

ником [25], а последнего, состоявшегося в 1992 г., — опубликованы в престижном международном журнале "Free Radical Biology and Medicine" (1994. V.16. P.3).

1. Лунец Е. Ф. Исследование патологических реакций, развивающихся в ткани головного мозга при острой ишемии: Дис...докт. мед. наук. М., 1971. С.320.
2. Костюк В. А., Лунец Е. Ф. // Биохимия. 1983. Т.9. №9. С.1491.
3. Костюк В. А. // Там же. 1987. Т.52. №3. С.335.
4. Терещенко С. М., Сперанский С. Д. // ЖОХ. 1988. Т.58, С.1616.
5. Потапович А. И., Костюк В. А. // Биохимия. 1988. Т.53, №2. С.233.
6. Kostyuk V. A., Komura S., Ohishi N., Yagi K. // J. Clin. Biochem. Nutr. 1992. V.12. P.69.
7. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Maslova G. T., Poluhovich G. S. // Free Radic. Bid. Med. 1994. V.16. P.10.
8. Костюк В. А. // Биохимия. 1991. Т.56. №1. С.109.
9. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Teraschenko S. M. // Biochem. Int. 1991. V.25. P.167.
10. Костюк В. А. // Биохимия. 1991. Т.56. №10. С.1878.
11. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. // Biochem. Int. 1991. V.25. P.349.
12. Костюк В. А. // Биохимия. 1986. Т.51. №7. С.1059.
13. Костюк В. А. // Там же. №8. С.1392.
14. Полюхович Г. С., Васильева Л. П., Маслова Г. Т., Боборико Т. Л., Сперанский С. Д. // Вопр. мед. химии. 1991. №4. С.54.
15. Костюк В. А., Потапович А. И., Терещенко С. М., Афанасьев И. Б. // Биохимия. 1988. Т.53. №8. С.1365.
16. Afanas'ev I. B., Dorozhko A. I., Brodskii A. V., Kostyuk V. A., Potapovitch A. I. // Biochem. Pharmacol. 1989. V.38. P.1763.
17. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. // Biochem. Int. 1989. V.19. P.1117.
18. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Speransky S. D., Maslova G. T. // Free Radic. Biol. Med. 1996. V.21. P.68.
19. Костюк В. А., Потапович А. И., Лунец Е. Ф. // Вопр. мед. химии. 1984. Т.30. №4. С.125.
20. Костюк В. А., Потапович А. И. // Вопр. мед. химии. 1987. Т.33. №3. С.115.
21. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В. // Вопр. мед. химии. 1990. Т.36. №2. С.88.
22. Сорока Н. Ф., Костюк В. А., Потапович А. И. // Ревматология. 1990. №2. С.34.
23. Костюк В. А., Потапович А. И., Сорока Н. Ф. // Вопр. мед. химии. 1990. Т.36. №3. С.37.
24. Сорока Н. Ф., Костюк В. А., Потапович А. И. // Эксперим. и клин. фармакол. 1992. Т.55. №3. С.42.
25. Кислородные радикалы в химии и биологии. Мн., 1984.

УДК 575

Ю. К. ФОМИЧЕВ, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ

ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ РОДА ERWINIA



Фомичев Юрий Константинович, профессор кафедры микробиологии, доктор мед. наук, заслуженный работник народного образования Республики Беларусь, Соросовский профессор. Область научных интересов — общая микробиология, молекулярная генетика, молекулярная биология. Автор более 300 научных публикаций.

Прокулевич Владимир Антонович, профессор, зав. кафедрой микробиологии. Область научных интересов — генетика бактерий, биотехнология. Автор более 150 работ.

The systems of conjugation analysis for bacteria *Erwinia* were constructed. By means of these systems and using crossings with interruption of conjugation the closed genetic maps of phytopathogenic *E. chrysanthemi*, *E. atroseptica* and *E. carotovora* were built. An addition, the chromosomal location of identical genes of appointed bacteria was compared and common features with essential differences of there genetic organisations were revealed.

Бактерии *Erwinia*, относящиеся к семейству Enterobacteriaceae, в отличие от значительно лучше изученных представителей этого же семейства (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*), не обладают естественными способами обмена наследственной информацией (такими, как трансформация, конъюгация или трансдукция), что является серьезным препятствием для изучения их генетической организации. Тем не менее генетическая характеристика данных бактерий необходима для решения ряда практических вопросов, связанных с заболеваниями сельскохозяйственных растений [1, 2], а также использования их в биотехнологических целях [3].

В связи с этим были предприняты попытки искусственного создания систем генетического анализа, пригодных для изучения наследственных свойств бактерий *Erwinia*. На кафедре микробиологии Белгосуниверситета и в научно-исследовательской лаборатории при кафедре более 20 лет ведутся работы по изучению генетической организации данного рода микроорганизмов.

В качестве объекта исследований были избраны штаммы бактерий *Erwinia*, которые обладали выраженными фитопатогенными свойствами, а также повышенной продукцией ряда внеклеточных ферментов, определяющих их высокую вирулентность для растений.

Способность бактерий *Erwinia* воспринимать при конъюгации от клеток *E.coli* внехромосомные генетические элементы [4, 5], в том числе и плазмиду Flac^+ , детерминирующую легко выявляемый признак ферментирования лактозы и донорскую активность [6], послужила основой для создания набора донорских Hfr-подобных штаммов *E.chrysanthemi* [7], клетки которых передавали хромосомальные гены при скрещиваниях с реципиентными бактериями с различных мест (oriT) генома. Одновременно для осуществления последующего картирования хромосомы исследуемых бактерий была создана коллекция полимаркированных реципиентных штаммов.

В результате удалось создать систему конъюгационного анализа, с помощью которой методом скрещиваний с прерыванием конъюгации была построена первая замкнутая генетическая карта хромосомы *E.chrysanthemi* ENA49 [8–10]. Кроме того, в серии конъюгационных скрещиваний был выяснен механизм формирования донорских Hfr-штаммов *Erwinia* и показана важная роль в этом процессе транслокации транспозона Tn1000 из Flac^+ -плазмиды в хромосому клетки-хозяина [11].

Возможность формирования рекомбинантного потомства в скрещиваниях донорских и реципиентных бактерий *E.chrysanthemi* является достаточно веским доказательством наличия у них соответствующих генетических детерминант, контролирующих рекомбинационный процесс. Серия специально проведенных экспериментов привела к обнаружению у *E.chrysanthemi* ENA49 генетического локуса, функционально идентичного *гесА*-гену *E.coli* [12, 13]. Это подтверждается результатами изучения свойств рекомбинационно-дефектного мутанта *E.chrysanthemi*, клетки которого, несущие данную мутацию, полностью утрачивают способность формирования рекомбинантного потомства при скрещиваниях с изогенными донорскими бактериями. Утрата рекомбинационной способности сопровождалась повышением чувствительности мутантных клеток к воздействию ряда повреждающих агентов химической и физической природы (метилметансульфонату, нитрозогуанидину, УФ-излучению и т.п.), а также потерей способности продуцировать бактериоцин. Отметим, что мутация, затрагивающая локус, детерминирующий синтез бактериоцина, не обладает плеiotропным эффектом, не сцеплена с *гес*-мутацией [14] и локализуется в ином месте генетической карты хромосомы *E.chrysanthemi* ENA49.

Наличие развитой системы рекомбинации у бактерий *Erwinia* подтверждается также экспрессией генетических детерминант, контролирующих "SOS"-ответ клетки, проявляющийся в повышении "выживаемости" УФ-облученного фага, репродуцирующегося в клетках *Erwinia*, у которых предварительно индуцировалась активность "SOS"-системы. Результаты экспериментов этой серии демонстрируют наличие у бактерий *E.chrysanthemi* эффективной системы эксцизионной репарации [15], генетически близкой таковой у бактерий *E.coli*. Помимо механизмов темновой репарации бактерии *E.chrysanthemi* обладают системой фотореактивации, активность которой примерно на порядок выше аналогичной системы репарации *E.coli* [16]. Однако бактерии *E.chrysanthemi*, несмотря на наличие достаточно эффективных репарационных механизмов, отличаются

повышенной чувствительностью к УФ-облучению, что предположительно связано с природным дефектом систем, контролирующих процессы цитокинеза. В пользу данного предположения свидетельствует факт *gcsA*-зависимого индуцирования длинных нитевидных форм клеток УФ-облучением, а также повышение выживаемости облученных бактерий добавлением в ростовую среду пантоил-лактона, действие которого реализуется на уровне системы, детерминированной *lpp*-геном [17].

Особый интерес представляло выяснение механизмов регуляции синтеза внеклеточных пектолитических ферментов бактериями *Erwinia*, продукция которых является наиболее существенным фактором, определяющим вирулентность фитопатогенных представителей этого рода [18,19].

В исследованиях данной серии было установлено, что клетки *Erwinia* продуцируют несколько различных форм пектаттиазы, различающихся между собой по электрофоретической подвижности, оптимуму pH, молекулярной массе, субстратной специфичности, зависимости от двухвалентных катионов и др. [20–23]. Изучавшиеся ферменты относятся к истинным внеклеточным и продуцируются во внешнюю среду при росте клеток-продуцентов в присутствии индукторов, которыми являются низкомолекулярные соединения, образующиеся в результате ферментативной деградации пектиновых веществ. Изоферментный состав пектаттиаз *Erwinia* подтверждается клонированием детерминирующих их структурных генов в клетках *E.coli* [21,24,25].

В генетических исследованиях было четко продемонстрировано, что индуцибельный синтез пектаттиаз клетками *Erwinia* подвержен катаболитной репрессии глюкозой и некоторыми другими углеводами [26]. Репрессия снимается добавлением экзогенного циклического АМФ. Полученные результаты позволили сделать вывод о двойном типе регуляции синтеза пектаттиаз клетками *E.chrysanthemi*: посредством регуляции на уровне взаимодействия индуктора с репрессором и с помощью регуляторного механизма с участием системы циклического АМФ и белка, активирующего катаболитические реакции. Помимо этого, было установлено, что продукция пектаттиаз бактериями *Erwinia* во многом определяется полноценностью локусов, отвечающих за процессы секреции данных ферментов [27, 28], а также зависит от источника углерода [29, 30]. Изучение процесса секреции пектаттиаз выявило, что эффективность экскреции данных ферментов определяется появлением во внешней мембране клеток специфичного, ранее отсутствовавшего белка [31].

Наконец, известная доля внимания была уделена выявлению систем "защиты" собственной генетической информации бактерий *Erwinia* от возможного попадания чужеродного генетического материала, т.е. выяснению, обладают ли данные микроорганизмы системами рестрикции и модификации. Предпринятые в этом направлении эксперименты не позволили обнаружить наличие специфических рестриктаз в клетках *E.chrysanthemi* и *E.atroseptica*, однако у бактерий *E.herbicola* была найдена новая рестрицирующая эндонуклеаза второго типа, являющаяся ложным изоизомером ферментов *NarI*, *NdaI*, *NunII* и *BbeI* [32, 33]. Обнаруженная рестриктаза, обозначенная *EheI*, распознает специфическую последовательность из 6 нуклеотидов и разрезает дуплекс ДНК с образованием "тупых" окончаний.

Таким образом, разработанная система конъюгационного анализа бактерий *Erwinia* обусловила возможность построения первой кольцевой замкнутой генетической карты хромосомы *E.chrysanthemi* ENA49, на которой определено положение основных генов, детерминирующих синтез аминокислот, регуляцию продукции пектолитических ферментов, контроль репарационных систем и др., – всего 93 генетических локуса при общей протяженности карты в 200 мин.

Использование аналогичных подходов позволило создать наборы донорских штаммов типа *Hfr* и полимаркированных реципиентов бактерий *E.atroseptica* [34–36] и *E.carotovora*, с помощью которых построены кольцевые карты хромосомы данных микроорганизмов.

Сопоставление генетических карт хромосом бактерий *Erwinia* и основного представителя семейства *Enterobacteriaceae* бактерий *E.coli* показало, что гены, ответственные за одинаковые признаки, зачастую располагаются в различных областях хромосомы [37]. Данная ситуация, а также отсутствие гомологии нуклеотидных последовательностей функционально идентичных генов (о чем свидетельствует невозможность осуществления между ними рекомбинации), по-

звolyет сделать заключение о некоторой филогенетической отдаленности указанных микроорганизмов. Более того, даже в пределах одного рода расположение генетических локусов в хромосомах изученных в этом плане бактерий разных видов (*chrysanthemi*, *atroseptica* и *carotovora*) во многих случаях существенно различается.

Выявленные же различия в размерах генетических карт хромосом у бактерий *Erwinia* и *Escherichia* (при примерно одинаковой величине самих клеток) могут объясняться различными условиями скрещивания, неодинаковыми способами картирования и, кроме того, наличием у *Erwinia* дополнительной генетической информации, кодирующей структуру ряда ферментов, отсутствующих у *E.coli*, а также механизмов, обеспечивающих регуляцию их синтеза и секреции.

1. Фомичев Ю.К., Прокулевич В.А. // Молекулярные и генетические механизмы взаимодействия микроорганизмов с растениями. Пушчино, 1989. С.116.

2. Евтушенков А.Н., Чернов С.П., Шевчик В.Е., Фомичев Ю.К. // Биотехнология. 1985. Т.5. №2. С.226.

3. Фомичев Ю.К. // Биологические науки. 1985. №12. С.37.

4. Лобанок Т.Е., Песнякевич А.Г., Фомичев Ю.К. // Генетика. 1978. Т.14. №12. С.2119.

5. Они же // Там же. 1979. Т.15. №10. С.1739.

6. Прокулевич В.А., Фомичев Ю.К. // Генетика. 1978. Т.14. №11. С.1892.

7. Они же // Там же. 1981. Т.17. №11. С.2048.

8. Прокулевич В.А., Коровина Н.А., Фомичев Ю.К. // Там же. 1982. Т.18. №11. С.1806.

9. Прокулевич В.А., Беясова Н.А., Фомичев Ю.К. // Там же. 1983. Т.19. №10. С.1624.

10. Они же // Там же. 1984. Т.20. №12. С.1961.

11. Прокулевич В.А., Беясова Н.А., Камара С.Ф. и др. // Там же. 1985. Т.21. №11. С.1787.

12. Прокулевич В.А., Лысак В.В., Фомичев Ю.К. и др. // Там же. 1983. Т.19. №11. С.1769.

13. Прокулевич В.А., Фомичев Ю.К. // Молекуляр. генетика. 1989. №1. С.40.

14. Лысак В.В., Прокулевич В.А., Фомичев Ю.К. // Там же. 1988. №5. С.24.

15. Прокулевич В.А., Фомичев Ю.К. // Там же. 1986. №6. С.11.

16. Они же // Там же. 1988. №7. С.24.

17. Они же // Там же. №9. С.46.

18. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. // Вестн. Белорус. ун-та. 1978. Сер. 2. №3. С.25.

19. Ченов С.П., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. // Прикл. биохимия и микробиология. 1991. Т.27. Вып.6. С.885.

20. Евтушенков А.Н., Шевчик В.Е., Попова Л.Б., Фомичев Ю.К. // Там же. 1986. Т.22. Вып.2. С.187.

21. Евтушенков А.Н., Шевчик В.Е., Фомичев Ю.К. // Молекуляр. генетика. 1987. №5. С.22.

22. Богуш В.Г., Гайда Г.З., Великодворская Т.В. и др. // Биохимия. 1986. Т.51. Вып.2. С.260.

23. Шевчик В.Е., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. // Там же. 1988. Т.53. Вып.10. С.1628.

24. Буканов Н.О., Фонштейн М.Ю., Евтушенков А.Н. и др. // Генетика. 1985. Т.21. №10. С.1601.

25. Евтушенков А.Н., Шевчик В.Е., Фомичев Ю.К. // Молекуляр. генетика. 1986. №4. С.19.

26. Прокулевич В.А., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. // Там же. 1984. №8. С.26.

27. Евтушенков А.Н., Прокулевич В.А., Беясова Н.А. и др. // Там же. 1984. №6. С.11.

28. Бабицкая Е.В., Песнякевич А.Г., Николайчик Е.А. // Прикладн. биохимия и микробиология. 1995. Т.31. №4. С.447.

29. Шевчик В.Е., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. // Там же. 1992. Т.28. Вып.1. С.87.

30. Shevchik V.E., Evtushenkov A.N., Babitskaya E.V., Fomichev Y.K. // World Journ. of Microbiol. and Biotechnol. 1992. V.8. P. 115.

31. Шевчик В.Е., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. // Молекуляр. генетика. 1989. №8. С.23.

32. Чернов С.П., Абдель-Сабур М.С., Фомичев Ю.К. // Вестн. Белорус. ун-та. 1985. Сер. 2. №1. С.30.

33. Кульба А.М., Абдель-Сабур М.С., Буткус В.В. и др. // Молекуляр. биология. 1987. Т.21. Вып.1. С.250.

34. Николайчик Е.А., Песнякевич А.Г. // Генетика. 1993. Т.29. №8. С.1278.

35. Они же // Там же. 1995. Т.31. №7. С.889.

36. Они же // Там же. №8. С.1052.

37. Прокулевич В.А., Фомичев Ю.К. // Успехи соврем. генетики. 1993. Вып.18. С.121.