

УДК 579.887.111.22:576.8.095.3:577.1

ПРОДУКУВАННЯ ПОЗАКЛІТИННОЇ ФРУКТОЗОБІСФОСТАЗИ ЯК СПІЛЬНА РИСА ФІТОПАТОГЕННИХ АХОЛЕПЛАЗМ І ДЕЯКИХ СПОРОНОСНИХ БАКТЕРІЙ

К.С. Коробкова, І.Г. Скрипаль, Л.П. Панченко, Л.П. Маліновська, І.П. Токовенко, О.В. Ястребова

*Продуктування позаклітинної фруктозобісфосфатази як спільна риса фітопатогенних ахолеплазм і деяких спороносних бактерій. – К.С. Коробкова, І.Г. Скрипаль, Л.П. Панченко, Л.П. Маліновська, І.П. Токовенко, О.В. Ястребова. – Одержано очищені препарати позаклітинних фруктозобісфосфатаз фітопатогенного штаму молікутів - *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 і його можливого філогенетичного предка *Bacillus subtilis* 668. Для ФБФаз молікута і бацил оптимальними є рН 7.3-7.5 і 8.8-9.0 і температура 32оС і 45оС, відповідно. Вивчення впливу різних ефекторів на активність ферментів підтвердило їх подібність при деяких розбіжностях реакції на них з боку ФБФаз. Молекулярні маси нативних позаклітинних ФБФаз є ідентичними – 230±5 кДа, фермент складається з 4 рівних субодиниць: у *A. laidlawii* var. *granulum* шт.118 – 56.6 кДа, у *B. subtilis* 668 – 63 кДа. У двох ферментах доведено присутність спільних антигенних детермінант. Зроблено висновок, що наявність позаклітинної ФБФази з подібними властивостями підтверджує спільне походження цих мікроорганізмів.*

Ключові слова: позаклітинна фруктозобісфосфатаза, глюконеогенез, ферментативна активність, хелатори, ефектори.

Адреса: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Д 03680, Київ МСП, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: howk76@mail.ru.

*Production of extracellular fructose-bisphosphatase as the common characteristic of phytopathogenic acholeplasma and some sporeforming bacteria – K.S. Korobkova, I.G. Skripal', L.P. Panchenko, L.P. Malynovska, I.P. Tokovenko, O.V. Yastrebova. – It was obtained the purified preparations of extracellular fructose-bisphosphatases from phytopathogenic strain of mollicutes - *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* str.118 and its possible phylogenetic ancestor *Bacillus subtilis* 668. For FBFPases from mollicutes and bacilli optimum was pH 7.3-7.5 and pH 8.8-9.0 and temperature 32o C and 45o C, correspondently. Study of different effectors action to activity of enzymes demonstrated a similarity (with some differences) of FBFPase reaction to they. Molecular weights of both extracellular FBFPases was identical and ranged 230 ±5 kDa, enzymes consisted of 4 equal subunits: *A. laidlawii* var. *granulum* str. 118 - 56.6 kDa and *B. subtilis* 668 – 63 kDa. The common antigen determinants in both enzymes were demonstrated. It was concluded that the presence of extracellular FBFPases with similar properties proves a common origin of these microorganisms.*

Key words: extracellular fructose bisphosphatase, gluconeogenesis, enzymes activity, effector.

Address: Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, Zabolotnogo str., 154, D 03680, Kiev, Ukraine, e-mail: howk76@mail.ru.

Вступ

Молікути (мікоплазми) – це найпростіше організовані прокаріотичні мікроорганізми з найменш відомим на цей час геномом, здатні до самостійної репродукції, вони позбавлені клітинної стінки і не синтезують її біохімічні попередники. Представники класу Mollicutes є убіквітними (всюдисущими) організмами, які як факультативні паразити або коменсали існують всередині різних макроорганізмів – тварин, комах, людини, рослин тощо. Проте також встановлено їх здатність і до сапрофітного існування на поверхневих тканинах рослин. Відомо понад 600 захворювань рослин з 96 родин, які спричиняються молікутами. Симптоматика захво-

рювання залежить від конкретної рослини і виду молікута, а фітопатогенез значною мірою визначається реакціями фітоімунітету [1,3,12].

Було показано, що фітопатогенний молікут *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт.118 при культивуванні на штучному середовищі продукує зовні лектин, специфічний до фруктозобісфосфату (ФБФ). Високий ступінь специфічності і той факт, що лектин є позаклітинним, вказує на його особливу роль у процесі життєдіяльності даного молікута – цій речовині властиво функціонувати як лектин і як фермент фруктозобісфосфатаза (ФБФаза) одночасно [7]. Відомо, що ФБФаза є ключовим ферментом в процесі синтезу

глюкози з неуглеводних попередників – глюконеогенезі, життєво необхідним для мікроорганізмів, оскільки знаходиться у вирішальній точці вуглеводного обміну і утворюється при їх глюконеогенічному рості [5,8,11].

Висунуто гіпотезу, згідно якої мікоплазми, які потрапляють у елементи флоєми рослин, починають активно в ній розмножуватись і екскретувати ФБФазу. При цьому ФБФаза молікутів знижує рівень ФБФ у рослинах, порушуючи біохімічні процеси регуляції фотосинтезу у хлоропластах. Оскільки механізми регулювання активності ФБФаз еукаріотів і прокаріотів значно відрізняються [11], то функціонування чужорідного, нерегульованого рослиною ферменту призводить до постійного накопичення крохмалю в клітинах, що спричиняє порушення цілісності хлоропластів. Внаслідок цього виникає хлороз листя, що є одною з головних ознак „жовтяниць” рослин, які спричиняють фітопатогенні молікути [13,14].

Вважають, що філогенетичними предками молікутів є представники роду *Bacillus* [15]. У зв'язку з цим метою нашої роботи було провести порівняльне вивчення властивостей позаклітинних ФБФаз *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт.118 і *Bacillus subtilis* (якщо такий фермент є в цього мікроорганізму) для виявлення фенотипового прояву їх генетичної спорідненості. Слід зазначити, що дослідження ФБФаз, що продукуються клітиною зовні, іншими авторами до цього часу не проводилося.

Матеріали та методи

У дослідженнях використовували культури *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 і *Bacillus subtilis* 668 з колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Клітини ахолеплазм вирощували у рідкому живильному середовищі СМ ІМВ-72 протягом 48 год, а бацил – у середовищі Гаузе з 1% гліцерину протягом 21 год. У дослідженнях використовували надосадову рідину після центрифугування ахолеплазм протягом 15 хв при 15000 об/хв, бацил – 20 хв при 6000 об/хв.

Препарати очищеної позаклітинної ФБФази отримували, як описано раніше [4,16]. Активність ферменту визначали за методом Фіске-Суббароу [2]. За одиницю активності ФБФази приймали її кількість, яка забезпечує вивільнення 1.0 мкМ неорганічного фосфору за 1 хв. Питому активність виражали кількістю одиниць ферменту на 1.0 мг білку. Білок визначали за методом Bredford [9].

Молекулярну масу позаклітинної ФБФази мікроорганізмів визначали у нативних умовах шляхом хроматографії очищених препаратів ферменту на колонці з наповненням Сефадекс G-

200 (“Pharmacia”, Швеція) [6]. Молекулярну масу субодиниць ферменту досліджували за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі у денатуруючих умовах [6]. Серологічну спорідненість вивчали за реакцією подвійної імунодифузії в агарі за Ouchterlony [10].

Результати досліджень та їх обговорення

З середовища культивування *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 і *B. subtilis* 668 були отримані препарати позаклітинних ФБФаз з високим ступенем очищення (у 176.4 і 165 разів, відповідно) і питомою активності (148.2 од/мг білку і 52.9 од/мг білку, відповідно) (Таблиця). Слід відзначити, що при всіх вивчених температурних умовах культивування мікроорганізмів накопичення у середовищі позаклітинної ФБФази цілком відповідало їх фізіологічному стану – максимальна екскреція ферменту спостерігалася у фазі логарифмічного росту.

Для обох споріднених мікроорганізмів було вивчено вплив різних значень рН і температури на активність одержаних препаратів позаклітинних ФБФаз. Встановлено, що для найвищої активності ферменту *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 оптимальними є рН 7.3-7.5 і температура реакції 32оС, тоді як для ФБФази *B. subtilis* 668 – рН 8.8-9.0 і температура 45оС, тому першу віднесено до нейтральних фосфатаз, а іншу – до лужних.

Вперше було вивчено вплив на позаклітинну ФБФазу низки речовин, які найчастіше використовувалися іншими авторами для вивчення властивостей ендогенних ФБФаз, виділених з тканин тварин, рослин і мікроорганізмів. Для ферменту *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 встановлено, що катіони калію, марганцю, магнію, амонію, талію підвищують її активність, а катіони літію є інгібіторами. Хелатори (ЕДТА, цитрат, фосфоенолпіруват, імідазол, гістидин) лише у незначній мірі (на10-20%) активують цей фермент. При дослідженні впливу аденозин-5'-монофосфату (АМФ) і фосфоенолпірувату (ФЕП) встановлено, що при індивідуальному випробуванні в концентрації до 20мкМ вони практично не впливають на активність позаклітинної ФБФази ахолеплазм, а при більш високих концентраціях різко її знижують (200 мкМ АМФ – на 70%, а ФЕП – на 75%). При сумісному випробуванні ФЕП і АМФ (200 і 500 мкМ, відповідно) спостерігали взаємну нейтралізацію дії цих речовин на ФБФазу.

Катіони цинку, на відміну від інших випробуваних металів, у низьких концентраціях (0.1-0.2 мкМ) здатні інгібувати активність ФБФази, але при підвищенні концентрації (6 мкМ і більше) значно активують фермент. Катіони срібла в концентраціях до 20 мкМ помірно стимулюють активність ФБФази, і навіть при підвищенні концентрації до 200 мкМ активність фермента знижується лише на 50%.

Таблиця. Порівняльна характеристика препаратів позаклітинних фруктозобісфосфатаз *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт.118 і *Bacillus subtilis* 668

Характеристика ферменту	<i>Acholeplasma laidlawii</i> var. <i>granulum</i> шт.118	<i>Bacillus subtilis</i> 668
Чистота препарату	176.4	165
Питома активність	148.2 од./мг білку	52.9 од./мг білку
Оптимум рН	7.3-7.5	8.8-9.0
Температурний оптимум	32°C	45°C
Вплив катіонів: калію, натрію, марганцю, магнію, амонію, талію, літію, цинку, срібла, заліза (II), міді	активує не впливає активує активує активує активує інгибує до 0.2 мкМ – інгибує, а понад 6 мкМ- активує до 20 мкМ незначно активує, а понад- інгибує не впливає не впливає	активує не впливає активує активує активує активує інгибує інгибує активує не впливає не впливає
Вплив АМФ	до 20мкМ не впливає, при 200мкМ - інгибує	інгибує
Вплив хелаторів: ЕДТА, цитрату, ФЕП, імідазолу, гістидину	активує активує понад 200 мкМ – інгибує активує активує	активує активує активує активує активує
Вплив суміші реагентів АМФ+ФЕП	не впливає	не впливає
Молекулярна маса ферменту	230 ± 5 кДа	230 ± 5 кДа
Кількість субодиниць	4	4
Молекулярна маса субодиниць	56.6 кДа	63 кДа

Для позаклітинної ФБФази *B. subtilis* 668 були встановлені такі регуляторні показники: максимальна активність ферменту спостерігається при концентрації субстрату (ФБФ) 2x10-3М, але за наявності ЕДТА як хелатуючого агента й іонів магнію його оптимальна концентрація складає 5x10-3М.

Встановлено, що для ФБФази даного мікроорганізму інгібітором також є АМФ. Однак цей ефект зникає при доданні у реакційну суміш ФЕП, який, на відміну від дії на фермент фітопатогенного молікута, не здатний самостійно впливати на активність ФБФази бацил. Збільшення концентрації катіонів магнію до 10 мМ також сприяє зниженню чутливості ферменту до інгібуючої дії АМФ. Активність позаклітинного ферменту *B. subtilis* 668 абсолютно залежить від присутності двовалентних катіонів магнію і марганцю, крім того, підвищується при доданні у реакційну суміш хелатуючих агентів – ЕДТА, цитрату, фосфоенолпірувату, імідазолу, гістидину.

Випробування іонів важких металів показало, що катіони заліза (II), міді та цинку в концентрації 10-4М не проявляють інгібуючої дії за умов наявності іонів магнію й ЕДТА. Слід відзначити, що, на відміну від ФБФази *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118, за відсутності магнію у лужному середовищі фермент бацил навіть

активується цинком у низьких концентраціях (при 10-4М – на 30-40%, а при 10-3 -10-2М – на 10-15%). При підкисленні реакційної суміші до рН 6.0 при доданні цинку в концентрації 10-4М активність ФБФази змінюється несуттєво, проте внесення у реакційну суміш 1.6 мМ ЕДТА активує фермент у 3-4 рази. Моновалентні катіони (натрій, талій, калій, амоній) у низьких концентраціях здатні незначно активувати ФБФазу бацил, а при високих концентраціях вони діють як інгібітори. На відміну від цього, іони срібла у низькій концентрації не впливають на активність ферменту, а при підвищенні її до 50x10-3М активують його триразово. Стабільно інгібували активність ферменту катіони літію.

Хроматографічний аналіз очищених препаратів позаклітинної ФБФази *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 і *B. subtilis* 668 дозволив визначити молекулярні маси нативних ферментів обох мікроорганізмів, які виявилися ідентичними і склали 230±5 кДа. Дослідження субодиничного складу ФБФаз показало, що фермент кожного мікроорганізму є тетрамером, у якого маса субодиниці становить: для *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 - 56.6 кДа, а для *B. subtilis* 668 – 63 кДа. Отже, за своїми молекулярно-біологічними властивостями, молекулярною масою і субодиничною структурою позаклітинна фруктозобісфосфатаза обох мікроорганізмів

займає проміжне положення серед аналогічних, але внутрішньоклітинних ферментів інших прокариотів [7]. Порівняно з молекулярними масами ендо-ФБФази іншого штаму *B. subtilis*, а також *B. licheniformis* вона в нативному стані є майже вдвічі меншою, а відносно ферменту представника еукаріотів – *Candida utilis* (100 кДа) – у понад два рази більшою. За субодиничним складом екзогенна ФБФаза *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 і *B. subtilis* 668 також займає проміжне положення серед внутрішньоклітинних ферментів такої самої специфічності інших прокариотичних мікроорганізмів, які, за звичай, мають від 2 до 6 субодиниць [5,8]. Дослідження серологічної спорідненості між ФБФазами,

одержаними з середовищ культивування фітопатогенного молекута і представника роду *Bacillus* показало, що ферменти даних мікроорганізмів, хоча і не є ідентичними, але мають спільні антигени.

Таким чином, наявність позаклітинної ФБФази у фітопатогенного молекута *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 і представника роду *Bacillus* - *B. subtilis* 668 з подібними молекулярними масами, фізико-хімічними властивостями і антигенними детермінантами при деяких їх розбіжностях є фенотипним проявом генетичної спорідненості і може розглядатися як додатковий доказ спільного походження даних мікроорганізмів.

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. // Санкт-Петербург: Наука. 2002. 319 с.
2. Лурье Ю.Ю. Метод Фиске-Суббароу // Унифицированные методы анализа вод: М.: Химия. 1985.- С.206-208.
3. Скрипаль І.Г. Молекути як збудники захворювань тварин, комах і рослин // Агрокол. журн.- 2005.- № 1.- С.7-15.
4. Скрипаль І.Г., Токовенко І.П., Малиновська Л.П. Спосіб одержання позаклітинної фруктозобісфосфатази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* um.118 // Мікробіол. журн.- 2005.- 67, № 2.- С.46-54.
5. Скрипаль І.Г., Ястребова О.В. Фруктозо-1,6-бісфосфатаза мікроорганізмів // Мікробіол. журн.-2002.- 65, №2.- С.84-104.
6. Скрипаль І.Г., Малиновська Л.П., Токовенко І.П. Молекулярна маса і субодиничний склад позаклітинної фруктозобісфосфатази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* um.118 // Мікробіол. журн.- 2005.- 67, № 6.- С.73-78.
7. Токовенко І.П., Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П. Вещества с лектиновой активностью, продуцируемые молликутами в среду культивирования // Микробиол. журн. - 1992. - 54, № 3. - С.24-31.
8. Ястребова О.В. Особливості функціонування у мікроорганізмів фруктозо-1,6-бісфосфатази – головного ферменту глюконеогенезу // Укр. біохім. журн.-2002.- 74, № 4.- С.24-32.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein – dye binding // Anal.Biochem.- 1976.- 71, N2.- .248-254.
10. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis // Progr. in Allergy.- 1958.- v. 5.- P.1-78.
11. Pontremoli S., Horecker B.L. Fructose-1,6-diphosphatases // The Enzymes.- 1971.- 4, № 4.- P.611-646.
12. Razin S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*)// Microbiol. Rev.- 1985.- 49.- P.419-455.
13. Skripal' I.G. Fundamental bases of realization of pathogenic potencia by mollicutes, agent of "yellows" diseases of plant (Theory and its experimental proof) // Мікробіол. журн.- 1993.- 55, № 4.- С.102-111.
14. Skripal' I.G. More precise definition of pathogenicity mechanism of mollicutes, agent of plant "yellows" diseases // Мікробіол. журн.- 1997.- 59, № 6.- С.54-62.
15. Woese C.R. Bacterial evolution // Microb. Rev.- 1987.- v. 51.- P.221-271.
16. Yastrebova O.V., Panchenko L.P., Korobkova K.S., Skripal' I.G. Extracellular fructose bisphosphatase of *Bacillus subtilis*: purification and some properties // Наук. вісник Ужгородського університету. Сер. Біол. - 2006.- вип.18.- С.187-191.

Отримано: 07 жовтня 2007 р.

Прийнято до друку: 16 грудня 2007 р.