение процесса утилизации экзогенных предшественников синтеза нуклеиновых кислот клетками морских бактерий.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать способность морских бактерий включать экзогенные тимидин и уридин в состав нуклеиновых кислот.
2. Протестировать активности ферментов фосфорилирования нуклеозидов в экстрактах клеток морских бактерий.
3. Определить спектр нуклеозидкиназ, катализирующих фосфорилирование тимидина и уридулина в клетках некоторых штаммов.
4. Разработать схемы выделения тимидин- и уридинкиназы и изучить свойства очищенных нуклеозидкиназ из трех бактериальных штаммов.



Положения, выносимые на защиту:

1. Клетки морских бактерий способны включать экзогенные рибо- и дезоксирибонуклеозиды в состав нукleinовых кислот.
- 2 В клетках морских бактерий присутствует активность ферментов фосфорилирования предшественников биосинтеза РНК и ДНК, набор нуклеозидкиназ может варьироваться у разных штаммов бактерий.
3. Экзогенные нуклеозиды фосфорилируются клеточными нуклеозид- и нуклеотидкиназами, что может свидетельствовать о важной роли вспомогательного пути биосинтеза предшественников в синтезе нукleinовых кислот морских бактерий.

Научная новизна и практическая ценность.

Показано, что клетки исследованных морских бактерий способны включать экзогенные тимидин и уридин в молекулы нукleinовых кислот, при этом метка каждого из этих предшественников может обнаруживаться как в ДНК, так и в РНК.

Впервые установлено присутствие в клетках нуклеозидкиназ, обеспечивающих фосфорилирование экзогенных предшественников. Показана гетерогенность нуклеозидкиназ в разных штаммах морских бактерий.

Впервые обнаружена множественность форм тимидин- и тимидилаткиназ у бактерий рода *Pseudoalteromonas* и уридинкиназы штаммов *Bacillus* sp. KMM 3573 и *Pseudoalteromonas haloplanktis* KMM 223. Показана способность некоторых тимидинкиназ катализировать дальнейшее фосфорилирование образующегося тимидинмонофосфата.

Из клеток *Pseudomonas* sp. KMM 3694, *Pseudoalteromonas aurantia* NCIMB 2033 и *Yersinia pseudotuberculosis* выделены и охарактеризованы тимидин- и уридинкиназы; исследованы их физико-химические свойства и субстратная специфичность.

Показано, что морские бактерии могут быть новым перспективным источником ферментов, в частности, нуклеозид- и нуклеотидкиназ. Очищенные ферменты могут быть с успехом использованы в биотехнологии и молекулярной биологии, а также при производстве меченых нуклеозидмоно-, -ди- и -трифосфатов.

Апробация работы. Результаты работы были доложены автором на 3-м Международном симпозиуме "Химия и химическое образование" (Владивосток, 2003); VII Дальневосточной молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2003); Научной конференции ТИБОХ ДВО РАН "Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии" (Владивосток, 2004).

Публикации. По материалам исследований опубликовано 7 работ (2 статьи и 5 тезисов докладов конференций).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 32 рисунка Список литературы включает 243 публикации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования

Объектами исследования служили 77 штаммов морских прокариот. Бактерии были собраны в ходе экспедиций на НИС "Академик Опарин" в район Курильских островов и в заливах Японского моря – это микроорганизмы, обитающие в морской воде, грунте, а также бактерии, ассоциированные с бурыми водорослями (*Fucus evanescens*, *Fucus* sp.), микроорганизмы, выделенные из беспозвоночных (губка *Fascaplysinopsis reticulata* (Коралловое море, Австралия) и образец неидентифицированной губки) и хордовых (асцидия *Halocynthia aurantium*). Образцы губок и асцидий собирали при помощи траула и драги.

Типовые штаммы исследованных бактерий хранятся в Коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН, являющейся членом WFCC и имеющей официальный акроним КММ и регистрационный номер 644.

1. Определение скорости роста клеток морских микроорганизмов в присутствии меченых нуклеозидов

Для изучения динамики роста микроорганизмов в присутствии меченых нуклеозидов и включения предшественников были проведены исследования двух штаммов КММ 3689 и КММ 636, принадлежащих к родам *Arthrobacter* и *Pseudoalteromonas* (рис. 1 и 2). Оба штамма способны включать меченные тимидин и уридин в нуклеиновые кислоты бактерий. Штамм КММ 3689 более эффективно включал метку из экзогенного уридуина, а КММ 636 – из тимидина, причем уровень включения тимидина в нуклеиновые кислоты обоих штаммов был примерно одинаков. После 24 часов инкубации с меченными предшественниками уровень их включения в состав нуклеиновых кислот снижался.

Эффективность включения меченых тимидина или уридуина в нуклеиновые кислоты широко используется для определения скорости роста и продуктивности бактерий в водной среде. Радиоактивная метка во фракции, осаждаемой холодной 5% ТХУ, может принадлежать как ДНК, так и РНК, поэтому нельзя использовать показатели включения тимидина или уридуина в кислотонерастворимый материал в качестве меры синтеза соответственно ДНК или РНК без учета специфичности и степени мечения макромолекул. Используя различную чувствительность нуклеиновых кислот к щелочному гидролизу, мы определили степень включения меченых тимидина и уридуина в ДНК бактерий. В клетках штамма *Arthrobacter* sp. КММ 3689 практически весь экзогенный тимидин включался только в ДНК, тогда как у штамма *Pseudoalteromonas maricaloris* КММ 636 часть метки из тимидина обнаруживалась в РНК. После 30 часов инкубации доля тритиевой метки из тимидина в составе нуклеиновых кислот снижалась по сравнению с 24-часовой инкубацией. Практически весь уридин включался в РНК. Небольшая часть метки из уридуина обнаруживалась в составе ДНК клеток *Arthrobacter* sp. КММ 3689. Бактерии КММ 636 включали уридин только в РНК.

Параллельно с измерением включения экзогенных предшественников в нуклеиновые кислоты определяли скорость роста клеток обоих штаммов. Увеличение количества клеток всех исследованных штаммов наблюдалось до 30 часов в присутствии в среде тимидина, и уридуина. Скорость роста микроорганизмов зависела и от штамма, и от присутствующего в среде нуклеозида. После 30 часов инкубации количество клеток не увеличивалось.

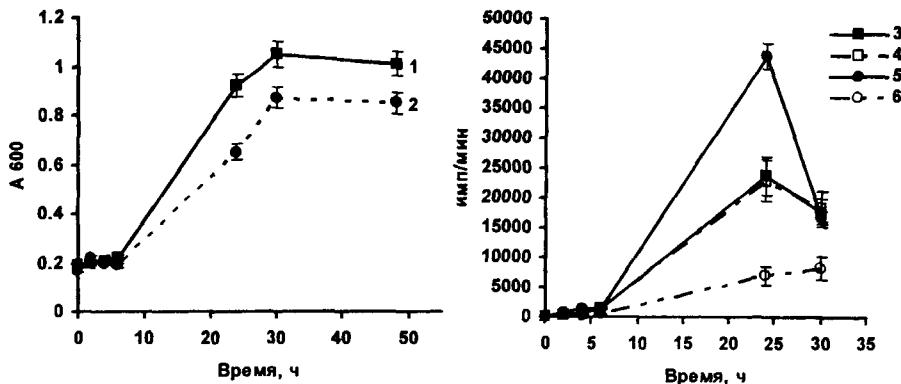


Рис. 1. Кривая роста и включение меченых предшественников в нуклеиновые кислоты клеток штамма *Arthrobacter* sp. KMM 3689 (1 – рост культуры в присутствии тимидина, 2 – рост в присутствии уридулина, 3 – общее включение метки из тимидина, 4 – включение метки из тимидина в ДНК, 5 – общее включение метки из уридулина, 6 – включение метки из уридулина в ДНК).

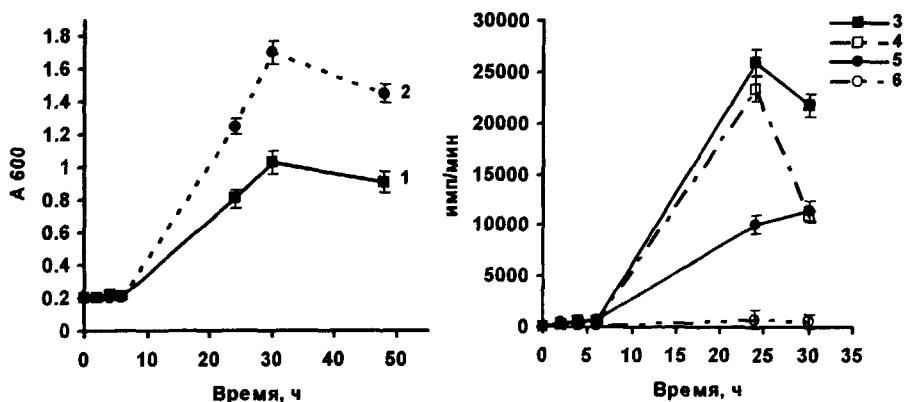


Рис. 2. Кривая роста и включение меченых предшественников в нуклеиновые кислоты клеток штамма *Pseudoalteromonas maricaloris* KMM 636 (1 – рост культуры в присутствии тимидина, 2 – рост в присутствии уридулина, 3 – общее включение метки из тимидина, 4 – включение метки из тимидина в ДНК, 5 – общее включение метки из уридулина, 6 – включение метки из уридулина в ДНК).

Скорость роста *Pseudoalteromonas maricaloris* в присутствии уридина была в 2 раза выше скорости роста штамма *Arthrobacter*, но, несмотря на это, отмечался более низкий уровень включения данного нуклеозида для КММ 636, по сравнению с клетками КММ 3689. В присутствии меченого тимидина рост клеток обоих штаммов находился примерно на одном уровне. Соотношение уровня включения метки из тимидина в нуклеиновые кислоты клеток КММ 3689 и КММ 636 со скоростью роста в присутствии этого же нуклеозида также было одинаковым.

Следующим этапом работы было изучение включения экзогенных предшественников при инкубации клеток с радиоактивной меткой в течение одного часа (на ранней стадии экспоненциальной фазы роста бактерий) *in vivo*. Для этого из коллекции морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН было взято 57 штаммов бактерий, принадлежащих 12 различным родам. Эффективность включения экзогенных нуклеозидов в РНК и ДНК клеток морских бактерий определяли после их выращивания в среде, содержащей меченные тритием тимидин или уридин (табл. 1).

Таблица 1. Включение предшественников в нуклеиновые кислоты морских микроорганизмов *in vivo*

Колекционн. номер штамма	Таксон	Включение тимидина (ед. ¹ /мин)		Включение уридина (ед. ¹ /мин)	
		*	**	*	**
1	2	4	5	6	7
KMM 3690	<i>Alcaligenes</i> sp.	4300	2000	4300	2600
KMM 3726	<i>Alteromonas/Pseudoalteromonas</i>	300	300	700	50
KMM 3684	<i>Arthrobacter</i> sp.	10420	6350	27660	0
KMM 3685	<i>Arthrobacter</i> sp.	10100	8800	36660	5700
KMM 3686	<i>Arthrobacter</i> sp.	5200	5700	41260	6580
KMM 3687	<i>Arthrobacter</i> sp.	35800	30200	114600	15300
KMM 3689	<i>Arthrobacter</i> sp.	3700	3700	1060	2500
KMM 3692	<i>Arthrobacter</i> sp.	19560	19020	62400	7520
KMM 3704	<i>Arthrobacter</i> sp.	13650	14600	32600	5000
KMM 3707	<i>Arthrobacter</i> sp.	12450	9900	10000	4200
KMM 3708	<i>Arthrobacter</i> sp.	12650	11500	10300	4200
KMM 3710	<i>Arthrobacter</i> sp.	2700	1900	3250	850
KMM 3711	<i>Arthrobacter</i> sp.	2600	2200	3600	1000
KMM 3723	<i>Arthrobacter</i> sp.	19000	20000	71000	10450
KMM 3724	<i>Arthrobacter</i> sp.	29400	33500	11300	5100
KMM 3572	<i>Bacillus</i> sp.	3600	2250	3000	300
KMM 3573	<i>Bacillus</i> sp.	4500	1850	2900	900
KMM 3713	<i>Bacillus</i> sp.	2900	1500	1600	300
KMM 3691	<i>Corynebacterium</i> sp.	59000	55100	115250	16660
KMM 3699	<i>Corynebacterium</i> sp.	34570	20000	90640	5000
KMM 3700	<i>Corynebacterium</i> sp.	46650	29100	143000	12100
KMM 3701	<i>Corynebacterium</i> sp.	257000	136300	13000	3650
KMM 3722	<i>Corynebacterium</i> sp.	117000	114300	249600	59800
KMM 3716	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	720	1600	650	300
KMM 3717	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	950	600	2600	50

Продолжение табл. 1.

KMM 3718	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	500	900	1550	550
KMM 3719	<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	770	450	1000	1000
ATCC 27118 ¹	<i>Marinomonas communis</i>	1750	1000	2350	150
KMM 3693	<i>Pseudomonas</i> sp.	2300	2300	3600	2750
KMM 3694	<i>Pseudomonas</i> sp.	2960	820	3650	2850
KMM 3695	<i>Pseudomonas</i> sp.	2750	1500	59400	15660
KMM 3712	<i>Pseudomonas</i> sp.	2200	1300	500	600
KMM 3715	<i>Pseudomonas</i> sp.	1400	1100	2700	400
KMM 3720	<i>Pseudomonas</i> sp.	1430	700	1800	500
KMM 3721	<i>Pseudomonas</i> sp.	1350	650	1650	550
KMM 3725	<i>Pseudomonas</i> sp.	1500	1900	2500	1600
KMM 232	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	11800	11800	39600	8000
KMM 3568	<i>Pseudoalteromonas/ Alteromonas</i>	3800	3400	3800	1400
NCIMB 2033 ²	<i>Pseudoalteromonas aurantia</i>	45200	42900	118600	11800
KMM 213	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	16000	16900	9000	8200
KMM 223	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	5700	6000	20500	3100
KMM 636	<i>Pseudoalteromonas maricaloris</i>	1700	1150	4000	3000
KMM 253	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	46000	45000	266000	30000
KMM 500	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	45000	45000	167000	13400
KMM 215	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	22800	16600	63400	7000
KMM 3702	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	3000	3300	415000	24200
KMM 3574	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	1500	1900	2850	1300
KMM 3570	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	1900	2100	3450	1500
KMM 3688	<i>Rhodococcus</i> sp.	7100	4050	4800	4500
KMM 3696	<i>Xanthobacter</i> sp.	2750	7900	17900	2500
KMM 3697	<i>Xanthobacter</i> sp.	6700	5300	43300	4800
KMM 3698	<i>Xanthobacter</i> sp.	3700	3200	12150	3300
KMM 3703	<i>Xanthobacter</i> sp.	9600	9200	33280	9800
KMM 3705	<i>Xanthobacter</i> sp.	8060	9000	18000	2500
KMM 3706	<i>Xanthobacter</i> sp.	9250	8950	26500	4200
KMM 3709	<i>Xanthobacter</i> sp.	6000	7700	9050	4200
KMM 3714	<i>Xanthobacter</i> sp.	8500	8100	26100	3800

В таблице приведены средние значения четырех независимых измерений ($P < 0,05$).

¹ - За 1 ед. принимали количество радиоактивности (имп/мин), включившейся в клетки бактерий в 1 мл суспензии.

² - Американская коллекция типовых культур, США;

³ - Национальная коллекция промышленных и морских бактерий, Великобритания;

* - Общее включение [³H]-тимидина или уридина в нуклеиновые кислоты.

** - Включение метки из нуклеозидов в ДНК.

Как видно из таблицы, все исследованные штаммы микроорганизмов способны включать радиоактивно меченные экзогенные предшественники в состав нуклеиновых кислот клеток.

Экзогенный тимидин с высокой скоростью включался в состав биополимеров клеток штаммов *Arthrobacter* sp. KMM 3687, *Arthrobacter* sp. 3724, *Corynebacterium* spp. KMM 3691, 3699-3701, 3722, *Pseudoalteromonas aurantia*.

Меченный тритием уридин эффективно включался в клетки штаммов *Arthrobacter* spp. КММ 3684-3687, 3723, *Corynebacterium* spp. КММ 3691, 3699-3701, *Pseudomonas* sp. КММ 3695 и *Pseudoalteromonas aurantia*. Клетки штаммов, у которых наблюдалось эффективное включение тимицина в состав биополимеров, хорошо включали и уридин.

После обработки бактериальных экстрактов 0,5 N KOH в течение 1 часа при 37°C для гидролиза РНК, было обнаружено, что примерно в половине исследованных штаммов родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium/Cytophaga*, *Xanthobacter* и *Marinomonas* метка из радиоактивно меченого тимицина обнаруживается во фракции ДНК, в клетках остальных штаммов часть тритиевой метки включается и в РНК. Исключительно в состав ДНК включали экзогенный тимицин клетки исследованных микроорганизмов КММ 3686, 3689, 3693, 3696, 3702, 3704, 3705, 3706, 3709, 3714, 3718, 3568, 3570, 3723, 3725, 3726. В клетках микроорганизмов родов *Bacillus*, *Rhodococcus* и *Alcaligenes* по сравнению с остальными исследованными штаммами был достаточно высоким процент включения метки из тимицина в состав РНК.

Наиболее интенсивный синтез ДНК с использованием экзогенного тритиевого тимицина осуществлялся в клетках штаммов КММ 3701 и 3722 рода *Corynebacterium*, несколько меньший уровень включения метки в ДНК наблюдался в клетках штаммов КММ 3687, 3691, 3699, 3701, 3724 и NCIMB 2033, принадлежащих к родам *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Pseudoalteromonas*. Включение радиоактивной метки из тимицина в РНК достигает значительного уровня в штаммах КММ 3699-3701 рода *Corynebacterium*.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что все исследованные в данной работе штаммы, относящиеся к 12 родам, включающие и грамположительные (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium* и *Rhodococcus*), и грамотрицательные (*Alcaligenes*, *Alteromonas/Pseudoalteromonas*, *Flavobacterium/Cytophaga*, *Marinomonas*, *Pseudoalteromonas/Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Xanthobacter*) бактерии, способны использовать экзогенные нуклеозиды для биосинтеза нуклеиновых кислот (табл. 1) Это свидетельствует о наличии в исследованных бактериях активного дополнительного (*salvage*) пути биосинтеза предшественников, а также транспортной системы, ответственной за перенос пиrimидиновых нуклеозидов через клеточную мембрану. Различная эффективность включения меченых нуклеозидов клетками разных штаммов может быть обусловлена различиями уровня активности ферментов, ответственных за метаболизм тимицина и уридина в клетках различных штаммов микроорганизмов.

2. Определение активности нуклеозидкиназ в экстрактах морских микроорганизмов

Одним из необходимых факторов, определяющих включение экзогенных предшественников в нуклеиновые кислоты, является их внутриклеточное фосфорилирование до соответствующих рибо- или дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, являющихся субстратами для РНК- или ДНК-полимераз. Поскольку ключевыми ферментами цепи фосфорилирования являются нуклеозидкиназы, катализирующие первый этап превращения нуклеозидов в нуклеозидмонофосфаты, в экстрактах из 46 штаммов морских микроорганизмов была определена активность тимидин- и уридинкиназ, а в 20 штаммах морских бактерий тестирована еще и активность ферментов фосфорилирования дезоксицитидина, аденоцина и гуанозина. Выбор данных штаммов был обусловлен достаточно высокой скоростью включения радиоактивно

меченых тимидина и уридуна в нуклеиновые кислоты микробных клеток, а также их хорошим ростом на используемой питательной среде.

Результаты исследования способности экстрактов ряда штаммов морских бактерий катализировать фосфорилирование *in vitro* тимидина, уридуна, а также дезоксицитидина, аденоцина и гуанозина представлены в табл. 2.

Как видно из таблицы, активность тимидинкиназы обнаруживается во всех исследованных экстрактах, при этом максимальный ее уровень наблюдался в экстрактах штаммов KMM 3697, 3699-3702, 3708, 3568, NCIMB 2033 видов родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Xanthobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudoalteromonas/Alteromonas*. Максимальная активность уридинкиназы проявлялась в экстрактах, полученных из штаммов KMM 3691, 3697, 3699, 3701-3703, 3707 видов родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Xanthobacter*. Следует отметить, что уровень активности фермента, катализирующего фосфорилирование уридуна, был ниже активности тимидинкиназы в исследованных нами микроорганизмах.

В 17 исследованных штаммах, наряду с тимидин- и уридинкиназами активностями, была обнаружена также активность дезоксицитидинкиназы.

Таблица 2. Активность нуклеозидкиназ в экстрактах морских микроорганизмов

Колл. № штамма	Таксон	Акцепторы фосфатных групп				
		dThd	Urd	dCyd	Ado	Guo
1	2	3	4	5	6	7
KMM 3684	<i>Arthrobacter</i> sp.	140±7	11±4,7	7,1±0,1	0	0
KMM 3685	<i>Arthrobacter</i> sp.	146±8,3	24±2,7	7,7±0,3	0	0
KMM 3686	<i>Arthrobacter</i> sp.	100±2	21±0,4	8,3±0,2	0	0
KMM 3687	<i>Arthrobacter</i> sp.	42±0,8	87±3,9	21,7±0,9	0	0
KMM 3692	<i>Arthrobacter</i> sp.	170±21	14±6,7	14,7±0,3	0	23±4,3
KMM 3704	<i>Arthrobacter</i> sp.	198±12	45±12,2	41±6,3	0	17,5±0,8
KMM 3707	<i>Arthrobacter</i> sp.	80±21	110±19	0	75,5±0,7	35±2,9
KMM 3708	<i>Arthrobacter</i> sp.	300±9	65±14	93±4,3	0	30±8,7
KMM 3724	<i>Arthrobacter</i> sp.	95±6	40±17,7	0	105±17	75±18,9
KMM 3691	<i>Corynebacterium</i> sp.	168±28	140±20	7,1±0,7	0	0
KMM 3699	<i>Corynebacterium</i> sp.	280±20	110±6,7	15,3±0,2	7,5±0,7	67,5±1,8
KMM 3700	<i>Corynebacterium</i> sp.	480±29	50±2,9	5±0,7	15,5±0,3	35±0,7
KMM 3701	<i>Corynebacterium</i> sp.	330±13,2	110±4,9	15±1,7	22,5±2	55±6,3
KMM 3722	<i>Corynebacterium</i> sp.	93±20,3	53±11	42±6,7	0	50±6,3
KMM 241	<i>Glaciecola mesophila</i>	120±14	27±10	-	-	-
KMM 227	<i>Idiomarina abyssalis</i>	142±11	56,8±5,3	-	-	-
KMM 254	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	107±18	2,5±0,4	-	-	-
KMM 255	<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	37,5±4,7	3,8±1,3	-	-	-
KMM 3568	<i>Pseudoalteromonas/ Alteromonas</i>	242±24	75±21,7	17±1,7	32,5±1,6	36,5±3,4
NCIMB 2033	<i>Pseudoalteromonas aurantia</i>	310±54	25±7	0	32,5±2	0

Продолжение табл. 2.

1	2	3	4	5	6	7
KMM 216	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	50±8,3	6,3±1,6	-	-	-
KMM 250	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	56,5±6,4	2±0,4	-	-	-
KMM 256	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	68,5±26	4±0,3	-	-	-
KMM 504	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	45±20,7	1±0,9	-	-	-
KMM 638	<i>Pseudoalteromonas distincta</i>	51±8,6	25,5±6,7	-	-	-
KMM 213	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	225±66	19,5±6,9	-	-	-
KMM 214	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	140±19	60±8,3	-	-	-
KMM 223	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	134±20	3,3±0,7	-	-	-
KMM 232	<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	76±17	11,4±0,8	-	-	-
KMM 215	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	330±66	45±6	-	-	-
KMM 217	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	30±32,9	49±15	-	-	-
KMM 218	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	74±17,3	48±7,6	-	-	-
KMM 239	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	193±23	39±14	-	-	-
KMM 253	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	350±39	17,5±1,9	-	-	-
KMM 500	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	310±68	29±12,9	-	-	-
KMM 3702	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	260±18	144±17	22±4,9	0	0
KMM 8	<i>Pseudomonas</i> sp.	101±29	0	-	-	-
KMM 224	<i>Pseudomonas</i> sp.	70±47	0	-	-	-
KMM 226	<i>Pseudomonas</i> sp.	130±17	0	-	-	-
KMM 230	<i>Pseudomonas</i> sp.	145±29	89,3±21	-	-	-
KMM 411	<i>Pseudomonas</i> sp.	360±43	20,5±12	-	-	-
KMM 649	<i>Pseudomonas</i> sp.	60±23,6	40±6,9	-	-	-
KMM 225	<i>Psychrobacter submarinus</i>	91±20,7	0	-	-	-
KMM 3697	<i>Xanthobacter</i> sp.	360±52	129±25	3,3±0,07	0	70±2,9
KMM 3703	<i>Xanthobacter</i> sp.	94±10,9	142±22	90±6,9	0	0
KMM 3706	<i>Xanthobacter</i> sp.	170±49	94±6,3	27±0,15	20,5±0,4	10±2,9

В 12 штаммах морских бактерий была зарегистрирована активность гуанозинкиназы, а в 8 штаммах морских микроорганизмов была обнаружена активность аденоzinкиназы.

Тестирование в клеточных экстрактах активностей нуклеозидкиназ, катализирующих фосфорилирование того или иного предшественника биосинтеза нуклеиновых кислот, не позволяет судить о том, какой именно фермент участвует в этом процессе. Нуклеозидкиназы могут обладать широкой субстратной специфичностью, фосфорилировать преимущественно пуриновые или пиридиновые нуклеозиды, или

же использовать в качестве акцептора фосфата лишь конкретный рибо- или дезоксирибонуклеозид.

3. Анализ спектра нуклеозидкиназ морских бактерий с помощью ионообменной хроматографии

Для определения спектра нуклеозидкиназ, белковые экстракты штаммов морских бактерий, принадлежащих родам *Pseudoalteromonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium/Cytophaga* и *Pseudomonas* подвергли ионообменной хроматографии. Выбранные штаммы эффективно включали меченные тимидин и уридин в нуклеиновые кислоты, активность нуклеозидкиназ в экстрактах была достаточно высока. Во фракциях после DEAE-хроматографии определяли активности тимидин-, уридин- и тимидилаткиназ.

Несмотря на стандартные условия приготовления клеточных экстрактов и условий хроматографии, профили элюции белков, полученные после ионообменной хроматографии экстрактов разных штаммов, значительно отличаются (рис. 3 и 4).

Ионообменная хроматография экстракта штамма *Pseudoalteromonas maricaloris* КММ 636 показала несколько пиков активности тимидин- и тимидилаткиназ, причем в двух из пиков эти активности совпадали (рис. 3А). Ферменты из обнаруженных четырех пиков с различной скоростью осуществляли также фосфорилирование дезоксицитидина, уридуна, аденоцидина и гуанозина. Попытка разделить нуклеозидкиназы этого штамма с помощью фракционирования сульфатом аммония (0-50% и 50-80% насыщения) и последующей ионообменной хроматографии не привела к успеху, поскольку снова было получено несколько пиков активностей ферментов, способных фосфорилировать ряд рибо- и дезоксирибонуклеозидов. Наличие нескольких нуклеозидкиназ, обладающих широкой субстратной специфичностью было обнаружено еще в трех других штаммах рода *Pseudoalteromonas* (КММ 215, 223 и 253), причем ферменты, ответственные за превращение тимидина в его монофосфат, обладали и активностью тимидилаткиназы (рис. 3Б, В и Г).

Ионообменная хроматография препарата, полученного из клеток *Arthrobacter* sp. КММ 3687, вывела наличие трех ферментов, катализирующих фосфорилирование тимидина, уридуна и тимидинмонофосфата (рис. 4А). Элюирование белков экстракта клеток *Pseudomonas* sp. КММ 3694 с DEAE-toyopearl градиентом NaCl позволило разделить активности тимидин-, тимидилат- и уридинкиназ (рис. 4Б).

В экстракте штамма *Corynebacterium* sp. КММ 3701 (рис. 4В) наибольшая активность принадлежала ферменту, ответственному за фосфорилирование тимидинмонофосфата. Фракции, в которых обнаруживались активности тимидин- и уридинкиназы практически совпадали по положению с основным белковым пиком, а уровень активности ферментов фосфорилирования тимидина и уридуна был значительно меньше уровня активности тимидилаткиназы.

Активности трех ферментов фосфорилирования обнаружены после хроматографии экстракта штамма *Bacillus* sp. КММ 3573 (рис. 4Г). Наиболее высока в этом штамме активность уридинкиназы, которая элюируется с ионообменника четырьмя пиками. Активность тимидинкиназы проявляется в виде одного пика, в котором обнаружен и небольшой уровень тимидилаткиназы.

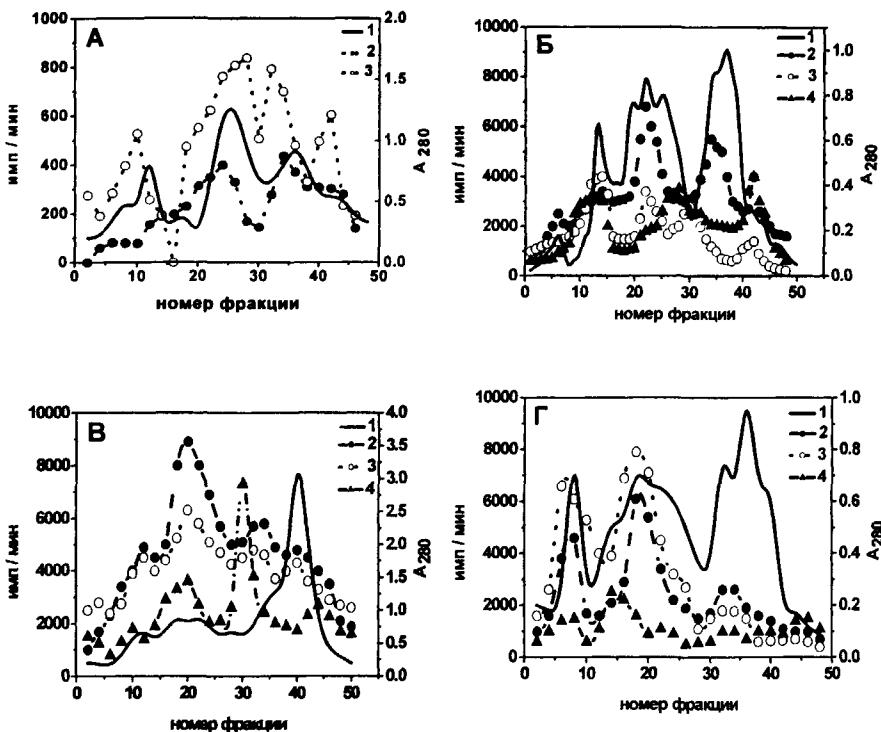


Рис. 3. Ионообменная хроматография ферментов фосфорилирования экстрактов штаммов рода *Pseudoalteromonas*: А – *P. maricaloris* KMM 636, Б - *Pseudoalteromonas* sp. KMM 215, В – *P. haloplanktis* KMM 223, Г - *Pseudoalteromonas* sp. KMM 253 (1 – белок (A₂₈₀), 2 - активность тимидинкиназы, 3 – активность тимидилаткиназы, 4 – активность уридинкиназы).

В процессе хроматографии на ионообменнике разделились активности тимидин- и уридинкиназы штамма *Flavobacterium/Cytophaga* KMM 3717 (рис. 4Д). Тимидилаткиназная активность также была зарегистрирована, хотя ее уровень был невысоким. После ионообменной хроматографии белкового препарата из клеток *Pseudoalteromonas aurantia* NCIMB 2033 (рис. 4Е) обнаружена активность лишь уридинкиназы, хотя в экстрактах данного штамма активность тимидинкиназы присутствовала.

Таким образом, после ионообменной хроматографии активность тимидинкиназы была выявлена во всех анализируемых штаммах морских бактерий, за исключением *Pseudoalteromonas aurantia*.

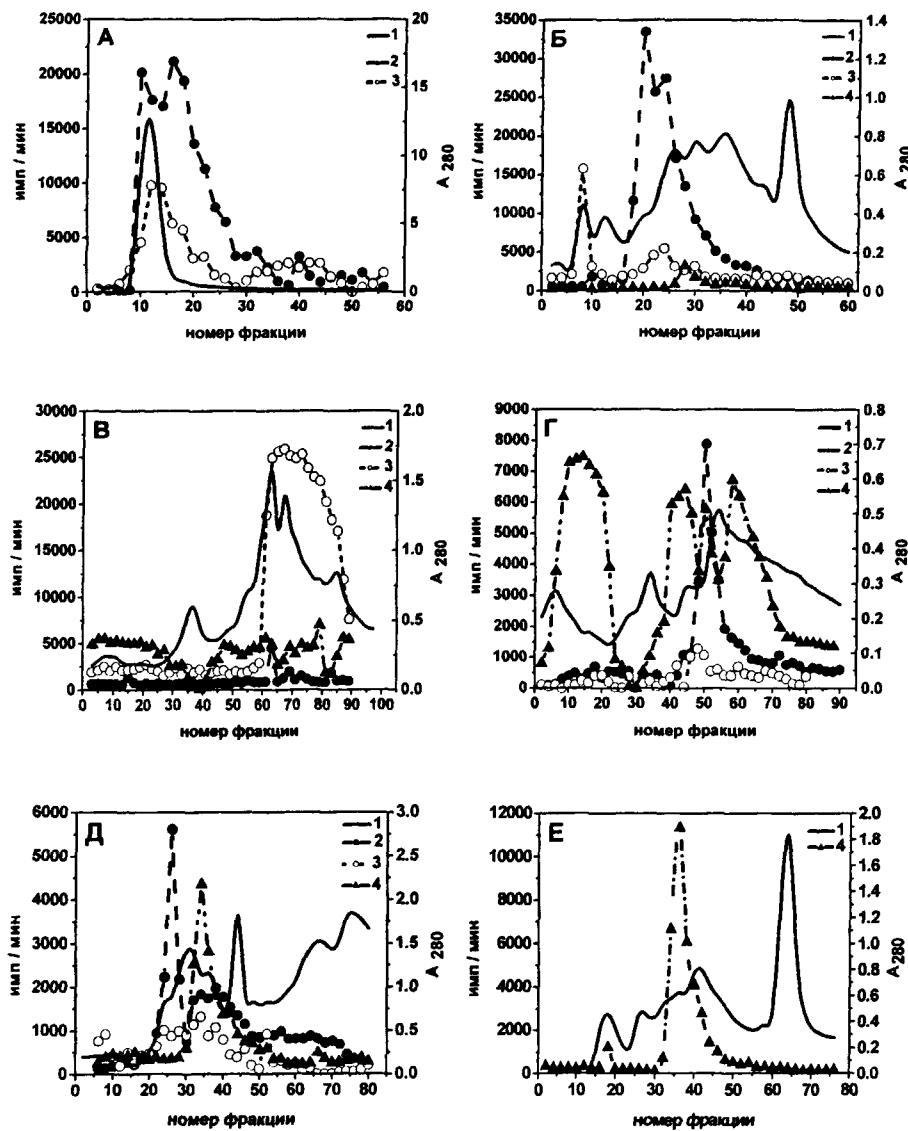


Рис. 4. Ионообменная хроматография ферментов фосфорилирования экстрактов штаммов: А - *Arthrobacter* sp. KMM 3687, Б - штамма *Pseudomonas* sp. KMM 3694, В - *Corynebacterium* sp. KMM 3701, Г - *Bacillus* sp. KMM 3573, Д - *Flavobacterium/Cytophaga* KMM 3717, Е - *Pseudoalteromonas aurantia* NCIMB 2033 (1 – белок (A_{280}), 2 - активность тимидинкиназы, 3 – активность тимидилаткиназы, 4 – активность уридинкиназы).

Активность уридинкиназы обнаружена в четырех штаммах: *Bacillus* sp. KMM 3573, *Flavobacterium/Cytophaga* sp. KMM 3717, *Pseudoalteromonas haloplanktis* KMM 223 и *P. aurantia*, причем в штамме KMM 3573 она выявляется в виде четырех пиков, а у KMM 223 – трех. Активность тимидилаткиназы была четко выражена в таких штаммах как KMM 223, 253, 3687, 3694, 3701 и 636, при этом у штаммов KMM 223 и 636 выявлено четыре пика активности этого фермента.

Исследованные в представленной работе десять штаммов морских бактерий (представители родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium/Cytophaga*, *Pseudoalteromonas* и *Pseudomonas*) являются весьма гетерогенными по содержанию и уровню активности ферментов фосфорилирования нуклеозидов. Интересной особенностью некоторых штаммов микроорганизмов является наличие нескольких форм нуклеозидкиназ – тимидин- и тимидилаткиназ штаммов рода *Pseudoalteromonas* KMM 215, 223, 253 и 636 и уридинкиназ штаммов *Bacillus* sp. KMM 3573 и *Pseudoalteromonas haloplanktis* KMM 223.

Можно предположить, что присутствие нескольких пиков с активностью одной и той же нуклеозидкиназы обусловлено наличием нескольких изоформ ферментов, которые могут отличаться друг от друга, как по физико-химическим свойствам, так и по субстратной специфичности. Примеры такого рода изоформ тимидинкиназы с разными изоэлектрическими точками показаны для *Phisarum polycerphalum*. Уридинкиназа может также существовать и в различных агрегатных состояниях от мономера до десятков субъединиц.

Совпадение пиков активностей тимидин- и тимидилаткиназ в клетках штаммов рода *Pseudoalteromonas* KMM 215, 223, 253 и 636, штаммов *Arthrobacter* sp. KMM 3687 и *Corynebacterium* sp. KMM 3701 позволяет предположить, что ферменты этих бактерий, катализирующие фосфорилирование тимидина, могут отвечать и за дальнейшее фосфорилирование тимидинмонофосфата, образующегося в результате этой реакции. В других штаммах эти активности разделяются в процессе ионообменной хроматографии.

4. Свойства нуклеозидкиназ

Для препаратов нуклеозидкиназ, полученных в результате ионообменной хроматографии, были определены оптимальные условия протекания катализируемых ими реакций. В табл. 3 приведен ряд физико-химических свойств исследуемых ферментов из шести штаммов морских бактерий. Оптимум pH всех этих ферментов находится в области pH 8-9. Для проявления активности тимидин-, тимидилат- и уридинкиназ требуется присутствие ионов Mg^{2+} , которые частично могут быть заменены ионами Mn^{2+} . В качестве донора фосфатных групп используется ATP, причем оптимальная его концентрация в инкубационной смеси различается в зависимости от используемого акцептора фосфата и источника выделения ферmenta. Соли одновалентных металлов NaCl и KCl в концентрации до 100 mM практически не влияли на активность всех выделенных ферментов, за исключением уридинкиназы *Pseudoalteromonas aurantia*, активность которой снижалась вдвое при этой концентрации.

Специфичность нуклеозидкиназ из разных штаммов микроорганизмов в отношении акцептора фосфата значительно варьирует. Нуклеозидкиназы, обнаруженные в клетках *Pseudoalteromonas maricaloris* KMM 636, не обладали строгой субстратной специфичностью и катализировали фосфорилирование не только тимидина и TMP, но и с разной эффективностью переносили фосфатные группы от ATP на тириновые и пиримидиновые рибо- и дезоксирибонуклеозиды. Тимидилаткиназа из

Pseudomonas sp. KMM 3694 катализировала фосфорилирование только TMP, но не тимидина. Пиримидиновые нуклеозидмоно- и -трифосфаты (TMP, UMP, TTP и UTP) не оказывали влияния на активность этой нуклеотидкиназы.

Активности тимидин- и уридинкиназ, обнаруженных в *Bacillus* sp. KMM 3573 и *Flavobacterium/Cytophaga* KMM 3717 не изменялись при добавлении в инкубационную среду рибо- и дезоксирибонуклеозидов, а также TTP, UTP, dCTP и CTP. Хотя активность уридинкиназы *Flavobacterium/Cytophaga* KMM 3717, ингибиравалась при добавлении UMP, являющегося продуктом реакции фосфорилирования уридина, пиримидиновые рибо- и дезоксирибонуклеозидмонофосфаты (TMP, UMP, dCMP и CMP) не оказывали ингибирующего действия на тимидинкиназу из этого же источника.

5. Выделение нуклеозидкиназ клеток морских микроорганизмов

Из клеток морских бактерий *Pseudomonas* sp. KMM 3694 и *Pseudoalteromonas aurantia* NCIMB 2033 были очищены тимидин- и уридинкиназа, соответственно. Выбор этих штаммов обусловлен достаточно высокой скоростью роста микроорганизмов, способностью включать экзогенные нуклеозиды в состав нукleinовых кислот, наличием активности нуклеозидкиназ в экстрактах бактериальных клеток. В процессе ионообменной хроматографии не наблюдалось перекрывания фракций, проявляющих активности тимидин-, тимидилат- и уридинкиназ.

Были разработаны схемы выделения нуклеозидкиназ из этих двух штаммов микроорганизмов и определены их физико-химические свойства.

5.1. Выделение и изучение физико-химических свойств тимидинкиназы штамма *Pseudomonas* sp. KMM 3694

Ионообменная хроматография экстракта клеток *Pseudomonas* sp. KMM 3694 позволила разделить активности тимидин-, тимидилат- и уридинкиназ (рис. 4Б). Была разработана схема выделения тимидинкиназы из этого штамма (табл. 3).

Таблица 3. Очистка тимидинкиназы штамма *Pseudomonas* sp. KMM 3694

Стадия очистки	Белок, мг	Удельная активность, ед./мг белка	Общая активность, ед.	Степень очистки	Выход, %
1. Экстракт	2520				
2. 80 % насыщения сульфатом аммония	1819	60	109140	1	100
3. Хроматография на DEAE-toyopearl	75	1440	90586	24	83
4. Хроматография на оксиапатите	15,2	7200	66575	120	61
5. Гель-фильтрация на TSK-GEL-Toyopearl HW-60	4,8	22980	38199	383	35

За ед. принимали образование 1 нмоля тимидинмонофосфата на 1 мг белка бактериального экстракта за 1 мин при 37°C.

С помощью очистки на ионообменном сорбенте был получен препарат тимидинкиназы с удельной активностью 1440 ед./мг белка. Эта стадия очистки являлась

наиболее эффективной и позволила одноступенно очистить фермент в 24 раза с довольно высоким выходом. При дальнейшей очистке стабильность фермента резко снижалась, и после гель-фильтрации тимидинкиназы при 4°C в течение суток инактивировалась.

Приведенная схема очистки позволила получить электрофоретически чистый препарат тимидинкиназы *Pseudomonas* sp. KMM 3694 очищенной в 383 раза с выходом 35 % и удельной активностью 22980 ед./мг белка. Молекулярная масса тимидинкиназы, определенная методом гель-фильтрации на TSK-GEL-Toyopearl HW-60, составила ~130 кДа. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле показал одну полосу с молекулярной массой ~75 кДа. Вероятно, тимидинкиназа *Pseudomonas* sp. KMM 3694 состоит из двух одинаковых субъединиц.

Максимальная скорость реакции фосфорилирования, катализируемой тимидинкиназой штамма *Pseudomonas* sp., наблюдается при pH 8,5 в трис-HCl буфере, 1 mM ATP и 10-15 mM Mg²⁺. Эффективность ионов Mn²⁺ в этой реакции очень низка. Соли одновалентных металлов (NaCl, KCl) в концентрации до 100 mM не ингибируют активность тимидинкиназы.

Тимидинкиназа штамма *Pseudomonas* sp. KMM 3694 переносит фосфатную группу от ATP на тимидин и не способна катализировать дальнейшее фосфорилирование образующегося TMP, а также уридулина.

Тимидинкиназы из некоторых источников ингибируются по типу обратной связи TTP, являющимся конечным продуктом цепи фосфорилирования тимидина. Пirimидиновые нуклеозидтрифосфаты - TTP, а также UTP и CTP не оказывали ингибирующего действия на активность тимидинкиназы *Pseudomonas* sp. KMM 3694.

5.2. Выделение и изучение физико-химических свойств уридинкиназы штамма *Pseudoalteromonas aurantia* NCIMB 2033

Штамм *P. aurantia* эффективно включал экзогенные нуклеозиды в состав нуклеиновых кислот, причем уровень включения уридулина более чем в 2,5 раза превышал включение тимидина. Для этого штамма выявлено предпочтительное включение метки из уридулина в РНК.

Схема выделения уридинкиназы из штамма *P. aurantia* включала фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию на TSK-GEL-Toyopearl HW-60 (табл. 4). В процессе очистки уридинкиназы, как и в случае тимидинкиназы *Pseudomonas* sp. KMM 3694, наиболее эффективной была стадия DEAE-хроматографии. Комбинация методов ионообменной хроматографии и гель-фильтрации позволила получить препарат уридинкиназы, очищенный в 210 раз, с удельной активностью 882 ед./мг белка и с выходом 30%.

Молекулярная масса уридинкиназы штамма *Pseudoalteromonas aurantia*, определенная с помощью гель-фильтрации, составила ~160 кДа. После электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия уридинкиназа обнаруживалась в виде двух полос с молекулярной массой 90 кДа и 30 кДа.

Максимальная скорость реакции фосфорилирования уридулина, осуществляющейся уридинкиназой *P. aurantia*, наблюдается при pH 8,0 в трис-HCl буфере и при pH 9,0 в глицине-NaOH, 5 mM ATP и 1 mM Mg²⁺, который может замещаться ионами Mn²⁺ с максимумом при 2-5 mM.

Соли одновалентных металлов NaCl и KCl в концентрации 100 mM ингибируют активность уридинкиназы из штамма *P. aurantia* на 50%. Реагент на сульфидрильные группы N-этилмалеимид ингибирует активность уридинкиназы на 80% при

концентрации 1 mM, что свидетельствует о присутствии в белковой макромолекуле уридинкиназы *P. aurantia* SH-групп.

Таблица 4. Очистка уридинкиназы штамма *Pseudoalteromonas aurantia* NCIMB 2033

Стадия очистки	Белок, мг	Удельная активность, ед./мг белка	Общая активность, ед.	Степень очистки	Выход, %
1. Экстракт	9552				
2. 80 % насыщения сульфатом аммония	1365	4,2	5733	1	100
3. Хроматография на DEAE-toyopearl	32,1	143	4589	34	80
4. Рехроматография на DEAE-toyopearl	23,7	174	4123	41	72
5. Гель-фильтрация на TSK-GEL-Toyopearl HW-60	1,94	882	1711	210	30

За ед. принимали образование 1 нмоля уридинмонофосфата на 1 мг белка бактериального экстрактаза 1 мин при 37°C.

В качестве наиболее эффективного донора фосфатных групп уридинкиназа *P. aurantia* использует dGTP, с меньшей эффективностью переносит на уридин фосфатные группы от GTP и ATP. Остальные рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты не используются в реакции, катализируемой выделенной уридинкиназой.

Уридинкиназа *P. aurantia* катализирует фосфорилирование уридина и не использует в качестве акцептора фосфатных групп тимидин. Добавление в реакционную смесь пиrimидиновых нуклеозидов (тимидин и дезоксицитидин) незначительно снижает эффективность работы фермента, тогда как пуриновые рибо- и дезоксирибонуклеозиды практически не влияют на фосфорилирование уридина.

Продукт реакции фосфорилирования уридина, UMP, а также TMP, CMP и dCMP не влияют на активность уридинкиназы *P. aurantia*, но UTP, конечный продукт цепи фосфорилирования уридинкиназой ингибитирует ее активность. Аналогичное влияние на активность уридинкиназы *Pseudoalteromonas aurantia* оказывает и CTP. Пиrimидиновые дезоксинуклеозидтрифосфаты (TTP и dCTP) ингибируют реакцию фосфорилирования уридина в меньшей степени.

5.3. Нуклеозидкиназы бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*

Традиционно считалось, что патогенные бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* "наземного" происхождения и морская среда для них не характерна. Однако в настоящее время имеются сведения о выделении разных видов бактерий рода *Yersinia* из морских животных и морской воды (Тимченко и др., 2004). Авторы также показали, что эти бактерии могут свободно существовать в морской воде в течение длительного времени и вызывать инфекционные заболевания у морских животных. Биологические аспекты существования *Y. pseudotuberculosis* хорошо изучены (Сомов и др., 1991; Тимченко и др., 2004), однако биосинтез нукleinовых кислот в клетках *Y. pseudotuberculosis* и ферменты, связанные с этим процессом, в литературе не описаны. В связи с этим большой интерес представляют исследования биосинтеза нукleinовых кислот и их предшественников у этой патогенной бактерии, обитающей как на суше, так

и в морской среде, а также сравнительный анализ состава и свойств ключевых ферментов фосфорилирования экзогенных предшественников у "истинно" морских бактерий и *Y. pseudotuberculosis*.

Ранее было показано, что бактерии *Y. pseudotuberculosis* способны включать экзогенные тимидин и уридин в ДНК и РНК этого микроорганизма (Кузнецов и др., 2000). В представленной работе описаны результаты выделения, очистки и исследования ряда физико-химических свойств нуклеозидкиназы, катализирующей фосфорилирование тимидина и уридина в клетках *Y. pseudotuberculosis*.

В экстрактах, полученных из клеток *Y. pseudotuberculosis*, была определена активность нуклеозидкиназ, ответственных за фосфорилирование тимидина и уридина. Удельная активность тимидинкиназы составляла 52 пмоль/ 30 мин /мг белка, уровень активности уридинкиназы - 15 пмоль/ 30 мин /мг, был гораздо ниже, чем у тимидинкиназы. Ферменты фосфорилирования нуклеозидов, обнаруженные в белковом экстракте *Y. pseudotuberculosis*, были подвергнуты очистке с помощью фракционирования сульфатом аммония и последующей хроматографии через колонку с DEAE-toyopearl. Из рис. 5 видно, что после хроматографического разделения белкового экстракта во фракциях наблюдалось присутствие активности обеих нуклеозидкиназ.

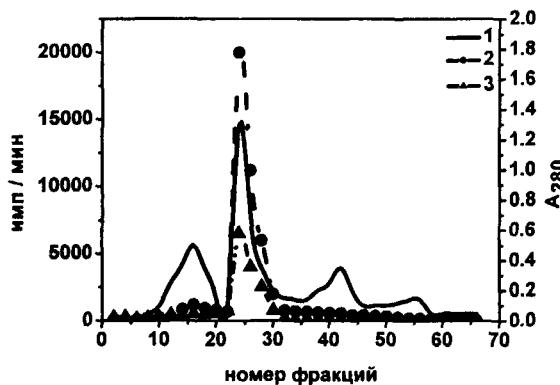


Рис 5. Хроматография на DEAE-toyopearl ферментов фосфорилирования тимидина и уридина штамма *Yersinia pseudotuberculosis*. 1 – белок (A_{280}), 2 – активность тимидинкиназы, 3 – активность уридинкиназы.

В табл. 5 представлены данные по очистке тимидин- и уридинкиназы из клеток *Y. pseudotuberculosis*. Как видно из таблицы, наиболее эффективной стадией в процессе выделения ферментов была ионообменная хроматография, при этом активности тимидин-, и уридинкиназы обнаруживались в одном и том же пике. Несмотря на то, что нуклеозидкиназы не разделились, они были очищены в 67-68 раз. Фракции белка, содержащие активности исследуемых ферментов, были объединены и подвергнуты дополнительной очистке путем фракционирования на колонке с "голубой сефарозой". Как и в результате ионообменной хроматографии на DEAE-toyopearl, активности нуклеозидкиназ после аффинной хроматографии также обнаруживались в одних и тех

же фракциях. Степень очистки составила 303,8 и 309,6 раз, а после диализа – 350 и 356,8 раза, соответственно для тимидинкиназы и уридинкиназы.

Разработанная схема выделения нуклеозидкиназ, включающая фракционирование сульфатом аммония, ионообменную и аффинную хроматографии, не позволила разделить активности тимидин- и уридинкиназы, хотя степень очистки ферментов составила около 350 раз. Активности обеих нуклеозидкиназ после хроматографии обнаруживались в одних и тех же фракциях, и соотношение удельных активностей ферментов, катализирующих фосфорилирование тимидина и уридулина, оставалось практически постоянным на протяжении всех этапов очистки. Это позволило предположить, что обе активности принадлежат одному ферменту.

Таблица 5. Схема очистки тимидин- и уридинкиназы из клеток *Y. pseudotuberculosis*

Стадия очистки	Белок, мг	Удельная активность, ед./мг белка	Общая активность, ед.	Степень очистки	Выход, %
1. Экстракт	4200	52 15*	218400 63000*	1	100
2. Фракция 30-80 % насыщения сульфатом аммония	1550	130 37*	201500 57350*	2,50 2,47*	92,3 91,0*
3. Хроматография на DEAE-toyopearl	50	3510 1032*	175500 51600*	67,5 68,8*	80,3 81,9*
4. Хроматография на голубой сепарозе	5	15795 4644*	78975 23220*	303,8 309,6*	36,2 36,8*
5. Диализ	4,2	18,200 5,353*	76818 22482*	350,0 356,8*	35,2 35,7*

* - данные для уридинкиназы

За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего фосфорилирование 1 пмоль соответствующего нуклеозида за 30 мин инкубации при температуре 37°C.

Очищенный от АТР ферментный препарат был использован для характеристики его физико-химических свойств и субстратной специфичности. Исследование зависимости скорости реакции фосфорилирования тимидина и уридулина, осуществляемой выделенной нуклеозидкиназой, от времени инкубации показало, что ферментный препарат катализирует фосфорилирование тимидина и уридулина линейно в течение около 1,5 часов при 37°C. Выделенный фермент способен осуществлять фосфорилирование тимидина и уридулина также при температуре 6-8°C, однако реакция в этих условиях протекает с низкой скоростью.

Максимальная скорость фосфорилирования тимидина и уридулина, катализируемого нуклеозидкиназой, наблюдается при температуре около 45°C. При повышении температуры инкубации выше 50°C активность нуклеозидкиназы падает. Прединкубация выделенного ферментного препарата в течение 5 часов при 37°C или 1 часа при 45°C не приводила к потере активности.

Нуклеозидкиназа *Y. pseudotuberculosis* катализировала фосфорилирование тимидина и уридулина в интервале pH 7,5-9,0 с максимумом активности при pH 8,0-8,5. Максимальная ферментативная активность наблюдалась в присутствии 0,5-1,0 mM MgCl₂ и 2 mM АТР. Соли KCl или NaCl ингибировали активность нуклеозидкиназы.

Определение свойств выделенной нуклеозидкиназы показало, что оптимальные условия для реакции фосфорилирования и тимидина, и уридина совпадали. Причем во всех случаях скорость фосфорилирования уридина нуклеозидкиназой была ниже, чем при использовании в качестве субстрата тимидина. Все это свидетельствовало в пользу того, что оба нуклеозида фосфорилируются одним и тем же ферментом с различной скоростью. Можно предположить, что выделенная нуклеозидкиназа является неспецифической по отношению к акцепторам фосфатных групп и способна переносить фосфат от АТР и на тимидин, и на уридин. Разница в скорости реакции фосфорилирования двух пиримидиновых нуклеозидов может быть обусловлена различиями в структуре этих соединений, как в углеводном компоненте, так и в нуклеиновом основании.

Исследование специфичности нуклеозидкиназы *Y. pseudotuberculosis* с помощью меченых предшественников показало, что оптимальным субстратом для нее является тимидин, но выделенный фермент способен фосфорилировать также уридин и дезоксицитидин, но не использует в качестве акцептора фосфата тимидинмоноfosфат.

Донором фосфатных групп в реакции фосфорилирования тимидина, катализируемой выделенным ферментом, является АТР, который частично может быть заменен GTP. Другие рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты не поддерживают реакцию фосфорилирования нуклеозидов.

Исследование нуклеозидкиназы *Y. pseudotuberculosis* показало, что первый этап фосфорилирования тимидина и уридуна, являющегося ключевой ступенью для включения их в состав нуклеиновых кислот, катализируется одним ферментом. Различия в скорости фосфорилирования тимидина и уридуна нуклеозидкиназой *Y. pseudotuberculosis* могут влиять на эффективность включения этих предшественников в ДНК и РНК клеток бактерий.

ВЫВОДЫ

- Показано, что клетки исследованных бактерий способны включать экзогенные тимидин и уридин в состав нуклеиновых кислот. Эффективность и специфичность включения каждого из данных предшественников в ДНК или РНК индивидуальна для разных штаммов морских бактерий.
- В экстрактах, полученных из клеток морских прокариот, обнаружены активности ферментов, катализирующих фосфорилирование тимидина, уридуна, дезоксицитидина, гуанозина и аденоцина.
- Определен спектр нуклеозидкиназ, участвующих в фосфорилировании тимидина и уридуна в клетках 10 штаммов морских бактерий, исследованы их свойства и субстратная специфичность.
- Разработаны схемы выделения тимидинкиназы из штамма *Pseudomonas* sp. КММ 3694, уридинкиназы из штамма *Pseudoalteromonas aurantia* и нуклеозидкиназы из *Yersinia pseudotuberculosis*. Определены физико-химические и энзиматические свойства этих ферментов, а так же молекулярная масса и субъединичный состав ферментов фосфорилирования из *Pseudomonas* sp. КММ 3694 и *Pseudoalteromonas aurantia*.
- Показано, что максимальная активность всех очищенных ферментов проявляется в щелочной области pH, для протекания реакции необходимо присутствие в среде ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} и АТР.
- Тимидинкиназа *Pseudomonas* sp. КММ 3694 использует в качестве акцептора фосфата тимидин и не способна катализировать фосфорилирование уридуна, а

также тимидинмонофосфата. Уридинкиназа *Pseudoalteromonas aurantia* катализирует фосфорилирование уридуна, но не тимидина и ингибируется конечным продуктом цепи фосфорилирования уридуна – UTP. В качестве донора фосфата фермент предпочитает dGTP и способен также переносить на уридин фосфатную группу от GTP и ATP. Нуклеозидкиназа *Yersinia pseudotuberculosis* фосфорилирует тимидин, дезоксицитидин и уридин; донором фосфатных групп является ATP, который частично может замещаться GTP.

7. Определена молекулярная масса и субъединичный состав нуклеозидкиназ из *Pseudomonas* sp. KMM 3694 и *Pseudoalteromonas aurantia*.

Основные публикации по теме диссертации

1. Терентьева Н.А., Немцева Ю.А., Шевченко Л.С., Терентьев Л.Л., Михайлов В.В., Рассказов В.А. Поиск высокоактивных продуцентов тимидин- и уридинкиназ среди морских микроорганизмов // Биотехнология. 2002. № 3. С. 3-12.
2. Немцева Ю.А. Биосинтез нуклеиновых кислот в клетках морских микроорганизмов и очистка ферментов фосфорилирования предшественников синтеза ДНК // Фундаментальные исследования морской биоты: биология, химия и биотехнология: Материалы конференции студентов, аспирантов и молодых ученых НОЦ ДВГУ "Морская биота": сб. тез. докл. – Владивосток. 2002. С. 102.
3. Немцева Ю.А., Терентьева Н.А., Терентьев Л.Л., Михайлов В.В., Рассказов В.А. Включение экзогенных предшественников синтеза нуклеиновых кислот в клетки морских микроорганизмов // 3-ий Международный симпозиум "Химия и химическое образование": сб. науч. тр. – Владивосток. 2003. С. 61-62.
4. Немцева Ю.А. Определение скорости синтеза ДНК в клетках морских микроорганизмов с помощью экзогенных предшественников // VII Дальневосточная молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии: сб. тез. докл. – Владивосток. 2003. С. 39.
5. Немцева Ю.А., Терентьева Н.А., Терентьев Л.Л., Шевченко Л.С., Михайлов В.В., Рассказов В.А. Выделение и характеристика нуклеозидкиназ морских бактерий // Региональная научная конференция "Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии": сб. тез. докл. – Владивосток. 2004. С. 73.
6. Немцева Ю.А., Тимченко Н.Ф. Нуклеозидкиназа из *Yersinia pseudotuberculosis* // IV Научно-практическая конференция "Инфекционная патология в Приморском крае": сб. тез. докл. – Владивосток. 2004. С. 15-16.
7. Немцева Ю.А., Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Терентьев Л.Л., Рассказов В.А. Нуклеозидкиназа из *Yersinia pseudotuberculosis* // ЖМЭИ. 2005. № 2. С. 78-80.

Соискатель

Немцева Ю.А.

i

j

k

t

i

j

t

i

j

k

t

i

j

k

t

i

j

k

t

РНБ Русский фонд

2007-4

6712

Немцева Юлия Александровна

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В БИОСИНТЕЗЕ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ФЕРМЕНТЫ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ
НУКЛЕОЗИДОВ В КЛЕТКАХ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ

АВТОРЕФЕРАТ

ЗАО “Фартоп”

г. Владивосток, ул. Алеутская, 28

Тираж 100 экз.

Отпечатано 9 ноября 2005 г.

29 ДЕК 2005