

9. Помазян В.А., Пешко В.А. и др. Вест. хирургии, 10, 75-78, 1977.
10. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. В кн: Интерфероны в теории и практике медицины. М., 1981.
11. Ткач С.М., Бычкова Н.Г. и др. Врач. дело, 9, 58-62, 1989.
12. Prasad S., Jalitha H., Shetna Y. Current science, 42, 568-573, 1973.
13. Prasad S., Shetna Y. Indian J. Exp. Biology, 14, 285-289, 1976.

Поступила 8. IX.1994

Биолог. журн. Армении, 1-2 (49), 1996

УДК 577.5:579.253.4

## ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ КОМПОНЕНТОВ БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ У *ESCHERICHIA COLI* K-12

Г.Г. ОГАНЕСЯН, А.А. БАРСЕГЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Изучено влияние мутаций в генах, детерминирующих биосинтез компонентов белоксинтезирующей системы клетки, на сверхсинтез капсулярных полисахаридов (КПС) у *lon* мутантов *Escherichia coli* K-12. Показано, что *ropB* мутации, затрагивающие структуру  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы, приводят как к увеличению, так и снижению синтеза КПС. Рибосомные же мутации *rpsL* приводят к снижению или полной остановке биосинтеза КПС. Сочетание рибосомных и РНК-полимеразных мутаций в одной клетке усугубляет их действие на образование КПС.

Ուսումնասիրված է բջժի սպիտակուս սինթեզող ապարատի կոմպոնենտների բխոսինթեզը ցայմանավորող գենային մուտացիաների ազդեցությունը, որը *Escherichia coli* K-12-ի *lon* մուտանտների մոտ առաջ է բերում կապսուլար (պատիճի) բազմաշաքարների (ԿՊՏ) գերսինթեզ: Ցույց է տրված, որ *ropB* մուտացիաները, որոնք ազդում են ՌՆԹ-պոլիմերազի  $\beta$ -ենթամիավորի կառուցվածքի վրա, ավելացնում կամ նվազեցնում են ԿՊՏ սինթեզը: Ռիբոսոմային *rpsL* մուտացիաները առաջ են բերում ԿՊՏ բխոսինթեզի նվազում կամ լրիվ կանգ: Ուսումնասիրված է ՌՆԹ-պոլիմերազի և ռիբոսոմային մուտացիաների համատեղ ազդեցությունը ԿՊՏ առաջացման վրա:

The influence of mutations in genes, determining the biosynthesis of components of protein synthesising system of cell, for overproduction of capsular polysaccharides (CPS) of *lon* mutants of *Escherichia coli* K-12 is studied. The *ropB* mutations effecting on the structure of  $\beta$ -subunits of RNA-polymerase bring to increase or decrease the synthesis of CPS. Ribosomal *rpsL* mutations bring to decrease or stop the biosynthesis of CPS. The combined action of ribosomal and RNA-polymerase mutations on formation of CPS is investigated.

Капсулярные полисахариды - мутация - рибосома - РНК-полимерата.

Биосинтез КПС у *E. coli* K-12 находится под негативным контролем *lon* гена [11,12]. Этот ген детерминирует биосинтез АТФ-зависимой протеазы, избирательно подвергающей протеолизу дефектные и короткоживущие пативные белки клетки, в том числе белки, контролирующие инициацию септообразования и биосинтез КПС колановой кислоты [5,6,9,12]. Мутации в *lon* гене приводят к более чем 100-кратному увеличению биосинтеза колановой кислоты, тогда как биосинтез составляющих ее

мономеров увеличивается не более чем в 20 раз [8,13]. Lon- протеаза разрушает RcsA позитивный регуляторный белок, который на уровне транскрипции инициирует активность *eps* генов, детерминирующих биосинтез КПС [7,11,12]. В отсутствие АГФ-зависимой протеазной активности *eps* гены переходят в состояние конститутивного синтеза колановой кислоты, в результате чего клетки капсулируются [7]. Помимо изменений действия специфических регуляторов, сдвиги в экспрессии *eps* генов могут произойти также на этапах их транскрипции и трансляции. Известно, что мутации в РНК-полимеразных и рибосомных генах, обладающих плейотропным действием, приводят к ошибкам биосинтеза белков на стадии их транскрипции и трансляции.

Целью настоящей работы являлось изучение влияния РНК-полимеразных и рибосомных мутаций на экспрессию генов, детерминирующих биосинтез КПС.

**Материал и методика. Бактериальные культуры.** В работе были использованы штаммы *E. coli* K-12. JC335 (F<sup>+</sup>, *leu*<sup>-</sup>, *his*<sup>-</sup>, *arg*<sup>-</sup>, *metB*<sup>-</sup>); A200 *leu*<sup>-</sup> lon<sup>-</sup> дериват штамма JC335 [2]. РНК-полимеразные *groV* и рибосомные *grsL* рекомбинанты штамма A200 [2,4].

**Бактериофаги:** трансдуцирующие бактериофаги P1 *vir* и P1<sub>КС</sub>, вирусный фаг M59 [2-4,10].

**Питательные среды:** синтетическая среда M9 с необходимыми добавками ростовых факторов по Адамсу [1]; мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА) для выращивания бактерий и T-агар (0,6% и 1,2%) для трансдукции [2-4]. Для ферментации использовали среду M9 с 10%-ной глюкозой и 0,5% СаСО<sub>3</sub>.

Трансдукция P1 *vir* и P1<sub>КС</sub> фагами, константа скорости адсорбции и морфология негативных колоний бактериофага M59, биосинтез полисахаридов производились по ранее описанным методикам [2-4].

В работе использовали устойчивые к рифампицину, стрептомицину и одновременно к обоим антибиотикам штаммы. Мутации *groV* (*gf* - *r*) и *grsL* (*sr* - *r*), имеющие шлейотропное проявление, методом трансдукции были перенесены в реципиентный капсулированный штамм A200. Отбор трансдуктантов производили по устойчивости к антибиотикам и по близлежащим тесно сцепленным маркерам. У отобранных рекомбинантов изучалось сохранение шлейотропного характера каждой мутации. Были поставлены опыты по ферментации полисахаридов. После трехсуточной ферментации определяли титр жизнеспособных клеток, количество синтезированного полисахарида, вязкость культуральных растворов и вязкость 0,1% водных растворов очищенных полисахаридов.

**Результаты и обсуждение.** Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что и РНК-полимеразные, и рибосомные мутации в разной степени влияют на биосинтез КПС. Все проверенные рибосомные мутации приводили к снижению выхода полисахаридов, а мутация *grsL59* вызывала полное прекращение их биосинтеза.

Таблица 1. Сравнительное изучение биосинтеза капсулярных полисахаридов у *groV* и *grsL* трансдуктантов штамма A200.

Штамм	<i>groV</i> <i>grsL</i> аллель	Конечный титр бактерий $\times 10^8$ кл/мл	Уровень синтеза КПС, %	Вязкость КЖ, спз*	Вязкость 0,1% растворов КПС, спз
A200	—	7,1	100	3,6250	0,8526
A-p1	<i>gro</i> B401	2,1	74	2,5192	0,8428
A-p2	<i>gro</i> B402	1,7	64	2,4444	0,8428
A-p3	<i>gro</i> B403	9,4	177	8,9280	0,8624
A-p9	<i>gro</i> B409	6,7	95	3,3300	0,8526
A-p23	<i>gro</i> B423	8,7	51	1,9656	0,8232
A-c2	<i>grsL</i> 2	2,1	43	1,4112	0,8996
A-c9	<i>grsL</i> 9	1,9	39	1,2114	0,8426
A-c10	<i>grsL</i> 10	3,7	48	1,9304	0,8424
A-c37	<i>grsL</i> 37	3,9	80	2,5200	0,8428
A-c59	<i>grsL</i> 59	0,9	1	0,6930	0,0121

\* Условное обозначение: спз - сантипуаза - единица вязкости.

Из РНК-полимеразных мутаций groB403 вызвало двухкратное увеличение биосинтеза КПС, остальные - снижение от 1,1 до 2 раз.

Наблюдалась четкая корреляция между количеством синтезированного полисахарида и вязкостью культуральных растворов. По вязкости 0,1% водных растворов мутанты почти не отличались между собой, что свидетельствует о том, что РНК-полимеразные и рибосомные мутации не вызывают структурных изменений КПС.

После трехсуточной ферментации по конечному титру жизнеспособных клеток штаммы сильно отличались друг от друга. Способность единичной клетки к биосинтезу полисахаридов определялась с помощью вирулентного бактериофага M59, лизирующего только капсулированные клетки. Эффективность его адсорбции зависит от толщины полисахаридного слоя вокруг клетки. Результаты проверки эффективности посева, определения размера негативных колоний и константы скорости адсорбции бактериофага M59 на клетках мутантных штаммов приведены в табл. 2.

Таблица 2. Кинетика адсорбции и эффективность посева бактериофага M59 на groB и groL штаммах.

Штамм	Эффективность посева фага M59*	Размер негативных колоний, мм	Константа скорости адсорбции $\times 10^9$ кл/мл
A200	1	10-12	6,6
A-p1	0,99	7-9	5,4
A-p2	0,97	7-9	4,9
A-p3	1,05	13-15	15,0
A-p9	1,00	8-10	6,4
A-p23	0,97	6-7	2,5
A-c2	0,98	5-6	2,3
A-c9	0,96	5-6	1,9
A-c10	0,99	5-6	2,4
A-c37	0,99	9-11	5,2
A-c59	0	*	0

Примечание: \* Соотношение между количеством негативных колоний, образованных на мутантных штаммах, и исходной культуры A200.

Бактериофаг M59 с одинаковой эффективностью образует негативные колонии на газонах исследуемых штаммов (кроме штамма A-c59). Размеры негативных колоний широко варьируют от штамма к штамму от 3 до 15 мм, что зависит от соотношения скорости биосинтеза полисахарида с циклом развития фага. Если биосинтез КПС происходит медленно, то бляшки получаются мелкими, а при обильном их синтезе вокруг прозрачных негативных колоний образуются полупрозрачные ободки вследствие разложения полисахаридов, индуцируемых фагом полисахариддеполимеразой. В связи с отсутствием капсулы у штамма A-c59 бактериофаг M59 на нем не адсорбируется. Обнаружена корреляция между синтезом КПС и константой скорости адсорбции фага M59. У всех исследованных штаммов, кроме активного штамма A-p3, константы скорости адсорбции существенно ниже по сравнению с исходным штаммом A200.

Изучено совместное влияние мутантных аллелей groB и groL генов на биосинтез КПС. groB аллели в стрептомицинустойчивые штаммы A-c2 и A-c59 были перенесены методом трансдукции. Отбирались устойчивые к рифампицину метиоциновые прототрофы. У отобранных рекомбинантов изучали выход полисахаридов, вязкость культуральных растворов и кинетику скорости адсорбции бактериофага M59 (табл.3).

Таблица 3. Совместное влияние РНК-полимеразных и рибосомных мутаций на биосинтез полисахаридов и константу адсорбции фага М59.

РНК-полимеразные мутации	Рибосомные мутации					
	grsL2			grsL59		
	количество КПС, %	вязкость кж. суз	константа скорости адсорбции М59 x 10 <sup>9</sup> кл/мл	количество КПС, %	вязкость кж. суз	константа скорости адсорбции М59 x 10 <sup>9</sup> кл/мл
-	100	1,4112	2,3	100	0,6930	0
grs В401	78	0,9450	1,9	100	0,6804	0
grs В402	87	1,1700	2,0	100	0,6300	0
grs В403	94	1,3332	2,2	200	0,7560	0
grs В409	74	0,9198	1,7	100	0,6804	0
grs В423	71	0,8820	1,5	100	0,6990	0

При совместном действии РНК-полимеразных и рибосомных мутаций биосинтез КПС снижается еще больше. Даже grs В403 мутация, способствующая 2-кратному повышению выхода КПС, во взаимодействии с grsL мутациями приводит к его снижению.

Таким образом показано, что РНК-полимеразные и рибосомные мутации могут играть существенную роль при биосинтезе КПС. В ряде случаев их можно использовать в качестве селективных факторов для повышения активности штаммов-продуцентов полисахаридов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Барсегян А.А., Оганесян Г.Г., Оганесян М.Г. Биолог. журн. Армении, 36, 6, 439-484, 1983.
3. Барсегян А.А., Оганесян Г.Г. Биолог. журн. Армении, 36, 12, 1136-1141, 1983.
4. Оганесян Г.Г., Барсегян А.А., Оганесян М.Г. Биолог. журн. Армении, 37, 5, 398-404, 1984.
5. Edmunds T., Goldberg A.L. J. Biol. Biochem., 32, 187-191, 1986.
6. Goldberg A.L. Microbiology, ASM Washington, DC, 340-345, 1985.
7. Gottesman S., Stout V. Mol. Microbiol., 5, 7, 1599-1606, 1991.
8. Merkovitz A. In: Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell, Acad. Press, Inc. N.Y., 415-462, 1977.
9. Mizusawa S., Gottesman S. PNAS USA, 802, 358-362, 1983.
10. Stirm S., et al. Zentrallblatt. Bacteriologischen Higiene J. ABTOrig., A266, 26-28, 1974.
11. Stout V., Gottesman S. J. Bacteriol., 172, 2, 6, 59-669, 1990.
12. Terres-Cabassa A.S., Gottesman S. J. Bacteriol., 169, 3, 981-983, 1987.
13. Trisler P., Gottesman S. J. Bacteriol., 160, 1, 184-191, 1984.

Получила 9.IX.1994