

УДК 577.154.25+575:576.851

БИОХИМИЯ

Т. Н. БОЛЬШАКОВА, Т. Р. ГАБРИЭЛЯН, Г. И. БУРД,
В. Н. ГЕРШАНОВИЧ

ЛАС-ПРОМОТОР — МЕСТО ДЕЙСТВИЯ PTS-МУТАЦИЙ НА СИНТЕЗ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ У *ESCHERICHIA COLI*

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 27 IV 1976)

Фосфоенолпируват: углевод-фосфотрансферазная (К.Ф.2.7.3.9) система *E. coli* (^{1, 2}) осуществляет фосфорилирование многих углеводов. В этом процессе участвуют несколько компонентов. Фермент I катализирует перенос фосфатной группы с фосфоенолпирувата на низкомолекулярный термостабильный белок Нрг. Образовавшийся фосфо~Нрг служит донатором фосфата в реакции фосфорилирования углевода, осуществляемой мембранным ферментом II. Синтез ϕI^* и белка Нрг конститутивен и детерминируется генами *pts1* и *ptsH* соответственно (³). Установлено, что ФТС участвует в транспорте и метаболизме углеводов у бактерий (⁴⁻⁷). Однако некоторые свойства *pts*-мутантов позволили предположить, что продукты *pts*-генов имеют отношение к регуляции синтеза катаболит-чувствительных ферментов (⁸), т.е. ферментов, синтез которых подвержен катаболитной репрессии. Так, клетки с нарушенной системой генерации фосфо~Нрг (*pts1* Н, *pts1* или *ptsH* мутанты) плохо растут на не-ФТС-субстратах (глицерине, мальтозе, лактозе и др.) (^{4-6, 8-10}). Помимо этого, как было впервые обнаружено в нашей лаборатории (¹¹), *pts*-мутации приводят к снижению дифференциальной скорости индукции ряда ферментов, что, возможно, и обуславливает неспособность мутантных клеток нормально утилизировать не-ФТС-субстраты (^{4, 5, 8}).

Полученные в других лабораториях данные (^{2, 6, 7, 9}), подтверждали высказанное нами предположение об участии продуктов *pts*-генов в регуляции индуцибельных синтезов у бактерий *E. coli* (⁸). Например, было показано, что у *pts*-мутантов восстанавливается способность к росту в присутствии того или иного не-ФТС-субстрата, если ферменты транспорта и катаболизма этого вещества образуются конститутивно (генетическая супрессия) (^{6, 9, 10}). Помимо этого, в некоторых случаях репрессирующее действие *pts*-мутации на рост клеток в среде с не-ФТС субстратами удается устранить, если культуры выращивать в присутствии цАМФ или больших количеств индуктора (фенотипическая супрессия) (^{9, 12}). Таким образом, эти результаты указывают на то, что у *pts*-мутантов нарушается регуляция транскрипции катаболит-чувствительных генов.

В настоящей работе на модели *lac*-оперона мы попытались выявить ту регуляторную область, которая является местом приложения репрессирующего эффекта *pts*-мутации на синтез β -галактозидазы (К.Ф.3.2.1.23). С этой целью различные *pts*-мутации были совмещены с мутациями, задающими регуляторные *lac*-гены. Сначала, на основе генотипа J6231 (*F*⁻, *str*^r*trp* *pur*C) сконструированы изогенные штаммы, несущие мутации *lacI*, *lacP*^{L1uv5}, *lacP*^{L5uv5}. Напомним, что *lacI* — это мутация в гене-

* В работе приняты следующие сокращения: ФТС — фосфоенолпируват: углевод-фосфотрансферазная система; ϕI — фермент I ФТС; ФТС-субстраты — акцепторы фосфата в реакции, осуществляемой ФТС *in vitro* не-ФТС-субстраты — вещества, не фосфорилируемые ФТС *E. coli*; цАМФ — циклическая аденозин-3',5'-монофосфорная кислота; CRP — белок-активатор транскрипции катаболит-чувствительных генов.

регуляторе, приводящая к конститутивному синтезу ферментов *lac*-оперона; *lacP* — промоторные мутации. Известно, что в промоторной области имеется по меньшей мере два сайта (¹³). Один из них («левый») является местом посадки комплекса белка CRP с цАМФ и расположен ближе к *lacI*-гену. Второй сайт («правый»), лежащий ближе к оператору — место прикрепления РНК-полимеразы. Делеция L1 задевает именно сайт посадки комплекса CRP+цАМФ и захватывает часть гена-регулятора. L8 — точечная мутация в «левом» сайте. Мутация *uv5*, увеличивающая сродство РНК-полимеразы к промоторной ДНК, расположена в «правом» сайте.

Далее, в штаммы с вышеуказанными мутациями, с помощью трансдукции фагом P1_{ks} вводились мутации: *pts1*, H и *pts1*^{ts} (из штаммов П-34 и ts19) (^{4, 5}), *pts1* и *ptsH* (из штаммов 1103 и 1101) (^{3, 12}). У сконструированных штаммов с повреждениями регуляторных *lac*-генов определяли скорость синтеза β -галактозидазы, измеряя активность фермента по методу (¹⁴). Клетки выращивали до начала логарифмической фазы в солевой среде с 0,4% казаминовых кислот, добавляли, где требовалось, индуктор (10^{-3} M изопропилтио- β -D-галактопиранозида) и в течение последующих 2 час. (каждые 30 мин.) отбирали пробы, которые фиксировали хлорамфениколом (50 мкг/мл). Кривые, отражающие зависимость активности фермента от прироста бактериальной массы, подвергали статистической обработке по методу наименьших квадратов.

Прежде всего нами было показано, что подавление синтеза β -галактозидазы связано с утратой активности системы генерации фосфо~Hpr, а не является результатом повреждения генов, тесно сцепленных с *pts*-областью. С этой целью был использован изогенный штамм с термочувствительным ф1 ФТС. При непермиссивной температуре (41°) скорость синтеза β -галактозидазы у мутанта значительно ниже, чем в клетках дикого штамма, тогда как при 30° этой разницы не обнаруживается (рис. 1). Эти данные позволили нам перейти к изучению влияния *pts*-мутаций на синтез β -галактозидазы у бактерий с нарушенными регуляторными *lac*-генами.

Результаты экспериментов, представленные в табл. 1 (1-я и 2-я строки), находятся в соответствии с ранее полученными данными (^{4-6, 8}). У всех изученных нами *pts*-мутантов с ненарушенной системой регуляции *lac*-оперона снижена дифференциальная скорость синтеза β -галактозидазы. Перевод *lac*-оперона в конститутивное состояние в результате *lacI*-мутации не приводит к восстановлению скорости синтеза фермента до уровня, наблюдаемого в *lacI pts*⁺-штамме. Отсюда следует, что *pts*-мутация не вмешивается во взаимодействие между репрессором и индуктором.

Однако ингибирующий эффект *pts*-мутаций не проявляется в штаммах с дефектом в «левом» сайте *lac*-промотора (табл. 1, 3-я строка). Это указывает на то, что местом действия *pts*-мутаций является промоторная область *lac*-оперона, точнее ее «левая» часть. Следует отметить, что снятие репрессорного эффекта *pts*-мутаций наблюдается и в штаммах с дефектом в «правом» сайте промотора, у которых РНК-полимераза функциони-

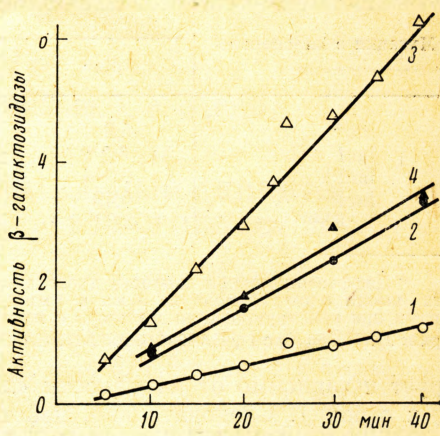


Рис. 1. Синтез β -галактозидазы в клетках *pts1*^{ts} (1, 2) и *pts*⁺ (3, 4), выращенных при 41° (1, 3) и 30° (2, 4) в среде с лактатом. Условия опыта см. (¹⁵). Активность фермента выражена в нмольх о-нитрофенола на 1 мл, образовавшегося за 1 мин. при 30° на 1000 имп/мин ¹⁴C-лейцина, включенного в ТХУ-нерастворимую фракцию клеток

Таблица 1

Дифференциальная скорость синтеза β -галактозидазы у *pts*-мутантов с нарушенной системой регуляции *lac*-оперона *

Мутация в <i>lac</i> -опероне	<i>pts</i> -Мутация			
	<i>pts</i> ⁺	<i>pts</i> 1, H	<i>pts</i> 1	<i>pts</i> H
<i>lac</i> ⁺	5,8	2,9	3,0	3,5
<i>lac</i> I	6,3	2,3	3,6	2,7
<i>lac</i> P ^{L1}	0,014	0,027	0,016	0,013
<i>lac</i> P ^{L1uv5}	0,49	1,2	1,36	1,39
<i>lac</i> P ^{L8uv5}	2,02	2,09	2,5	2,3

* Дифференциальная скорость представляет собой отношение прироста активности фермента (нмоль *o*-нитрофенола на 1 мл в 1 мин. при 30°) к приросту белка клеток (мкг/мл). Доноврами при конструировании штаммов с мутациями в *lac*-опероне послужили следующие бактерии: HfH3300 (*lac* I), CA8001 (*lac* P^{L1}), CA8224.1 (*lac* P^{L8uv5})

рует независимо от активности «левой» части промотора (табл. 1, 4-я и 5-я строки). Следовательно, действие *pts*-мутаций не может распространяться на работу РНК-полимеразы.

Таким образом, приведенные эксперименты показывают, что: 1) репрессирующий эффект *pts*-мутаций на синтез β -галактозидазы не связан с их влиянием на взаимодействие *lac*-репрессора с индуктором; 2) *pts*-мутации не влияют на функционирование РНК-полимеразы; 3) действие *pts*-мутаций реализуется на уровне «левой» части *lac*-промотора.

Представленные в настоящей работе и имеющиеся в литературе данные позволяют считать, что *pts*-гены кодируют синтез белков, которые прямо (или косвенно) воздействуют на выражение каталит-чувствительных оперонов. Однако эти данные пока не дают возможности объяснить механизм участия *pts*-продуктов в регуляции транскрипции. Можно предположить, что в *pts*⁺-клетках фосфорилированная форма Нрг прямо или косвенно может играть роль активатора инициации транскрипции. При росте в среде с не-ФТС-субстратами клетка имеет определенное количество фосфо~Нрг, который не расходуется в транспортном процессе. Добавление в среду роста ФТС-субстрата или мутационное нарушение *pts*-генов ведет к снижению в клетке количества фосфо~Нрг и, соответственно, скорости транскрипции каталит-чувствительных оперонов. Не исключено также, что действие *pts*-продуктов на синтез β -галактозидазы опосредовано их влиянием на синтез белка CRP или на системы, регулирующие уровень внутриклеточной цАМФ.

Авторы сердечно благодарят д-ра Д. Бэквита (США) и д-ра Дж. Скэйфа (Шотландия) за предоставление *lac*P-штаммов, д-ра С. Фокса (США) за *pts*1- и *pts*H-мутанты.

Институт эпидемиологии и микробиологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
14 IV 1976

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Roseman, J. Gen. Physiol., v. 54, 138 (1969).
- ² H. L. Kornberg, Proc. Roy. Soc. Lond. B., v. 183, 105 (1973).
- ³ W. Epstein, S. Jewett, C. F. Fox, J. Bacteriol., v. 104, 793 (1970).
- ⁴ В. Н. Гершанович, Н. В. Юровицкая, Г. И. Бурд, Мол. биол., т. 4, 534 (1970).
- ⁵ Г. И. Бурд, Т. Н. Большакова и др., Мол. биол., т. 5, 384 (1971).
- ⁶ R. J. Wang, H. G. Morse, M. L. Morse, J. Bacteriol., v. 104, 1318 (1970).
- ⁷ R. Dahl, H. G. Morse, M. L. Morse, Molec. Gen. Genet., v. 129, 1 (1974).
- ⁸ В. Н. Гершанович, Н. В. Юровицкая и др., В сб.: Молекулярные механизмы генетических процессов, М., «Наука», 1972.
- ⁹ M. Berman, N. Zwaig, E. C. C. Lin, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 38, 272 (1970).
- ¹⁰ R. Dahl, R. J. Wang, M. L. Morse, J. Bacteriol., v. 107, 513 (1971).
- ¹¹ V. N. Gershanovitch, G. I. Bourd et al., Biochim. et biophys. acta, v. 134, 188 (1967).
- ¹² I. Pastan, R. L. Perlman, J. Biol. Chem., v. 244, 5836 (1969).
- ¹³ J. Beckwith, T. Grodzicker, R. Arditti, J. Mol. Biol., v. 69, 155 (1972).
- ¹⁴ S. L. Putnam A. L. Koch, Anal. Biochem., v. 63, 566 (1975).
- ¹⁵ G. I. Bourd, R. S. Erlagaeva et al., Europ. J. Biochem., v. 53, 419 (1975).