

Дослідження експресії гена екзопектатліази *pelX* *Klebsiella oxytoca* VN13

О. В. Лар, Г. Л. Ковтунович, Н. О. Козировська

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Методом хроматографії на папері встановлено, що пектатліаза PelX K. oxytoca VN13 за субстратною специфічністю належить до екзопектатліаз. Для аналізу експресії pelX гена створено гібридну конструкцію, яка містить регуляторну ділянку pelX та кодуєчу частину гена β-галактозидази lacZ. За характером експресії β-галактозидази в K. oxytoca VN13, трансформованої даною конструкцією, виявлено високий конститутивний рівень експресії lacZ гена з pelX промотору, а також його слабку здатність до активації за присутності індукторів рослинного походження. Отримано також дані стосовно регуляції експресії генів пектинолілізу K. oxytoca VN13 рослинними продуктами, що дозволяє цій бактерії утворювати з вищими рослинами стійкі асоціації.

Ключові слова: Klebsiella oxytoca VN13, екзопектатліаза, ген pelX.

Вступ. Пошук генетичних детермінант пектолітичної активності ендоситної бактерії *K. oxytoca* VN13 як можливих факторів її вірулентності дозволив встановити наявність у даної бактерії принаймні двох типів пектолітичних ферментів — пектатліази і полігалактуронази [1]. Клонування *pelX* гена *K. oxytoca* VN13, який кодує пектатліазу [2], і створення мутантного штаму з інактивованою хромосомною копією *pelX* дозволило ідентифікувати присутність у геномі *K. oxytoca* VN13 додаткового пектатліазного гена, що не має гомології з *pelX* геном за нуклеотидною послідовністю.

Дану роботу присвячено дослідженню характеру експресії *pelX* гена порівняно з загальною пектатліазною активністю *K. oxytoca* VN13 для визначення можливої ролі продукту гена *pelX* у процесі взаємодії *K. oxytoca* VN13 з рослиною.

Матеріали і методи. *Бактеріальні штами і плазміди*, які використано в роботі, наведено в табл. 1.

Бактеріальні середовища і умови вирощування. Для вирощування бактерій застосовували середовище LB і мінімальне середовище M9 [6]. Антибіотики ампіцилін і рифампіцин використовували в концентрації 100 мкг/мл, канаміцин — 50 мкг/мл, хлорамфенікол — 60 мкг/мл.

Генно-інженерні методи. Виділення плазмід і хромосомної ДНК, гідроліз ендонуклеазами рестрикції, лігування, гель-електрофорез та елюцію ДНК з гелю здійснювали за стандартними методами [7]. Для отримання компетентних клітин бактерій і трансформації користувалися методом Нішімури [8].

Біохімічне визначення пектатліазної та β-галактозидазної активності. Загальну пектатліазну активність у лізатах бактеріальних культур знаходили за методом, що базується на спектрофотометричному моніторингу вивільнення ненасичених продуктів з полігалактуронату натрію, які мають максимум поглинання при 235 нм [9]. За одиницю активності брали кількість ферменту, що вивільняє 1 мкмоль ненасичених уронідів з полігалактуронату за 1 хв.

Таблиця 1
Використані штами і плазміди

Штам	Фенотип збо генотип	Джерело
<i>Escherichia coli</i> JM109	thi, Δ(lac-proAB), F' [proD36, proAB+, lacI ^{qz} -M15]	Колекція відділу
<i>Klebsiella oxytoca</i> VN13	Ap ^R	Колекція відділу
<i>pPL11</i>	Ap ^R	[1]
<i>pUC28</i>	Ap ^R	[3]
<i>pGalQ</i>	Ap ^R	Дана робота
<i>pGalP</i>	Ap ^R	Дана робота
<i>pCB192</i>	Ap ^R	[4]
<i>pDK5</i>	Ap ^R	[5]

β -Галактозидазну активність у лізатах бактеріальних культур вимірювали, використовуючи методику, яка ґрунтується на спектрофотометричному моніторингу вивільнення забарвленого продукту (о-нітрофенолу) з безбарвного о-нітрофеніл- β -D-галактопіранозиду (ОНПГ) з максимумом поглинання при 420 нм [6]. За одиницю активності брали кількість ферменту, яка вивільняє 1 мкмоль о-нітрофенолу за 1 хв.

Литому активність ферментів виявляли, перераховуючи загальну активність ферменту на 1 мл бактеріальних лізатів, вирівняних за оптичною густиною.

Отримані результати обробляли статистично за допомогою програми SigmaPlot. Вибірка складала не менш ніж чотири повторності.

Хроматографія на папері. Хроматографію на папері здійснювали за методикою Цинка [10]. Як контроль при проведенні хроматографії використовували продукти реакції, що утворювалися при дії ендополігалактуранази (3.2.1.15) з *Rhizopus* sp. («Sigma», США). Реакцію з полігалактураназою проводили за методикою Насуно [11].

Рослинний екстракт виготовляли, розтираючи в ступці 1 г сирової маси корінців двотижневих паростків пшениці з додаванням 1 мл дистильованої води. Отриманий екстракт стерилізували фільтруванням. Даний розчин вважали за 100 %.

Результати і обговорення. *Встановлення субстратної специфічності PelX.* Для визначення субстратної специфічності ферменту, який кодується клонованим нами *pelX* геном *K. oxytoca* VN13 [1], проведено хроматографічний аналіз продуктів,

що утворюються при дії *PelX* на полігалактуронат натрію (ПГН). Використовували лізати нічних культур бактерій *Escherichia coli*, трансформованих плазмідом *pPL11*, що містить повну послідовність *pelX* гена [2]. До реакційної суміші додавали бактеріальний лізат у співвідношенні 1:9, 1:19, 1:39 для того, щоб прослідкувати динаміку утворення продуктів реакції. Для порівняння проводили реакцію з комерційною ендополігалактураназою з *Rhizopus* sp. (КФ 3.2.1.15), додаючи до реакційної суміші водний розчин полігалактуранази в концентрації 0,5; 0,125; 0,3 і 0,08 мг/мл. Після інкубації при температурі 37 °C протягом 12 год суміш краплями наносили на хроматографічний папір (рис. 1).

З даних рис. 1 видно, що при поступовому зменшенні концентрації ПГН у реакційній суміші характер продуктів, які утворює *PelX*, не змінюється, що свідчить про екзосубстратну специфічність згаданого ферменту. Продуктом реакції в цьому разі є лише димери галактуранової кислоти з ненасиченим 4,5-зв'язком на невідновлювальному кінці. У той же час ендополігалактураназа при дії на той самий субстрат розщеплює його до олігомерних продуктів, розмір яких поступово зменшується за рахунок подальшого розщеплення. Кінцевим продуктом є димери галактуранової кислоти.

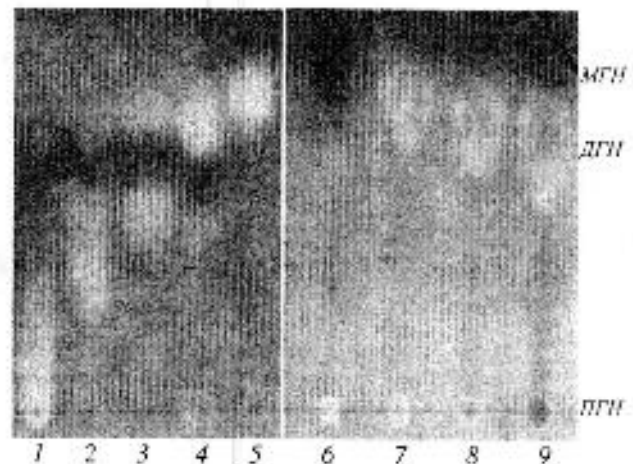


Рис. 1. Субстратна специфічність *PelX* *K. oxytoca* VN13, визначена методом хроматографії на папері: 1–4 — розведення реакційної суміші з полігалактураназою; 5 — моногалактуронат; 6 — реакційна суміш без додавання бактеріального лізату; 7–9 — розведення реакційної суміші з пектатліазою. Продукт у точці старту — полігалактуронат натрію (ПГН); МГН — моногалактуронат натрію; ДГН — дигалактуронат натрію

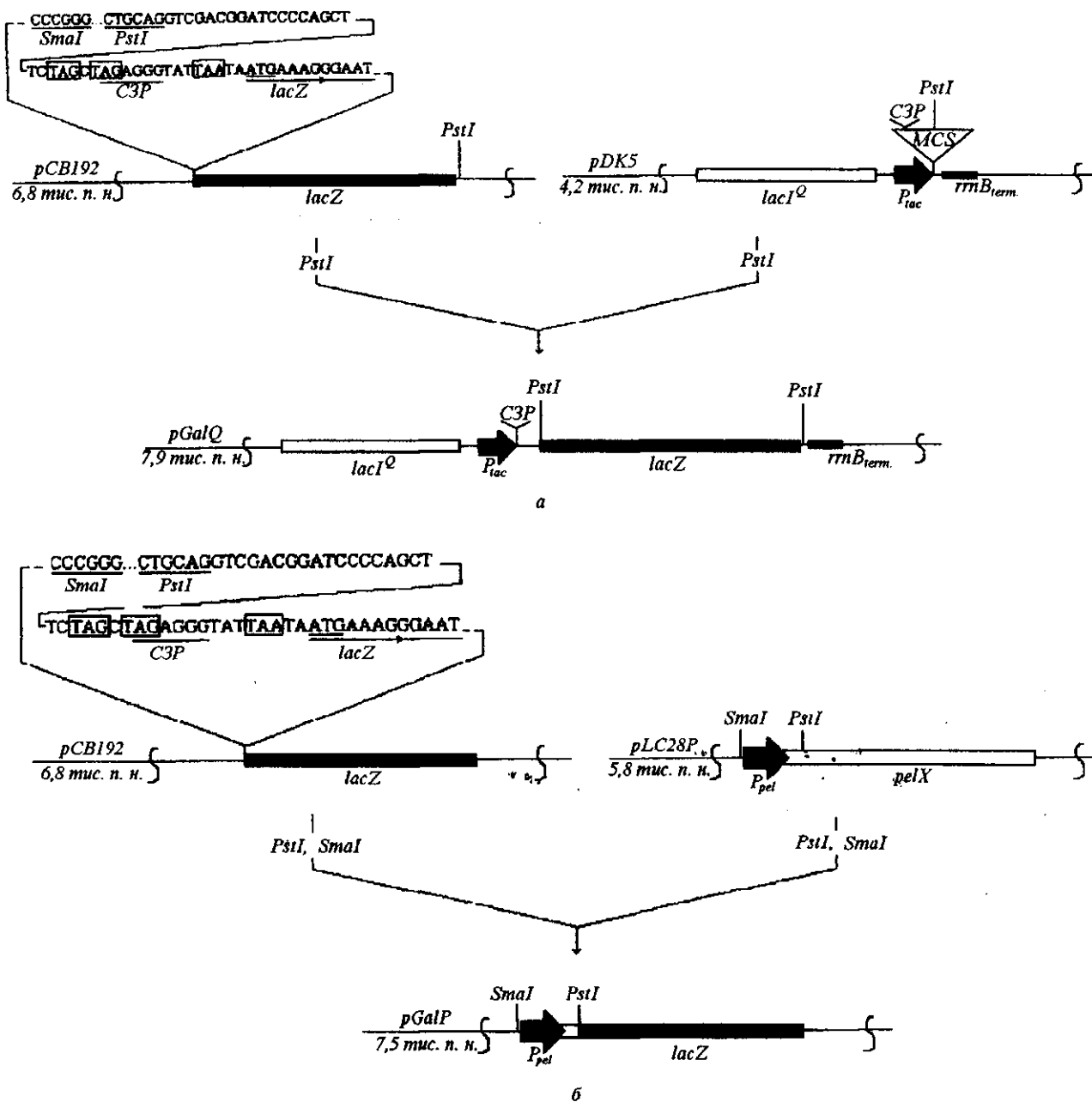


Рис. 2. Схема створення гібридної конструкції, яка містить кодуючу ділянку гена β-галактозидази *lacZ* під P_{tac} промотором (а) та цю ж ділянку разом з регуляторною областю *pelX* (б). СЗР — сайт зв'язування з рибосомою; MCS — полілінкер; стоп-кодони в полілінкері pCB192 взято в рамки

Перевірка експресії гена *lacZ*, який міститься у плазміді pCB192. Вектор pCB192 використовували для створення гібридної конструкції, до складу якої входить *lacZ* ген під *pelX* промотором (рис. 2, а). Даний вектор дозволяє експресію *lacZ* гена за умови наявності промотору перед його кодуючою послідовністю. Три стоп-кодони TAG, TAG і TAA, а також сайт зв'язування з рибосомою розташовані

таким чином, що дозволяють трансляцію негібридного LacZ навіть при умові клонування вище *lacZ* промоторної ділянки досліджуваного гена разом з частиною його кодуючої послідовності.

Для перевірки β-галактозидазної активності, що кодується *lacZ* геном у складі плазміді pCB192, створено гібридну конструкцію, яка містить зазначений *lacZ* ген під P_{tac} промотором у складі вектора

Таблиця 2
β-Галактозидазна активність *E. coli* JM109 з плазмідами *pGalQ* та *pCB192*

Індуктор	β-Галактозидазна активність, мкМ · хв ⁻¹ · мл ⁻¹	
	<i>pCB192</i>	<i>pGalQ</i>
Контроль (без IPTG)	0	0,02
1 мМ IPTG	0	4,2

pDK5 (рис. 2, а). На даному векторі розташований промотор P_{lac} та сильний *gntV* термінатор транскрипції. Вектор дозволяє експресію клонованого під P_{lac} промотор гена, який має власний сайт зв'язування з рибосомою і старт-кодон.

PstI фрагмент *pCB192*, що містить повну послідовність *lacZ*, елюювали з агарозного гелю та клонували у вектор *pDK5*, гідролізований *PstI*. Отриманою лігазною сумішшю трансформували компетентні клітини *E. coli* JM109. Бактерії висівали на середовище з ампіциліном, X-Gal та ізопропілтіогалактозидом (IPTG). Робоча концентрація IPTG у даному разі складала 1 мМ, що дозволяє зняти репресію P_{lac} промотору. Цей промотор містить у своїй послідовності оператор для зв'язування LacI-репресора і за відсутності IPTG є зарепресованим, оскільки *lacI* ген, який кодує LacI, знаходиться в складі плазмиди *pDK5*, що гарантує репресію P_{lac} у мультікопійному векторі.

Відібрано два клони трансформантів, які утворювали голубі колонії на середовищі з X-Gal та IPTG, що свідчить про продукування β-галактозидази даними клонами. Оскільки клітини *E. coli* JM109, трансформовані плазмідною *pDK5*, не утворюють забарвлених колоній в аналогічних умовах, то можна стверджувати, що β-галактозидаза у даному випадку продукується створеною гібридною конструкцією на плазміді *pGalQ*. Рестрикційний аналіз підтвердив ідентичність одержаної конструкції очікуваній (даних не наведено).

Конструкцію *pGalQ* біохімічним методом перевірено на наявність β-галактозидазної активності порівняно з вихідною плазмідною *pCB192*. Результати дослідження наведено в табл. 2.

Отримані дані дозволяють зробити висновок про те, що ген *lacZ*, який міститься в плазміді *pCB192*, є функціональним.

Створення гібридної конструкції, яка містить регуляторну ділянку *pelX* і кодуєчу частину гена β-галактозидази *lacZ*. Для одержання даної

конструкції використано плазмиду *pCB192*. Унікальні *PstI* і *SmaI* сайти знаходяться в полілінкері *pCB192* на відстані 48 нуклеотидних пар (н. п.) один від одного, що дозволяє здійснити ефективний подвійний гідроліз плазмиди рестриктазами *PstI* і *SmaI*. Джерелом промоторної частини *pelX* була плазмиди *pLC28P*, яка містить фрагмент хромосомної ДНК *K. oxytoca* VN13 з повною послідовністю *pelX* гена та прилеглих некодуєчих ділянок [1]. *pLC28P* гідролізували рестриктазами *PstI* і *SmaI*, в результаті чого отримано фрагмент розміром 700 н. п., який включав ділянку розміром 608 н. п. вище старт-кодону *pelX* та 92 н. п. його кодуєчої частини (рис. 2, б). Серед отриманих клонів трансформантів виявлено два, які давали голубе забарвлення колоній на X-Gal. Обидва позитивних клони було перевірено рестриктним аналізом та підтверджено їхню ідентичність, а також відповідність отриманої конструкції очікуваній. Подальшу роботу проводили з одним клоном. Створена конструкція отримала назву *pGalP*.

Вивчення характеру експресії *pelX*. Конструкцію *pGalP* використано для вивчення характеру експресії *pelX* гена, який визначали за рівнем β-галактозидазної активності, при додаванні до середовища для росту бактерій індукторів. Особливу увагу було приділено двом індукторам — ПГН, продукти розщеплення якого відомі як індуктори експресії пектиназних генів фітопатогенних бактерій роду *Erwinia*, та рослинному екстракту, що може містити у своєму складі низькомолекулярні індуктори і також відомий як індуктор експресії пектиназних генів *E. chrysanthemi* та *E. carotovora*.

Для проведення цього дослідження *K. oxytoca* VN13 трансформували *pGalP*. Відомо, що *K. oxytoca* VN13 має свою власну β-галактозидазу, тому загальна β-галактозидазна активність *K. oxytoca* VN13, трансформована *pGalP*, буде складатися з власної β-галактозидазної активності та активності β-галактозидази, яка кодується створеною нами гібридною конструкцією. Враховуючи цей факт, як контроль при проведенні дослідження використовували *K. oxytoca* VN13, трансформовану *pCB192*.

Активність промотору гена *pelX* досліджували в логарифмічній фазі росту бактеріальної культури.

Отримані результати представлено діаграмами на рис. 3.

У дев'ять разів вищий базовий рівень β-галактозидазної активності в *E. coli* (27,55 од.) у порівнянні з експресією даного злиття в *K. oxytoca*

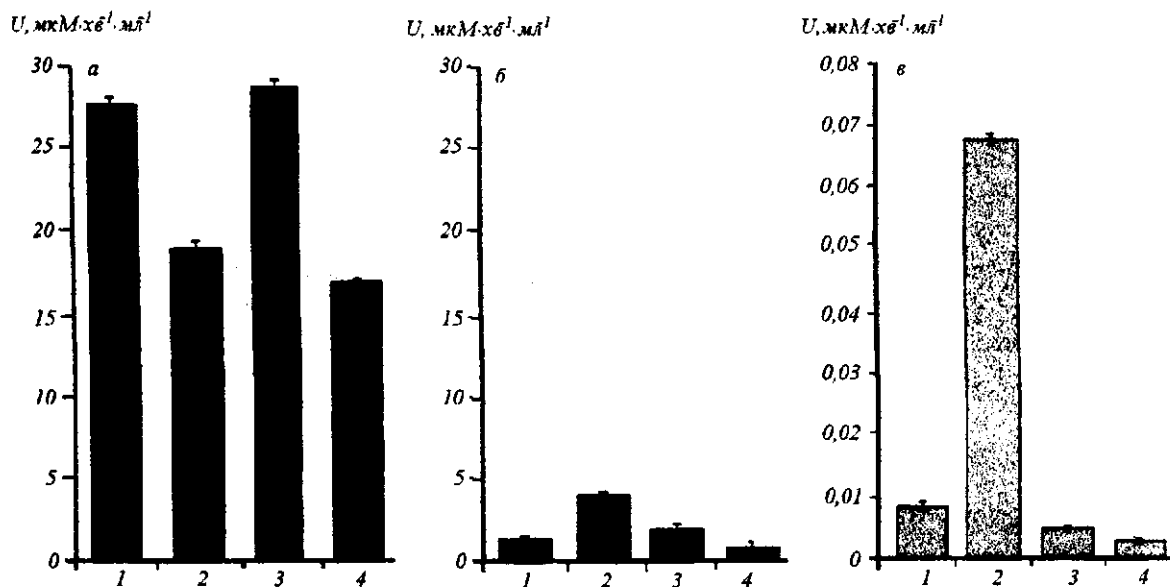


Рис. 3. β -Галактозидазна активність *E. coli* JM109 і *K. oxytoca* VN13, трансформованих *pGalP*, та загальна пектатліазна активність *K. oxytoca* VN13: а — β -галактозидазна активність *E. coli* JM109 (*pGalP*); б — β -галактозидазна активність *K. oxytoca* VN13 (*pGalP*); в — загальна пектатліазна активність *K. oxytoca* VN13 (1—гліцерин; 2—полігалактуронат натрію; 3—рослинний екстракт; 4—глюкоза)

(1,71 од.) свідчить про зарепресованість гена *pelX* в *K. oxytoca* при відсутності індукції. Оскільки субстрат не в повній мірі знімає репресію вказаного гена в *K. oxytoca* VN13, можна припустити існування додаткового негативного регулятора його активності.

Додавання глюкози за наявності в середовищі гліцерину як доступного джерела вуглецю призводить до дворазового зниження активності β -галактозидази в *K. oxytoca* VN13 з 1,71 до 0,79 од., однак наявності в регуляторній ділянці *pelX* гена оператора для БАК не було виявлено.

Полігалактуронат, який додавали до середовища, спричинив дворазове збільшення активності β -галактозидази в *K. oxytoca* VN13 (з 1,71 до 3,97 од.), у той час як загальна пектатліазна активність цієї бактерії зросла у 8,5 разу (з 0,008 до 0,068 од.). Звертає увагу той факт, що оскільки полігалактуронат є складовою частиною клітинної стінки рослин, то така незначна індукваність експресії *pelX* у даних умовах може засвідчувати відсутність будь-якої ролі цього ферменту *K. oxytoca* в процесі внутрішньої колонізації рослин. На користь такого припущення свідчать також отримані нами раніше дані [12] стосовно того, що екзопектинази непатогенних бактерій, зокрема, екзополігалактуроназа *K. oxytoca* VN13 не беруть участі в процесі внутрішньої колонізації рослинних

тканин цією бактерією. За даними літератури, екзопектинази фітопатогенних бактерій роду *Erwinia* залучені до процесу індукції захисної відповіді рослини [13, 14].

Рослинний екстракт, як це видно з діаграм, не впливає на рівень експресії β -галактозидази ні в *E. coli* (27,55 од. на гліцерині та 28 од. при додаванні екстракту), ні в *K. oxytoca* VN13 (1,71 та 1,91 од. відповідно). Найцікавішим виглядає той факт, що додавання рослинного екстракту до середовища призводить до зниження в 1,5 разу загальної пектатліазної активності *K. oxytoca* VN13 (0,008 од. на гліцерині та 0,005 од. при додаванні екстракту) на фоні високого рівня індукції ПГН. Цей результат відрізняється від існуючих в літературі даних щодо індукції експресії пектатліазних генів *E. chrysanthemi* і *E. carotovora*, загальна пектатліазна активність яких значно збільшується у присутності рослинного екстракту [15, 16].

Суттєвий рівень конститутивного синтезу *PelX* та низький рівень індукції *pelX* гена при додаванні субстрату може вказувати на роль *PelX* як ініціатора процесу пектинолізу. Незначна кількість продуктів розщеплення пектину, що утворюється внаслідок конститутивного синтезу *PelX*, перетворюючись на власне індуктори — 5-кето-4-дезоксиглюконат, 2,5-дикето-3-дезоксиглюконат та 2-кето-3-дезоксиглюконат — дозволяє зняти репресію інших

генів, залучених до процесу деполімеризації клітинної стінки рослини, що входять до складу KdgR регулону.

Пригнічення експресії пектатліазних генів рослинним екстрактом може вказувати на продукування рослиною певних речовин, які контролюють пектолітичну активність ендоефітної бактерії *K. oxytoca*. З одного боку, присутність пектину в середовищі стимулює бактерію до його розщеплення і дозволяє колонізувати рослину, з іншого, — рослинні продукти контролюють підвищення рівня експресії різних генів пектолітичної системи, уникаючи мацерації тканин та підтримуючи чисельність бактерій в асоціації на сталому рівні. Наявність такого механізму дозволила б пояснити, чому навіть при здатності до високого рівня синтезу пектатліаз в умовах повної дерепресії пектиназних генів ендоефітна бактерія *K. oxytoca* VN13, на відміну від фітопатогенних бактерій роду *Erwinia*, не спричинює м'якої гнилі рослин.

O. V. Lar, G. L. Kovtunovych, N. O. Kozzyrowska

Study of exopectate lyase gene of *Klebsiella oxytoca* VN13 expression

Summary

The belonging of the pectate lyase *pelX* of *K. oxytoca* VN13 to the exopectinase group was shown by paper chromatography. For an analysis of the *pelX* expression, fusion of the regulatory region of *pelX* and the coding part of reporter gene *lacZ* was constructed. The high constitutive level of the *pelX* expression and its slight inducibility in the presence of plant inducers was determined by the character of the fusion expression in *K. oxytoca* VN13. The data on regulation of the expression of pectinolytic genes of *K. oxytoca* VN13 by plant products were obtained.

Key words: *Klebsiella oxytoca* VN13, exopectate lyase, *pelX* gene.

E. B. Lar, G. L. Kovtunovych, N. A. Kozzyrowskaya

Исследование экспрессии гена экзопектатлиазы *pelX* *Klebsiella oxytoca* VN13

Резюме

Методом хроматографії на бумазі встановлено, що пектатліаза *PelX* *Klebsiella oxytoca* VN13 по субстратній специфичності відноситься до екзопектатліаз. Для аналізу експресії *pelX* гена створена гібридна конструкція, що містить регуляторну область *pelX* і кодуючу частину гена β-галактозидази *lacZ*. По характеру експресії β-галактозидази в *K. oxytoca* VN13, трансформованій даною конструкцією, определено високий конститутивний рівень експресії *lacZ* гена з *pelX* промотора, а також його слабка індукційність в присутстві індукторів рослинного походження. По-

лучены данные о регуляции экспрессии генов *K. oxytoca* VN13 растительными продуктами, что позволяет этой бактерии создавать с высшими растениями стойкие ассоциации симбиотического характера.

Ключевые слова: *Klebsiella oxytoca* VN13, экзопектатлиаза, ген *pelX*.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kovtunovych G., Lar O., V. Kordyum, Kleiner D. Enhancing the internal plant colonization rate with endophytic nitrogen-fixing bacteria // Biopolimery i Kletka.—1999.—15, N 4.—P. 300—306.
2. Lar O. B., Kovtunovych G. L., Kozzyrowska N. O. Клоновання і аналіз гена пектатліази *pelX* *Klebsiella oxytoca* VN13 // Біополімери і клітина.—2002.—№ 5.—С. 417—422.
3. Benes V., Hostomsky Z., Arnold L., Paces V. M13 and pUC vectors with new unique restriction sites for cloning // Gene.—1993.—130, N 1.—P. 151—152.
4. Shneider K., Beck C. High copy number vector for fusion gene expression // Gene.—1985.—42, N 1.—P. 37—48.
5. Kleiner D., Paul W., Merrick M. Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria // J. Gen. Microbiol.—1988.—134.—P. 1779—1784.
6. Miller J. Experiments in molecular genetics.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1972.—431 p.
7. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
8. Nishimura A., Morita M., Sugino Y. Rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells // Nucl. Acids Res.—1990.—18, N 20.—P. 6169.
9. Starr M., Chatterjee A., Starr P., Buhanan G. Enzymatic degradation of polygalacturonic acid by *Yersinia* and *Klebsiella* species in relation to clinical laboratory procedures // J. Clin. Microbiol.—1977.—N 6.—P. 379—386.
10. Zink R., Chatterjee A. Cloning and expression in *Escherichia coli* of pectinase genes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Appl. Environ. Microbiol.—1985.—49, N 3.—P. 714—717.
11. Nasuno S., Starr M. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora* // J. Chem.—1990.—41.—P. 5298—5306.
12. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // Gene.—1985.—33, N 1.—P. 103—119.
13. Kovtunovych G. L., Lar O. B., Kozzyrowska N. O. Роль гена екзополігалактуронази у процесах взаємодії *Klebsiella oxytoca* VN13 з коренями проростків пшениці // Біополімери і клітина.—2002.—18, № 4.—С. 319—323.
14. Hugouvioux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* // Annu. Rev. Microbiol.—1996.—50.—P. 213—257.
15. Shevchik V., Kester H., Benen J. Characterisation of the exopolygalacturonat lyase *pelX* of *Erwinia chrysanthemi* 3937 // J. Bacteriol.—1999.—181, N 5.—P. 1652—1663.

УДК 577.113.5
Надійшла до редакції 26.06.04