



УДК 575:579.842.24

К.А.ДАЦЕНКО, А.М.КУЛЬБА, В.А.ПРОКУЛЕВИЧ, А.Н.ЕВТУШЕНКОВ

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *ERWINIA CHRYSANTHEMI*, ДЕФЕКТНЫХ ПО ОБЩИМ КОМПОНЕНТАМ ФЕП-ЗАВИСИМОЙ ФОСФОТРАНСФЕРАЗНОЙ СИСТЕМЫ

We have isolated and partially characterised pts-mutations *Erwinia chrysanthemi*. The defects are pleiotropic and influence virulence of these organisms. The *ptsI*-gene localisation on the genetic map of *Erwinia chrysanthemi* chromosome was determined.

Объектом пристального изучения у фитопатогенных бактерий *Erwinia chrysanthemi* (далее *E. chrysanthemi*) являются механизмы синтеза и секреции внеклеточных ферментов, придающих вирулентные свойства данным микроорганизмам. В настоящее время определены основные закономерности продукции этих ферментов и выявлен ряд факторов, регулирующих их синтез и секрецию [1,2]. Сложность регуляции синтеза внеклеточных ферментов предполагает существование нескольких соответствующих контрольных механизмов.

В качестве одного из таких механизмов может выступать фосфоенолпируват-зависимая углеводспецифичная фосфотрансферазная система (ФТС). Эта система, ответственная за транспорт в бактериальную клетку многих углеводов (глюкозы, фруктозы, маннозы, маннита и других так называемых ФТС-субстратов), состоит из каскада цитоплазматических и мембраносвязанных белков, последовательно передающих на поступающий углевод фосфорную группу, донором которой является фосфоенолпируват (ФЕП) [3,4]. Различают два общих компонента ФТС-фермент I и белок HPr, принимающих участие в утилизации всех (за исключением фруктозы) ФТС-субстратов, и субстрат-специфичные компоненты, ответственные за утилизацию только собственного субстрата [3]. Однако особый интерес представляют регуляторные функции ФТС. От целостности компонентов этой системы зависит выражение эффекта катаболитной репрессии, существование факторов транскрипции, количество и активность одного из важнейших внутриклеточных ферментов-аденилат-циклазы, выражение вирулентности и возможности спорообразования у многих бактериальных видов [4].

Можно предполагать, что выражение вирулентных свойств у бактерий *E. chrysanthemi* также будет зависеть от компонентов ФТС. В настоящей работе приводятся данные по получению pts-мутантов и их первичная характеристика.

Материал и методика

Основные свойства использованных в работе штаммов бактерий и плазмид приведены в табл.1.

Использовались полноценные жидкие и плотные питательные среды Дагестанского НИИ питательных сред и фирмы SIGMA, индикаторная среда МакКонки производства фирмы DIFCO. Приготовление минимальных сред,

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм / плаزمид	Генотип	Источник получения
<i>E. chrysanthemi</i> ENA 49	Дикий тип, прототроф	Коллекция лаборатории молекулярной генетики бактерий, БГУ
<i>E. chrysanthemi</i> 1449	<i>Hfr</i> -подобный донор, <i>F' Lac</i>	—
<i>E. chrysanthemi</i> 1449II	<i>Hfr</i> -подобный донор, <i>F' Lac, ptsH</i>	—
<i>E. chrysanthemi</i> 3766	<i>F' ilv3 thr his trp argE Nal^r Str^r</i>	—
<i>E. chrysanthemi</i> ENA 49/50	<i>ptsI::miniTn5xylE</i>	Получен в данной работе
<i>E. chrysanthemi</i> 169	<i>Hfr</i> -подобный донор, <i>F' Lac, ptsI</i>	—
<i>Escherichia coli</i> LBG 1260	<i>F⁻, trp rpsL ptsI</i> 1103	НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, РАМН, Москва
pULB113 (RP4::miniMu)	<i>Tra⁺Km Ap Tc mini Mu3A</i>	Коллекция лаборатории
pUT::miniTn5KmxylE	<i>Tra⁺mob⁺Ap::Km</i>	—
R'N27	pULB113, содержащая фрагмент хромосомы <i>E. chrysanthemi</i> с <i>ptsI</i> -геном	Получен в данной работе

обработка клеток нитрозогуанидином, бактериальные скрещивания, элиминация плазмид проводились по методикам, приведенным в руководстве Миллера [5]. Для транспозонового мутагенеза использовали плазмиду pUT::miniTn5KmxylE [6]. Применяли коммерческие препараты антибиотиков в соответствующих концентрациях. Пектаплазная активность определялась чашечным способом с использованием полипектата Na, а также спектрофотометрически [2].

Изучение транспорта с использованием меченых углеводов производства "Amersham" и измерение дифференциальной скорости синтеза β -галактозидазы проводились согласно [4].

Результаты и их обсуждение

В результате химического и транспозонового мутагенеза были отобраны 3 штамма бактерий *Erwinia chrysanthemi*, дефектных по утилизации глюкозы и обозначенных как 169, ENA 49/50 и 1449II. При последующем изучении ростовых характеристик мутантных штаммов на индикаторной среде МакКонки с различными углеводами обнаружилось, что помимо глюкозы отобранные штаммы не утилизировали ряд сахаров. Причем это касалось не только ФТС-субстратов (маннита и маннозы, а для штаммов 169 и ENA49/50 и фруктозы), но и не-ФТС-субстратов таких углеводов, как галактоза, арабиноза, глицерин (а для бактерий, содержащих *Lac*-оперон *E. coli*, и лактоза). Эти данные подтверждались и при росте мутантных штаммов в минимальной водно-солевой среде с соответствующим углеводом в качестве единственного источника углерода. Плейотропный характер наблюдаемых нарушений не мог объясняться дефектами в ферментативном аппарате гликолиза, так как все изучаемые штаммы хорошо утилизировали глюкозо-6-фосфат и фруктозо-1,6-дифосфат.

Таблица 2.

Скорость транспорта ФТС углеводов у клеток бактерий *E. chrysanthemi*

Штамм	Углевод в среде культивирования*	Скорость транспорта** (нмоль углевода/ мин $\times$ мг белка при 30°C)			
		глюкоза	α -МГ	манноза	маннит
ENA 49	Глюкоза	8,7	2,9	2,38	н.о.***
ENA 49	Маннит	н.о.	н.о.	н.о.	13,63
ENA 49/50	Глюкоза	н.о.	0,05	н.о.	н.о.
ENA 49/50	Маннит	н.о.	н.о.	н.о.	0,06
R'49/50	Глюкоза	н.о.	2,0	н.о.	н.о.
R'49/50	Маннит	н.о.	н.о.	н.о.	4,0
169	Глюкоза	н.о.	1,2	н.о.	н.о.
1449II	Маннит	н.о.	н.о.	н.о.	2,7
1449II	Глюкоза	н.о.	0,03	н.о.	н.о.

Примечание: 0,4% углевода в среде, содержащей 0,4% казаминовых кислот; ** меченные по C^{14} углеводы добавляли к клеткам до концентрации 0,1 мМ — глюкоза, α -МГ, маннит, манноза; ***н.о.— не определяли.

Такого рода фенотип у бактерий *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium* обусловлен мутациями по генам *ptsI* и *ptsH*.

Проверка скорости транспорта глюкозы, фруктозы, маннита и α -метил-глюкозида (МГ) (неметаболизируемого аналога глюкозы, поступающего в клетку посредством ФТС) выявила резкое снижение поступления меченых углеводов в клетки мутантных штаммов (табл.2), что полностью подтверждает наши предположения о нарушениях в системах транспорта этих сахаров.

Дополнительной характеристикой изучаемых штаммов явились данные по времени генерации бактерий в минимальной среде с глюкозой или фруктозой в качестве единственного источника углерода. Если у бактерий дикого типа время генерации составляло 120–130 мин, то клетки мутантов удваивались больше чем за 500 мин.

В настоящее время известны две, а по некоторым сведениям даже три транспортных системы для глюкозы [7], однако основная роль в обеспечении поступления этого углевода в бактериальную клетку принадлежит ФТС [3]. Кроме того, только для *pts*-мутантов характерны плеiotропные нарушения утилизации и ФТС-, и не-ФТС-субстратов, наблюдаемые нами у полученных мутантов [3].

Штамм 1449II с четко выраженными плеiotропными нарушениями в утилизации сахаров обнаруживает свойства мутанта по гену *ptsH*. Фосфорилирование входящей в клетку фруктозы идет в отсутствие белка HPr-продукта данного гена [4]. Этим можно объяснить то, что клетки штамма 1449II нормально растут на фруктозе. Кроме того, прямым доказательством природы данной мутации послужили описанные нами ранее эксперименты *in vitro* с использованием клеточных экстрактов [8]. После картирования мутантного гена была определена его локализация – 175 мин на генетической карте хромосомы *E.chrysanthemi* [9].

Свойства, обнаруженные нами у штаммов 169 и ENA49/50, совпадают с описанными ранее фенотипами бактерий *E. coli*, несущих мутации в гене *ptsI*, ответственном за синтез общего компонента ФТС-фермента I [3]. Отсутствие данного фермента предотвращает перенос фосфорной группы от фосфоенолпирувата к поступающему в клетку ФТС-субстрату. Кроме того, у мутантов такого рода за счет явления «исключения индуктора» резко снижен (или полностью прекращен) транспорт и других углеводов [3]. Исходя из сказанного, можно предположить, что у бактерий 169 и ENA49/50 также произошли изменения в гене *ptsI*.

Для подтверждения данного предположения было предпринято клонирование *in vivo* этого гена из штамма дикого типа *E.chrysanthemi* ENA49 в клетки штамма *E.coli* 1260, дефектного по *ptsI*-гену, с помощью плазмиды RP4::miniMu (pULB113). Эта плазида обладает широким кругом хозяев и способна переносить фрагменты донорной хромосомы размером до 80 kb [10]. Отбор трансконъюгантов проводился на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода. Клоны, возникшие с частотой $1,5 \times 10^{-7}$ (относительно числа клеток реципиента, воспринявших плазмиду), характеризовались восстановлением транспорта всех ФТС- и не-ФТС-субстратов, нарушенного ранее вследствие мутации в гене *ptsI*. Чтобы подтвердить возникшую комплементацию присутствием плазмиды, обозначенной R'N27, с клонированным фрагментом хромосомы *E.chrysanthemi*, содержащим ген *ptsI*, рекомбинантная плазида элиминировалась с помощью акридинового оранжевого. Исцеленные таким образом от плазмиды клетки обнаруживали исходный Pts⁻-фенотип. Кроме того, R'N27 от клеток штамма 1260 передавалась рифампицинрезистентным бактериям 1260 и также комплементировала нарушение транспорта углеводов, что подтверждает именно наличие комплементации, а не спонтанную реверсию трансконъюгантов к Pts⁺-фенотипу.

Присутствие рекомбинантной плазмиды в штаммах 169 и ENA49/50 также возвращало клетки к исходному фенотипу, свойственному бактериям дикого типа *E. chrysanthemi* (см. табл.2,3, указан только штамм ENA49/50/R'N27).

Таблица 3

Экспрессия *lac*-оперона у клеток бактерий *E. chrysanthemi*

Штамм	Дифференциальная скорость синтеза β -галактозидазы (нмоль о-нитро-фенола/мин $\times$ мг белка при 30°C)	
	ИПТГ	ИПТГ+глюкоза
ENA49	1840	207
ENA49/50	1017	1025
ENA49/50/R'N27	1727	180

Примечание: индукция изопропил- β -D-галактопиранозидом (ИПТГ) 5×10^{-4} М проводилась в минимальной среде, содержащей 0,4% казеиновых кислот. Концентрация глюкозы – 0,5%.

Таблица 4

Уровень общей пектолитической активности у клеток бактерий *E. chrysanthemi*

Штамм	Общая пектолитическая активность (единицы активности / мг белка)	
	без глюкозы	с глюкозой
ENA49	55,0	12,0
ENA49/50	50,4	44,0

Примечание: клетки выращивались в жидкой полноценной питательной среде с добавлением 0,3% полипектата Na; концентрация глюкозы – 0,5%.

Полученные при картировании *ptsH*-мутации в штамме 1449II *E. chrysanthemi*, а также данные по картированию *ptsI*-мутации (см. ниже), позволяют говорить о раздельной локализации генов *ptsI* и *ptsH* у бактерий *E. chrysanthemi* в отличие от их оперонной структуры у бактерий *E. coli*.

Представляло интерес изучение влияния *ptsI*-мутации на внутриклеточный метаболизм бактерий *E. chrysanthemi*. С этой целью определяли дифференциальную скорость синтеза β -галактозидазы у бактерий дикого типа, *ptsI*-мутантов и мутантов по гену *ptsI*, содержащих плазмиду R'N27. Бактерии *E. chrysanthemi* не утилизируют лактозу, поэтому в клетки трех штаммов вводили *Lac*-оперон *E. coli* в составе F'*lac*-плазмиды. Результаты экспериментов приведены в табл.3.

Из полученных данных следует, что присутствие *ptsI*-мутации почти в 2 раза снижает скорость синтеза β -галактозидазы по сравнению с клетками дикого типа и мутантами, несущими рекомбинантную плазмиду. Согласно [3], такое снижение объясняется следующим образом: из-за блока переноса фосфогруппы от ФЕП к входящему в клетку углеводу, возникающего вследствие нарушения в гене *ptsI*, глюкозоспецифичный фермент IIA^{glu} находится в дефосфорилированной форме, которая ингибирует активность фермента аденилатциклазы. Аденилатциклаза необходима для синтеза циклического АМФ (цАМФ), который, в свою очередь, активирует белок БАК – существенный элемент позитивного контроля катаболических оперонов, в том числе и лактозного.

В то же время синтез β -галактозидазы у *ptsI*-мутанта не подвержен катаболической репрессии в присутствии в ростовой среде глюкозы, тогда как у штамма дикого типа синтез резко снижен.

Особое внимание при изучении фитопатогенных бактерий *E. chrysanthemi* было уделено влиянию нарушений в ФТС на продукцию внеклеточных ферментов, в частности пектиктаз, являющихся у этих микроорганизмов

Таким образом, можно считать, что у изолированных штаммов 169 и ENA49/50 произошла мутация в гене *ptsI*. Однако необходимо учитывать и следующие обстоятельства. У бактерий *E. coli* существует *pts*-оперон, состоящий из генов *ptsI*, *ptsH* и *crr* (кодирующего глюкозоспецифичный фермент IIA^{glu}). Фенотипы одиночных *ptsI*-мутантов и мутантов, имеющих протяженную делецию, захватывающую весь *pts*-оперон, во многом сходны [11]. Мутация в штамме 169 получена при обработке клеток дикого типа нитрозогуанидином, вызывающим замены оснований или небольшие делеции, поэтому логично предположить, что в данном случае затронут лишь один *ptsI*-ген. Что касается мутации в штамме ENA49/50, вызванной инсерцией транспозона *miniTn5::KmxyIE*, то здесь можно было бы предполагать инактивацию всего гипотетического *pts*-оперона *E. chrysanthemi* вследствие полярного эффекта. Однако результаты, полу-

факторами вирулентности. Как и в случае с β -галактозидазой, общая пекта-тиазная активность у *ptsI*-мутанта практически не изменялась в присутствии глюкозы в отличие от таковой у клеток дикого типа (табл.4).

Дополнительной генетической характеристикой являлось картирование *ptsI*-мутации. Для определения локализации гена *ptsI* было проведено скрещивание штамма 169 с полиауксотрофным реципиентом 3766. Оказалось, что ген *ptsI* находится в районе 100-й мин генетической карты хромосомы *Erwinia chrysanthemi*. Такие же результаты были получены и при картировании мутации в клетках штамма ENA49/50.

Таким образом, нами были получены и частично охарактеризованы мутанты по общим компонентам ФТС и выявлена связь между нарушениями целостности компонентов этой системы и изменениями метаболизма у бактерий *Erwinia chrysanthemi*, в частности с продукцией внеклеточных пектолитических ферментов – одного из факторов вирулентности данного фитопатогенного микроорганизма.

1. Кордюм В.А., Неборачко Л.Н., Козыровская Н.А. Генетическая инженерия фитопатогенных бактерий. Киев, 1988.
2. Евтушенков А.Н. Дис.... докт. биол. наук. Мн., 1997.
3. Postma P.W., Lengeler J.W., Jacobson G.R. // *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. New York, 1996. Vol.1. P.1149.
4. Гершанович В.Н., Большакова Т.Н., Ерлагаева Р.С. и др. // Усп. совр. биол. 1987. Т.103. С.173.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
6. De Lorenzo V., Herrero M., Jakubzik U., Timmis K.N. // *J. Bacteriol.* 1990. Vol.172. P.6568.
7. Manayan R., Tenn G., Yee H.B. et al. // *J. Bacteriol.* 1988. Vol.170. P.1290.
8. Евтушенков А.Н., Даценко К.А., Литвинова Е.В. // Тез. докл. VII съезда Белорусского общества генетиков и селекционеров. Горки, 1997. С.100.
9. Даценко К.А., Евтушенков А.Н. Современные проблемы генетики и селекции: Тез. докл. Респ. конференции. Мн., 1995. С. 98.
10. Schoonejans E., Toussaint A.J. // *Bacteriol.* 1983. Vol.154. P.1489.
11. Reuse H. De., Huttner E., Danchin A. // *Gene*. 1984. Vol.32. P.31.

Поступила в редакцию 28.01.98.

УДК: 612.65.577.491:577.1

В.С.ЧУБАНОВ, М.В.ШОЛУХ

ТРАНСДУКЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА ЧЕРЕЗ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ ПЕЧЕНИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС, ПОДВЕРГНУТЫХ ОДНОКРАТНОМУ ПРЕНАТАЛЬНОМУ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЮ

It was found that the one-fold (0,5 Gy) prenatal gamma-irradiations on the 9th and the 15th day of embryogenesis (at the beginning and the end of organogenesis, respectively) resulted in the different alterations of glucagon signalling through the receptor/ G_s -protein/adenylyl cyclase in adult rat liver. The prenatal irradiation on the 9th day enhanced the effect of GTP (the activator of G_s -protein) on the adenylyl cyclase activity. While the gamma-irradiation on the 15th day of embryo development increased the basal, GTP- and glucagon-stimulated adenylyl cyclase activity. The results suggest that the receptor/ G_s -protein/adenylyl cyclase coupling is more sensitive to low doses of gamma-irradiation performed at the end of organogenesis.

Введение

Внешнее гамма-облучение млекопитающих в относительно небольших дозах (0,1–0,6 Гр) в период эмбриогенеза характеризуется мощным тератогенным действием. У экспериментальных животных, подвергнутых внутриутробному облучению, отмечают увеличение количества врожденных пороков и опухолевых новообразований, аномальное соотношение массы органов, замедленное развитие и другие отклонения в постнатальном развитии организма [1–3]. Тератогенные эффекты проявляются наиболее выражено при облучении экспериментальных животных на стадии органогенеза [1–3]. Предполагается, что высокая радиочувствительность эмбриона определяется