

УДК 577.152.6:579.222

С. Г. Каракіс, ст. наук. співроб., **Т. І. Лавренюк**, мол. наук. співроб.,
О. Г. Драгоєва, мол. наук. співроб., **В. А. Сагаріц**, наук. співроб.,
Л. М. Карпов, д-р біол. наук, зав. кафедри
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра фізіології людини та тварин,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ОСОБЛИВОСТІ РЕГУЛЯЦІЇ ГЛУТАМІНСИНТЕТАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У МУТАНТНИХ ШТАМІВ *SPIRULINA* *PLATENSIS* З НАДСИНТЕЗОМ МЕТІОНІНУ

Ферментативна активність глутамінсинтетази (ГС, глутамат: аміак лігаза, АДФ; КФ 6.3.1.2) була визначена в клітинах батьківського штаму дикого типу (ДТ) та штамів *Spirulina platensis* 30Б та 198Б, отриманих на різних етапах селекції штамів з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі. Вивчено вплив амінокислот на ГС-активність вищезгаданих штамів *in vitro*. Висловлено припущення, що значне підвищення цієї активності та зміни в її регуляції шляхом інгібування амінокислотами аспарагінової родини є одним із проявів мутацій, що мають відношення до шляхів біосинтезу метіоніну.

Ключові слова: *Spirulina*, мутанти, надсинтез метіоніну, глутамінсинтетаза, регуляція.

Ціанобактерії вважаються перспективними об'єктами фотоавтотрофних біотехнологій [1]. Однак, у даний час, незважаючи на зусилля вчених, серед ціанобактерій не селектовано промислових штамів-продуцентів вільних амінокислот. Тому вивчення особливостей метаболізму мутантів ціанобактерій, здатних до надсинтезу амінокислот, дуже важливе як для розуміння особливостей метаболізму ціанобактерій та механізмів його контролю, так і для селекції згаданих штамів-продуцентів.

Раніше нами опубліковано дані про селекцію мутантних штамів *Spirulina platensis*, стійких до *DL*-етіоніну — аналогу метіоніну, які були здатні до надсинтезу метіоніну та накопичували його в біомасі [2]. Кращий серед них мутантний штам 198Б був отриманий із штаму дикого типу (ДТ) *Sp. platensis* за допомогою нітрозогуанідинового мутагенезу внаслідок декількох етапів селекції на стійкість до *DL*-етіоніну. Вміст метіоніну в біомасі штаму 198Б був вищим, ніж у ДТ, в 2,2 рази, а за сумою амінокислот — в 1,6 рази. Надсинтез метіоніну у мутантних штамів як на проміжних, так і на кінцевому етапах селекції завжди супроводжувався надсинтезом майже всіх інших амінокислот, проте вміст метіоніну в загальній сукупності амінокислот підвищувався тільки у мутантів, отриманих після всіх стадій добору. На основі цього було вислов-

лено припущення, що мутанти з надсинтезом метіоніну мають генетично детерміновані порушення центрального метаболізму, які призводять до підвищення асиміляції неорганічного азоту в органічні азотовміщуючі сполуки, і що ці порушення є необхідною умовою для існування мутантів з мутаціями в шляхах біосинтезу метіоніну.

Із праць К. Охморі та М. Охморі [3] відомо, що у *Sp. platensis* більша частка NH_4^- асимілюється шляхом послідовних реакцій, що каталізуються глутамінсинтезазою (ГС, глутамат: аміак лігаза, АДФ; КФ 6.3.1.2) та глутаматсинтазою (ГОГАТ, глутамін: α -оксодугларат-аміотрансфераза, КФ 1.4.7.1), і лише незначна частка NH_4^- асимілюється з участю аланіндегідрогенази. Глутаматдегідрогеназа участі в асиміляції NH_4^+ у *Sp. platensis* не приймає, а провідну роль у асиміляції NH_4^- у циклі ГС-ГОГАТ відіграє глутамінсинтезаза. Із даних літератури відомо, що у *Sp. platensis* активність ГС регулюється шляхом інгібування амінокислотами та нуклеотидами, а також внутрішньоклітинним рівнем декількох двовалентних катіонів [4, 5]. Оскільки у штамів 30Б та 198Б загальний рівень амінокислот підвищувався на 15–20%, нами висловлено припущення, що мутанти *Sp. platensis*, здатні до надсинтезу метіоніну, мають підвищену активність ГС та певні зрушення в механізмах регуляції цього ферменту з допомогою амінокислот.

Мета даної роботи — порівняти рівні глутамінсинтезної активності в клітинах *Sp. platensis* вихідного штаму дикого типу та мутантних штамів 30Б та 198Б, здатних до надсинтезу метіоніну і отриманих на різних етапах селекції, а також з'ясувати вплив амінокислот на глутамінсинтезну активність цих штамів *in vitro*.

Матеріали та методи досліджень

В роботі використовували штами ціанобактерії *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl.: штам дикого типу Моїсе (ДТ) із колекції культур ціанобактерій Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова та мутантні штами, отримані шляхом селекції на ознаку надсинтезу метіоніну, а саме — штам 30Б, отриманий на проміжному етапі селекції, у якого вміст метіоніну у біомасі був на 27% вищим, ніж у штаму ДТ, та штам 198Б, отриманий в кінці селекції, у якого вміст метіоніну у біомасі виявився в 2,2 рази вищим, ніж у штаму ДТ [2].

Для росту та розмноження бактерій використовували середовище Зарука [6].

Культури вирощували в умовах періодичного культивування при температурі 30°C, освітленні 4 клк та барботуванні повітрям.

Активність ГС вивчали в клітинах, відібраних в пізню логарифмічну фазу росту за одним із варіантів методики Шапіро і Штадмана (трансферазний тест), як описано в [7]. При цьому викори-

стовували неуражені клітини, проникність яких для реагентів забезпечували шляхом їх обробки бромідом гексадецилтриметиламо- нію.

Вміст білка у суспензіях ціанобактерій визначали за методом Лоурі з деякими модифікаціями [8].

Результати дослідження

На рис. 1 наведені результати визначення глутамінсинтезної активності в клітинах штаму ДТ та штамів з надсинтезом метіо- ніну, отриманих на різних етапах селекції. Ці дані свідчать, що у проміжного штаму 30Б ГС-активність вища, ніж у штаму ДТ у 2 рази, а у штаму 198Б — у 4 рази.

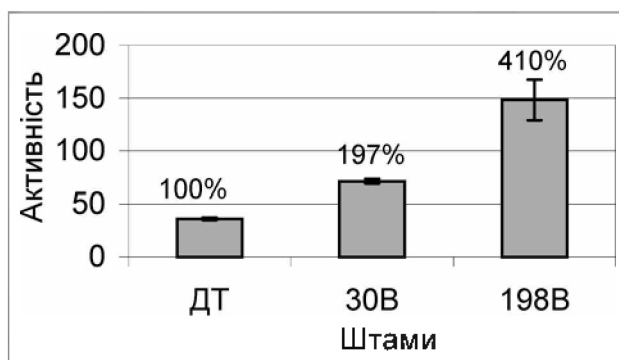


Рис. 1. Глутамінсинтезна активність у клітинах штамів *Arthrospira (Spirulina) platensis* (нмоль γ -глутамілгідроксамату/мг білка \times хв)

Отже, на основі наведених вище даних можна прийти до припу- щення, що підвищення загальної амінокислотної продукції у шта- му 30Б на 15% та у штаму 198Б — на 20% у порівнянні з ба- тьківським штамом ДТ [2] є наслідком значного підвищення ГС-активності в клітинах цих штамів.

Враховуючи вже відомий факт, що в регуляції активності ГС у *Sp. platensis* приймають участь амінокислоти [5], а також те, що у досліджуваних мутантних штамів 30Б та 198Б встановлено значне підвищення внутрішньоклітинного пулу вільних амінокислот у порівнянні з батьківським штамом ДТ [2], ми вивчили вплив де- яких амінокислот на ГС-активність штамів 30Б, 198Б та ДТ *in vitro*. В експерименті використовували амінокислоти аспартатної родини — метіонін, лізин, ізолейцин, треонін та амінокислоти ала- нін, гліцин, серин, аспартат, сильна інгібуюча дія котрих на ГС із *Sp. platensis* була вже раніше встановлена в роботах Данг Хоанг Фиок Хьена із співавторами [5]. Особлива увага до дії амінокислот аспарагінової родини на ГС-активність була пов'язана з тим, що

мутантні штами 30Б та 198Б були отримані шляхом селекції штамів з підвищеним синтезом метіоніну на стійкість до DL-етіоніну — аналогу метіоніну [2]. Результати дослідження змін ГС-активності під впливом амінокислот у штамів 30Б, 198Б та ДТ представлені у табл. 1.

Таблиця 1

Вплив амінокислот на глутамінсинтезну активність різних штамів *Spirulina platensis* (in vitro)

Амінокислота (5 мМ)	Глутамінсинтезна активність (% від контролю)		
	Дикий тип	30Б	198Б
Контроль*	100	100	100
met	68,2±4,1	92,7±2,4	121,7±8,6
thr	63,1±4,7	93,3±2,1	164,1±2,4
ile	65,7±5,2	101,4±3,7	127,5±16,5
lys	66,2±2,8	103,1±1,5	92,7±12,0
asp	58,7±9,1	61,3±2,9	77,8±7,4
gly	43,2±3,0	46,9±0,7	45,9±3,5
ala	26,5±5,8	22,5±2,0	13,3±0,7
ser	38,9±6,9	77,9±6,3	51,2±2,5

* — контроль — вихідна глутамінсинтезна активність без додавання амінокислот

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що максимальну інгібуючу дію на глутамінсинтезну активність штаму ДТ виявляють аланін, серин, гліцин та аспарагінова кислота. В концентрації 5 мМ ці амінокислоти пригнічують глутамінсинтезну активність на 73,5, 61,1, 56,8 та 41,3%, відповідно. Аналогічні результати були отримані в роботі [5]. Метіонін, треонін, ізолейцин та лізин також інгібують глутамінсинтезну активність штаму ДТ, однак у меншій мірі, ніж вище згадані амінокислоти. Ингібуюча дія цих амінокислот становить біля 30%.

Глутамінсинтезна активність штаму 30Б, як і глутамінсинтезна активність штаму ДТ, у найбільшій і майже однаковій мірі інгібуються аланіном, гліцином та аспаратом. Однак, на відміну від штаму ДТ, ГС штаму 30Б частково втратила здібність до інгібуювання серином, метіоніном та треоніном. Ингібуюча дія серину на ГС-активність штаму 30Б становила 22%, а метіоніну і лізину — навіть менше 10%. Треонін та ізолейцин ГС-активність штаму 30Б не інгібували.

ГС-активність штаму 198Б, як і ГС-активність штаму ДТ та штаму 30Б, у найбільшій мірі інгібуються аланіном, гліцином, серином та аспаратом. Однак, на відміну від штамів ДТ та 30Б (попередників), інгібуюча дія аланіну на ГС-активність штаму 198Б більш виражена, а інгібуюча дія аспартату — ослаблена. Ингібуюча дія серину на ГС-активність штаму 198Б значно слабша, ніж на ГС-активність штаму ДТ, однак, сильніша, ніж на ГС-активність

штаму 30Б. Окрім того, ГС штаму 198Б не тільки втратила здібність до інгібування метіоніном, треоніном та ізолейцином, а навпаки, активується цими амінокислотами на 22, 64 и 28%, відповідно. ГС-активність штаму 198Б, як і ГС-активність попереднього штаму 30Б, не зазнає змін під впливом лізину.

Обговорення отриманих результатів

В ході селекції штамів *Sp. platensis* з підвищеним вмістом метіоніну у біомасі нами не було виявлено жодного етіонінрезистентного мутанта, у котрого підвищення вмісту метіоніну не супроводжувалося б підвищенням вмісту майже всіх інших амінокислот. Тільки у мутантів, отриманих на кінцевому етапі селекції, мало місце значне підвищення вмісту метіоніну в сумі амінокислот на фоні загального підвищення пулу останніх [2]. На основі цих даних прийшли до припущення, що надсинтез метіоніну у мутантів проміжних етапів селекції здійснюється завдяки мутаційним змінам, обумовлюючим підвищення синтезу загальних попередників для синтезу амінокислот. У мутантів кінцевого етапу селекції надсинтез метіоніну обумовлюється, крім того, і мутаційними змінами окремих шляхів біосинтезу метіоніну, які ведуть до надсинтезу цієї амінокислоти.

Отже, виживання мутантів з мутаціями, що мають відношення до окремих шляхів біосинтезу метіоніну і призводять до його надсинтезу, можливе лише завдяки особливостям метаболізму цих організмів. Порівняння ГС-активності клітин селектованих штамів *Sp. platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі та штаму ДТ довело, що характерною рисою штаму 198Б є значне підвищення ГС-активності. ГС-активність в клітинах штаму 198Б у 4 рази вища, ніж у вихідного штаму ДТ, і в 2 рази вища, ніж у штаму 30Б, отриманого на проміжному етапі селекції.

Проведені дослідження впливу амінокислот на ГС-активність цих штамів дозволили виявити значні відмінності в регуляції ГС-активності амінокислотами аспарагінової родини. У штаму 30Б була втрачена здатність до інгібування ГС лізином і ізолейцином, а інгібуюча дія треоніну та метіоніну була значно слабшою, ніж у випадку ДТ. У штаму 198Б метіонін, треонін та ізолейцин на тільки не інгібували ГС-активність, а навпаки, здійснювали її активацію; щодо лізину, то він взагалі не впливав на цю активність.

Отже, такі особливості метаболізму клітин штаму 198Б, як суттєве підвищення глутамінсинтезної активності, зміна регуляції ГС-активності від інгібування амінокислотами аспарагінової родини до активації метіоніном, треоніном, ізолейцином та втрата впливу на активність ГС лізином, можливо, є головною умовою існування мутантів з підвищеним вмістом метіоніну в загальному пулі амінокислот.

Висновки

1. Значне підвищення загального вмісту амінокислот у клітинах штамів 30Б та 198Б *Sp. platensis* є наслідком значного зростання ГС-активності в цих клітинах.
2. Втрата клітинами здібності до інгібування ГС-активності амінокислотами аспарагінової родини та надбання здатності до активування ГС-активності метіоніном, треоніном та ізолеїцином можна вважати головною умовою існування мутантів ціанобактерії *Spirulina platensis* з порушеннями шляхів біосинтезу метіоніну.

Література

1. Шестаков С. В. Перспективы использования фототрофных бактерий в биотехнологии // В кн.: Биотехнология, М.: Наука, 1984. — С. 212–215.
2. Селекція мутантних штамів *Spirulina platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі / С. Г. Каракіс, О. Г. Драгоєва, Т. І. Лавренюк, В. А. Сагаріц, Л. М. Карпов // Вісник ОНУ. — 2005. — Т. 10, вип. 3. — С. 55–62.
3. Ohmori K., Ohmori M. Ammonium assimilation in the blue green alga *Spirulina platensis* // Jpn. J. Phycol. — 1988. — Vol. 36. — P. 12–16.
4. Специфичность и регуляция активности глутаминсинтетазы *Spirulina platensis* металлами / Данг Хоанг Фыок Хьен, Н. А. Соловьева, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович // Доклады академии наук СССР. — 1988. — Т. 302, № 4. — С. 984–987.
5. Регуляция активности глутаминсинтетазы *Spirulina platensis* / Данг Хоанг Фыок Хьен, Н. А. Соловьева, З. Г. Евстигнеева, В. Л. Кретович // Биохимия. — 1989. — Т. 54, вып. 2. — С. 292–298.
6. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler. // Ph. D. Thesis, University of Paris. — 1966. — P. 85.
7. Методы общей бактериологии // Под ред. Ф. Герхардта и др. — М.: Мир, 1984. — С. 293–295.
8. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. I. Farr, B. J. Randall // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, № 1. — P. 871–876.

**С. Г. Каракіс, Т. І. Лавренюк, Е. Г. Драгоєва, В. А. Сагаріц,
Л. М. Карпов**

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра физиологии человека и животных,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У МУТАНТНЫХ ШТАММОВ *SPIRILINA PLATENSIS*, ОБЛАДАЮЩИХ СВЕРХСИНТЕЗОМ МЕТИОНИНА

Резюме

Ферментативная активность глутаминсинтетазы (ГС, глутамат: аммиак лигаза, АДФ; КФ 6.3.1.2) была определена в клетках родительского штамма дикого типа, а также штаммов 30Б и 198Б, полученных на разных этапах селекции штаммов *Spirulina platensis* с повышенным содержанием метионина в биомассе. Изучено

влияние аминокислот на ГС-активность вышеупомянутых штаммов *in vitro*. Выказано предположение, что значительное повышение этой активности и изменения ее регуляции путем ингибирования аминокислотами аспарагинового семейства является одним из проявлений мутаций, имеющих отношение к путям биосинтеза метионина.

Ключевые слова: Spirulina, мутанты, сверхсинтез метионина, глутаминсинтетаза, регуляция.

**S. G. Karakis, T. I. Lavrenjuk, E. G. Dragoeva, V. A. Sagaric,
L. M. Karpov**

Odessa Mechnikov National University,
Department of Human and Animals Physiology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**PECULIARITIES OF GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITY
REGULATION IN SPIRULINA PLATENSIS MUTANT STRAINS
WITH METHIONINE SUPER SYNTHESIS**

Summary

Glutamine synthetase activity (GS, EC 6.3.1.2.) has been determined in cells of parental wild strain as well as 30B and 198B strains, received on different stages of *Spirulina platensis* strain selection with elevated content of methionine in biomass. The effect of amino acids on the GS activity from the above mentioned strains has been studied *in vitro*. It was suggested that considerable increasing of GS activity and alteration in its regulation by asparagine family amino acids feedback inhibition is one of the display mutations concerning to specific methionine biosynthetic pathways.

Keywords: Spirulina, mutants, methionine over synthesis, glutamine synthetase, regulation.