

РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ЦИКЛА КРЕБСА И ГЛИОКСИЛАТНОГО ПУТИ В ШТАММАХ *SPHAEROTILUS NATANS* ПРИ ОРГАНО- И МИКСОТРОФНОМ РОСТЕ

Н. В. Селиванова, А. Х. А. Ахмед, М. В. Орлова, С. Е. Климова, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 06.03.2017 г.

Аннотация. Исследована регуляция активности ключевых ферментов ЦТК и ГЦ в *Sphaerotilus natans* при орга-но- и миксотрофном росте. Обнаружена зависимость активности маркерных ферментов глиоксилатного пути и цикла Кребса от типов питания разных штаммов *Sphaerotilus natans*. Проведение ПЦР-анализа в реальном времени позволило выявить профиль экспрессии генов *sdh*, *icl* и *aco*, кодирующих синтез соответствующих энзимов. Анализ полученных результатов позволяет заключить, что изменение активности исследуемых ферментов при трансформации основных метаболических потоков обусловлено синтезом их *de novo*.

Ключевые слова: *Sphaerotilus natans*, штамм, активность, экспрессия, изоцитратлиаза, сукцинатдегидрогеназа

Abstract. Regulation of activity of key enzymes of TCA and GC in *Sphaerotilus natans* under organo- and mixotrophic growth was been investigated. Dependence activity of marker enzymes glyoxylate pathway and the Krebs cycle from types of food from different strains of *Sphaerotilus natans* was installed. Carrying out PCR-real time analysis allowed to reveal a gene expression profile *sdh*, *icl* and *aco* coding synthesis of appropriate enzymes. Analysis of the obtained results allows to conclude that the change in the activity of investigated enzymes in the transformation of the main metabolic fluxes due to synthesis *de novo*.

Keywords: *Sphaerotilus natans*, strain, activity, expression, isocitrate, succinate dehydrogenase

Характерной особенностью метаболических процессов, протекающих в бактериальных организмах, является их разнообразие. Значительное количество научных источников указывает на ферментативную регуляцию скорости метаболических процессов и, в особенности, трансформацию углеводных потоков. Ранее в нашей лаборатории была установлена закономерность для нескольких видов серобактерий, проявляющаяся в переключении анаболических и катаболических процессов в зависимости от органотрофного, миксотрофного или литотрофного роста [1]. Регуляторные особенности ферментов глиок-

силатного цикла и цикла трикарбоновых кислот проявляются не только в интенсификации или замедлении образования новых молекул энзимов, но и в регулировании активности находящихся в клетке ферментов [2].

Особый интерес представляет исследование ферментативной регуляции метаболизма у бактерий *Sphaerotilus natans*, являющихся умеренными термофилами и способными в зависимости от типа питательной среды осуществлять органотрофный или миксотрофный рост [3]. Бактерии *Sphaerotilus natans* штамма Д-507 выделены из природных термальных сероводородных источников. Бактерии штамма Д-380 относятся к мезофилам и являются типичными обитателями антропогенных экосистем, использующих только

органотрофный тип питания [3]. В связи с этим, целью данной работы явилось исследование механизмов экспрессионной регуляции функционирования ферментов цикла Кребса и глиоксилатного пути из штаммов *Sphaerotilus natans* с разным типом метаболизма при органо- и миксотрофном росте.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования были использованы матообразующие бактерии рода *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 и Д-380.

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ, 1.3.99.1) определяли методом, основанным на применении искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [4]. Интенсивность функционирования аконитатгидратазы (АГ, КФ 4.2.1.3) измеряли при длине волны 240 [5]. Определение активности изоцитратлиазы (ИЦЛ, КФ 4.1.3.1) проводили, учитывая разницу экстинкции при $\lambda = 324$ нм комплекса, образующегося после взаимодействия фенилгидразина, присутствующего в реакционной среде, и глиоксилата, образующегося в ходе ферментативной реакции [6].

Для выделения суммарной РНК применяли реагент ExtractRNA («Евроген», Россия).

Обратную транскрипцию мРНК проводили с использованием обратной транскриптазы М-MULV («СибЭнзим», Россия) для синтеза первой цепи кДНК, согласно инструкции производителя.

Подбор праймеров осуществляли на основе нуклеотидных последовательностей генов *sdh*, *icl* и *aco* из *S.natans* с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Праймеры к гену *sdh*: прямой – tccgccagctattctgggttc; обратный – gagctcgtagacgaccttg; к гену *aco*: прямой – gagggctgttatctggtgcg; обратный – ggatcaccatgaagggtctcg; к гену *icl*: прямой – ctggtactgtagcccagcg; обратный – ggtctggagcagctgatcag.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили на приборе Bio-Rad DNA Engine Thermal Cycler Chromo 4 («Bio-Rad», США), используя в качестве красителя SYBR Green I. Задавали следующие параметры амплификации: предварительная денатурация – 95°C 5 мин; детекция, 1 цикл: 95°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 30 с; финальная элонгация – 72°C, 10 мин. Количество матрицы контролировали с помощью параллельной амплификации фактора элонгации EF-1 α с ген-специфичными праймерами. В каче-

стве отрицательного контроля использовали суммарную РНК без этапа обратной транскрипции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе использовался оригинальный объект *Sphaerotilus natans*, способный к органотрофному и миксотрофному росту. Исследовали штамм Д-507, который в зависимости от источника углерода обладал органотрофным типом питания или миксотрофным. В качестве образца органотрофного роста использовали штамм Д-380 исследуемой бактерии. В данной части работы определили активность трех ферментов, обеспечивающих функционирование глиоксилатного пути и цикла Кребса. При этом измерялась активность ферментов, функционирующих только в цикле трикарбонных кислот (сукцинатдегидрогеназа) или в глиоксилатном цикле (изоцитратлиаза), а также фермента «общего» для обоих метаболических путей (аконитаза). Величины активности ферментов у *Sphaerotilus natans* в разных условиях питания и при использовании двух штаммов, отличающихся по типу роста, приведены на рисунке 1.

Изменение уровня активности сукцинатдегидрогеназы, выраженной в Е/мг, мало зависело от типа питания. Наибольшая величина общей сукцинатдегидрогеназной активности характерна для *Sphaerotilus natans* штамм Д-507 при миксотрофном типе питания (рис. 1). Достаточно высокий уровень функционирования этой ферментной системы обнаружен при органотрофном питании у штаммов Д-507 и Д-380. Следует отметить, что данный фермент считается маркерным, то есть функционирующим исключительно в цикле трикарбонных кислот. Поэтому высокие значения

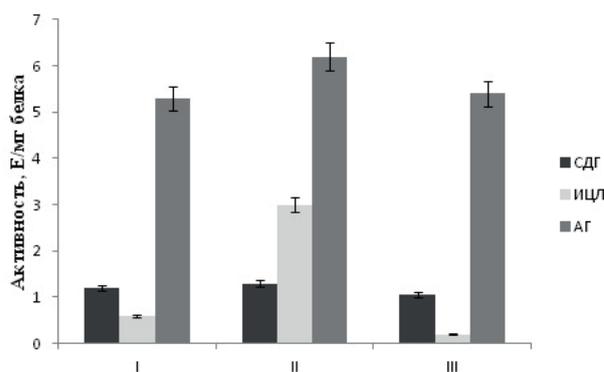


Рис. 1. Величина активности ключевых ферментов *Sphaerotilus natans* при различном типе питания I – органотрофный рост штамма Д-507, II – миксотрофный рост штамма Д-507, III – органотрофный рост штамма Д-380.

его активности могут свидетельствовать об интенсивном функционировании цикла Кребса у всех объектов.

Анализ значений активности маркерного фермента глиоксилатного пути изоцитратлиазы указывает на определенные отличительные особенности. Так, максимальная величина активности данного фермента обнаруживается у штамма Д-507 при миксотрофном питании (рис. 1). Активность ИЦЛ в несколько раз меньше у *Sphaerotilus natans* при органотрофном росте по сравнению с миксотрофным. Анализ полученных результатов может свидетельствовать о функционировании глиоксилатного цикла в бактериях *Sphaerotilus natans* при миксотрофном питании. Ранее сообщалось, что в условиях миксотрофного роста у бактерий штамма Д-507 функционирует тетрамерная форма малатдегидрогеназы, характерная для глиоксилатного цикла [7].

Анализ интенсивности функционирования аконитатгидратазы, участвующей в обеспечении функционирования цикла Кребса и глиоксилатного пути, свидетельствует о значительной величине общей активности аконитазы у всех штаммов бактерий *Sphaerotilus natans* при разных типах питания (рис. 1), однако наибольшая величина этой характеристики обнаружена при миксотрофном росте штамма Д-507.

Для оценки количественных показателей интенсивности работы генов *sdh*, *icl* и *aco* использовали метод ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I. Для этого суммарную РНК, выделенную из бактерий, подвергали обратной транскрипции с целью получения кДНК. Из полученных данных видно, что относительный уровень экспрессии исследуемых генов у всех штаммов бактерий *Sphaerotilus natans* при разных типах питания значительно менялся (рис. 2). Максимальная концентрация транскрипта гена *sdh* наблюдается при миксотрофном росте штамма Д-507 (рис. 2а), что коррелирует с полученными нами данными по активности изучаемого фермента и, вероятно, связано с необходимостью синтеза большого количества фермента *de novo*. Известно, что помимо традиционного участия фермента в функционировании ЦТК и комплекса II ЭТЦ, СДГ осуществляет каталитическое превращение сукцината в глюконогенезе [8], скорее всего увеличение уровня транскрипции данного гена в условиях миксотрофного роста связано именно с синтезом дополнительной формы СДГ.

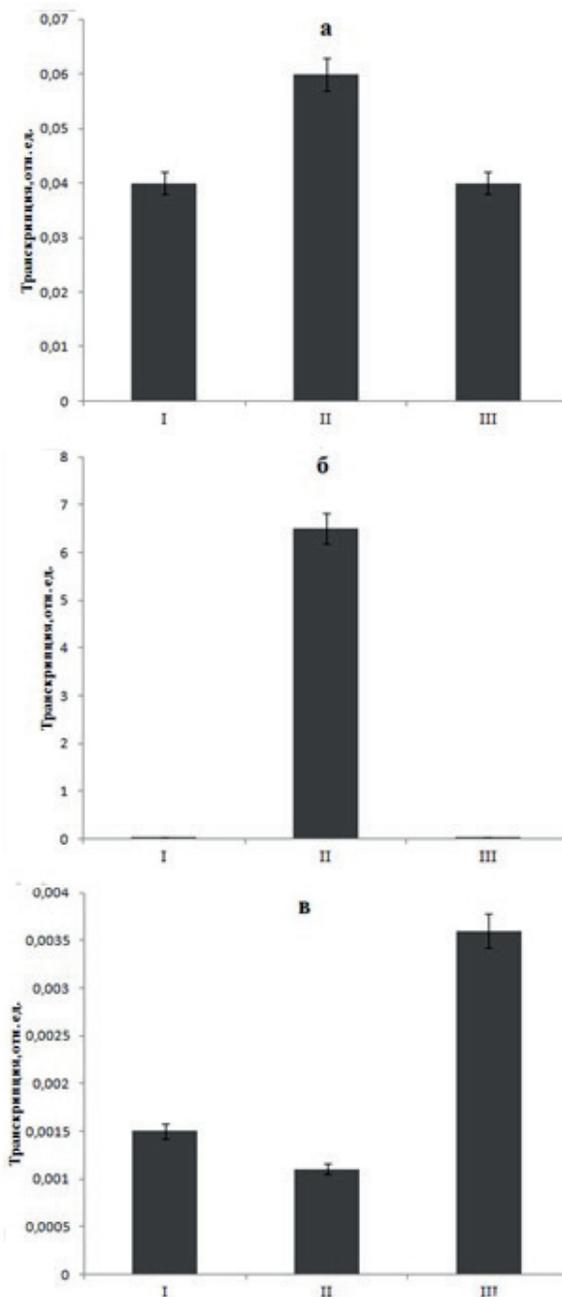


Рис. 2. Относительный уровень транскрипции генов *sdh* (а), *icl* (б) и *aco* (в) при различном типе питания *Sphaerotilus natans* I – органотрофный рост штамма Д-507, II – миксотрофный рост штамма Д-507, III – органотрофный рост штамма Д-380.

Наиболее существенные изменения наблюдаются в скорости работы гена изоцитратлиазы. Количество транскрипта гена *icl* при миксотрофном росте увеличивалось в 150 раз по сравнению с данным показателем при органотрофном питании (рис. 2б). Полученные результаты согласуются со значениями активности данного фермента при разных условиях питания.

Относительный уровень транскрипции гена *aco* у *S. natans* штамма Д-507 оставался приблизительно на одном уровне и при органотрофном и при миксотрофном росте (рис. 2в). Максимальные значения данного показателя наблюдались у штамма Д-380 (экспрессия гена, кодирующего аконитазу, была в 2,4-3 раза больше по сравнению со штаммом Д-507). Анализ полученных данных свидетельствует о значительной величине концентрации транскриптов гена аконитазы у всех штаммов бактерий *Sphaerotilus natans* при разных типах питания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у бактерий *Sphaerotilus natans* выявлен профиль активности маркерных и общих ферментов ЦТК и глиоксилатного цикла при разных типах питания. Анализ полученных данных свидетельствует о переключении метаболических потоков при миксотрофном росте у штамма Д-507. При миксотрофном росте в клетках этих бактерий функционирует глиоксилатный шунт и цикл трикарбоновых кислот. При органотрофном типе питания у штаммов Д-507 и Д-380 функционировал только цикл трикарбоновых кислот.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №14-14-00721-П)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Механизм формирования изоформ малатдегидрогеназы из *Sphaerotilus natans* Д-507 в различных условиях культивирования / А.Т. Епринцев [и др.] // Известия РАН: Серия биологическая. — 2011. — № 4. — С.397-402.
2. Селиванова Н.В. Разработка олигонуклеотидных праймеров к генам НАД-зависимой

Воронежский государственный университет
Селиванова Н. В., кандидат биологических наук, ассистент кафедры биохимии и физиологии клетки
Тел. +7(473)220-88-77,
E-mail: kir2202@yandex.ru

Ахмед А. Х. А., аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки

Орлова М. В., аспирант кафедры биохимии и физиологии клетки,

малатдегидрогеназы кукурузы / Н.В. Селиванова, М.О. Гатауллина, А.Т. Епринцев // Вестник Воронежского государственного университета Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2016. — № 2. — С. 80-89.

3. Экофизиология литотрофных сероокисляющих представителей рода *Sphaerotilus* – обитателей сульфидных источников северного Кавказа / Е.В. Гриднева [и др.] // Микробиология. — 2009. — Т. 78, № 1. — С. 89–97.

4. Епринцев А.Т. Молекулярные аспекты формирования олигомерной структуры сукцинатдегидрогеназы / А.Т. Епринцев, Д.Н. Федорин, Н.В. Селиванова // Воронеж: Центр. Черн. Книжное изд-во, 2016. — 263 с.

5. Епринцев А.Т. Глиоксилатный цикл. Универсальный механизм адаптации? / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, М.Ю. Шевченко // Москва: Академкнига. — 2007. — 231 с.

6. Schnarrenberger C. Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants /C. Schnarrenberger, W. Martin // Eur. J. Biochem. — 2002. — Vol. 269. — P. 868-883.

7. Структурно-функциональная трансформация малатдегидрогеназной системы бактерий *Sphaerotilus* sp. штамм Д-507 при различных типах питания / А. Т. Епринцев [и др.] // Известия РАН: Серия биологическая. — 2009. — № 3. — С. 283-289.

8. Роль дифференциальной экспрессии генов *sdh1-1* и *sdh1-2* в изменении изоферментного состава сукцинатдегидрогеназы в прорастающих семенах кукурузы / А.Т.Епринцев [и др.] // Известия РАН. Серия биологическая. — 2010. — № 3. — С. 324-332.

Voronezh State University
Selivanova N. V., PhD, Assistant Professor, dept. of Biochemistry and Cell Physiology
Ph.: +7(473)220-88-77,
E-mail: kir2202@yandex.ru

Ahmed A. H. A., post-graduate student, Biochemistry and Cell Physiology Department,

Orlova M. V., graduate student of Biochemistry and Cell Physiology Department,

Селиванова Н. В., Ахмед А. Х. А., Орлова М. В., Климова С. Е., Епринцев А. Т.

Климова С. Е., студент кафедры биохимии и физиологии клетки

Епринцев А. Т., доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и физиологии клетки

Klimova S. E., student, Biochemistry and Cell Physiology dept.,

Eprintsev A. T., Doctor of Biological Sciences, Professor, head of the Biochemistry and Cell Physiology Dept.