

See discussions, stats, and author profiles for this publication at:
<https://www.researchgate.net/publication/237048823>

Investigation of Catabolite Repression During E.coli Cultivation on Carbohydrate Mixtures

ARTICLE *in* NAUCHNYE DOKLADY VYSSHEĬ SHKOLY. BIOLOGICHESKIE
NAUKI · JANUARY 1986

READS

5

3 AUTHORS, INCLUDING:



Sergey Kuzmin

20 PUBLICATIONS 5 CITATIONS

SEE PROFILE

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗВИТИЯ КАТАЛИТИВНОЙ РЕПРЕССИИ ПРИ РОСТЕ *ESCHERICHIA COLI* НА СМЕСИ УГЛЕВОДОВ

С. М. Кузьмин, Е. В. Ожиганова, М. П. Дульдьер

Установлено, что во время роста клеток на смесях трех источников углерода (маннит — арабиноза — глицерин, глюкоза — сорбит — глицерин, глюкоза — сорбит — галактоза) компоненты смеси утилизируются последовательно. После исчерпания первого репрессия снимается неселективно с утилизации и второго, и третьего. В дальнейшем после лаг-периода возникает репрессия утилизации третьего источника углерода вторым. Описывается явление «остаточной репрессии», заключающееся в том, что при росте клеток на смеси маннита и сорбита после исчерпания первого углевода клетки не могут начать утилизацию второго.

During the cell growth with mixture of three sources of carbon (mannit — arabinose — glycerol, glucose — sorbite — glycerol, glucose — sorbite — galactose) the components of the mixture have been found to be utilized in series. After using up the first, the repression is eliminated unselectively in utilization both the second and the third. Then after the lag-period the utilization repression of the third carbon source by the second one occurs. The phenomenon of «remaining repression» consisting in that at the cell growth with mixture of mannite and sorbite after using up the first carbohydrate the cells cannot start utilizing the second has been described.

Катаболитной репрессией называют широко распространенное явление подавления источником углерода и энергии экспрессии индуцибельных генов. Катаболитная репрессия неспецифична: она наблюдается не только в отношении ферментов, необходимых для введения субстрата в один из главных путей метаболизма, но и в отношении ферментов аминокислотного обмена, расщепления антибиотиков, морфогенеза [2]. По-видимому, катаболитная репрессия — один из наиболее общих механизмов регулирования метаболизма. Механизмы катаболитной репрессии далеко не выяснены, но роль в ней системы обмена циклического аденозинмонофосфата и пируватзависимой фосфотрансферазной системы можно считать установленной [1, 9, 11]. Хотя феноменология катаболитной репрессии обширна, внимание исследователей в основном сосредоточено на так называемом «глюкозном эффекте», наблюдаемом при синтезе β -галактозидазы (в изучении регуляции этот фермент исторически занял особое место). Катаболитная репрессия ферментов углеводного обмена имеет несколько вариантов проявления в экспериментальных условиях: 1) индукция синтеза β -галактозидазы не происходит, если в культуре клеток одновременно с индуктором добавить глюкозу [4]; 2) в культуре, растущей на глюкозе, индуцируемая активность β -галактозидазы составляет 50 % активности фермента в культуре, растущей на сукцинате [3]; 3) индуцированный синтез β -галактозидазы подавляется добавлением глюкозы [6]; 4) при добав-

лении глюкозы подавляется утилизация клетками источника углерода (галактозы, лактозы, арабинозы, глицерина и др.) [7]; 5) утилизация одного источника углерода подавляется другим при росте культуры на их смеси, а после исчерпания предпочитаемого источника клетки переключаются на утилизацию другого (диауксия) [8]. Эта модель представляется весьма интересной, поскольку в диауксии реализуется весьма важный физиологический процесс — выбор альтернативного источника углерода и энергии. Явление диауксии известно с начала 40-х годов [8]. В дальнейшем оно привлекало внимание исследователей лишь эпизодически и до сих пор осталось изученным недостаточно.

Мы исследовали кинетику экспрессии генов утилизации различных углеводов при росте *Escherichia coli* на их смеси, кинетику развития и снятия репрессии.

Использовали штаммы *E. coli* В и К12 (λ). Разницы в характере диауксии между ними не обнаружено. Минимальные питательные среды готовили добавлением к солевой среде М-9, стерилизованной нагреванием, источников углерода в следующих концентрациях: для двойной смеси — 0,0077 % одного и 0,062 % другого, для тройной смеси — 0,0077 % первого и по 0,031 % второго и третьего. Углеводы дважды перекристаллизовывали из спиртово-водных растворов. Готовую питательную среду повторно стерилизовали микрофильтрацией через мембранные фильтры. В коническую колбу с 250 мл среды вносили выросшую на среде М-9 с 0,4 % глюкозой 18-часовую культуру в концентрации $0,5 \cdot 10^7$ кл/мл. Клетки перед внесением осаждали на микропористый фильтр для освобождения от среды. Культуру выращивали на качалке при температуре 37 °С. Рост регистрировали по оптической плотности при 360 нм, непрерывно прокачивая культуру через кювету проточного регистрирующего спектрофотометра «Uvicord III» (фирмы LKB). Кривая роста имела два участка, разделенных лаг-периодом. Вначале происходила утилизация предпочтительного углевода, а утилизация второго была подавлена. Исчерпание первого источника углерода приводило к снятию репрессии и после лаг-периода продолжению роста на втором. Оптическая плотность, при которой наблюдался лаг-период, была примерно пропорциональна содержанию в среде углевода, использовавшегося первым. Таким образом, устанавливали последовательность утилизации углеводов. Интенсивность экспрессии генов утилизации углеводов оценивали по накоплению в клетках радиоактивности при импульсном (60 с) добавлении к ним соответствующего ^{14}C -углевода. Для этого в различные периоды, соответствующие точкам кривой роста, отбирали по 0,5 мл культуры в предварительно нагретые до 37 °С пробирки, содержащие по 3—10 мкКи меченого углевода, и после 60 с инкубации выливали пробу в замороженную среду М-9. Затем клетки осаждали на микропористый фильтр и промывали на нем холодной средой М-9 от наружной радиоактивности. Так называемую кислоторастворимую радиоактивность, заключенную в низкомолекулярных продуктах внутриклеточного превращения исходного углевода (и в его части, не претерпевшей еще превращений), экстрагировали холодной 0,4 н трихлоруксусной кислотой. На фильтре оставалась «включенная» радиоактивность, представляющая собой часть меченых атомов исходного углевода, включившуюся в высокомолекулярных продуктах обмена (белках, нуклеиновых кислотах и др.) и поэтому нерастворимую в кислоте. Обе части радиоактивности определяли на сцинтилляционном счетчике обычным способом и относили к оптической плотности культуры.

Как видно из таблицы, при росте *E. coli* на смеси источников углерода глюкоза и маннит оказывают подавляющее действие на утилизацию других углеводов. Использование глицерина, наоборот, подавляется почти всеми исследованными углеводами, в то время как глицерин на их утилизацию не влияет.

Особый характер роста *E. coli* выявлен на смеси маннита и сорбита. Отличие заключается в том, что подавление маннитом использования сорбита не снимается после исчерпания самого маннита — культура переходит в стационарную фазу

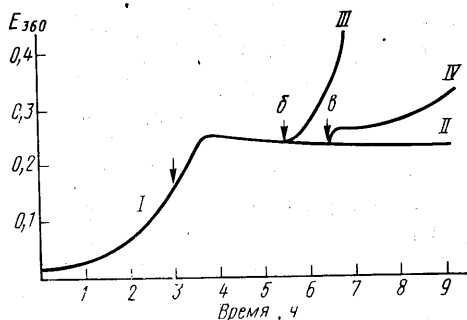


Рис. 1. Рост *Escherichia coli* на смеси маннита (0,0077 %) и сорбита (0,062 %): I — участок роста на манните, II — стационарная фаза (при росте на одном манните, и на смеси маннит — сорбит), III — участок роста после добавления глюкозы, глицерина, IV — участок роста добавленной культуры ($0,5 \cdot 10^7$ кл/мл), выросшей на манните; а — добавление сорбита к культуре, растущей на одном манните, б — добавление глюкозы, глицерина, в — внесение культуры, выросшей на манните

Последовательность использования источников углерода культурой *Escherichia coli* при росте на их смеси

Источник углерода		Лаг-период, мин
I	II	
Глюкоза	Арабиноза*	30
	Сорбит*	20
	Ксилоза*	40
	Лактоза*	18
	Глицерин	25
Маннит	Галактоза*	25
	Арабиноза	15
	Сорбит	∞
	Ксилоза*	21
	Лактоза*	30
Арабиноза	Глицерин	50
	Галактоза	25
	Глицерин	20
	Ксилоза	20
	Глицерин	20
Сорбит	Галактоза	28
	Глицерин	15
	Галактоза	15

* Данные, совпадающие с результатами Ж. Моно [8].

(рис. 1). Поскольку такой тип репрессии не известен, назовем его «остаточной репрессией».

Ниже описаны условия проведения нескольких опытов по изучению свойств остаточной репрессии и представлены полученные в этих опытах результаты.

1. Добавление маннита, глюкозы, глицерина в рабочих концентрациях (0,062—0,0077 %) в стационарной фазе (рис. 1, III) приводит к продолжению роста культуры после небольшого (5—10 мин) лаг-периода. Репрессия, по-видимому, не вызвана каким-либо нарушением обмена.

2. Такое же добавление следовых количеств (0,0007 %) глицерина и углеводов приводит к продолжению роста культуры с использованием сорбита, т. е. следовые количества других источников углерода снимают остаточную репрессию.

3. Свежий сорбит, добавленный к культуре в стационарной фазе, не выводит ее из этой фазы. Иными словами, репрессия не обусловлена превращением сорбита в не утилизируемую форму.

4. Добавление к культуре, росшей до стационарной фазы на одном манните, в стационарной фазе сорбита (рис. 1, III), через 7—8 мин вызывает рост на сорбите. Следовательно, рост на одном манните в отсутствие сорбита не приводит к остаточной репрессии, продукты превращения маннита не служат репрессором.

5. Сорбит, добавленный к растущей на одном манните культуре примерно за 0,6 генерации до стационарной фазы (рис. 1, II), вызывает остаточную репрессию. Значит, для развития последней необходим рост на манните обязательно в присутствии сорбита.

6. Выращенные на манните клетки *E. coli* после посева ($0,5 \cdot 10^7$ кл/мл) на фильтрат из-под стационарной культуры, росшей на смеси маннита и сорбита, имеют нормальный рост. После добавления в стационарную культуру, выросшую на смеси, клеток, выросших на манните (рис. 1, IV), наблюдается нормальный рост только добавленных клеток на оставшемся сорбите. Следовательно, в инкубационной среде репрессор утилизации сорбита отсутствует.

7. Культура, растущая на одном сорбите, после добавления маннита переходит на его утилизацию без лаг-периода, а после его исчерпания (примерно 2 генерации) переключается с 10-минутным лаг-периодом на сорбит. По-видимому, остаточная репрессия зависит и от последовательности включения генов.

Описанные данные свидетельствуют о том, что остаточная репрессия маннитом использования сорбита специфична, поскольку она не касается утилизации других углеводов. Добавление последних к среде даже в следовых концентрациях снимает остаточную репрессию. Возможно, клетки сначала переходят на использование добавленного углевода, а затем уже сорбита. В связи с этим то обстоятельство, что Ж. Моно [8] не наблюдал данного явления, можно объяснить возможным присутствием в малых концентрациях других углеводов. Остаточная репрессия развивается, по-видимому, на внутриклеточном уровне, возможно, на уровне транспорта, и является результатом взаимодейст-

вия между системами утилизации маннита и сорбита — углеводов, представляющих собой цис-, транс-изомеры. Явление остаточной репрессии, возможно, родственно «лактозному убийству», суть которого состоит в том, что дальнейший рост клеток не происходит при переносе их с минимальной среды с низкой концентрацией лактозы (0,02 %) на среду с высокой концентрацией (0,2 %). Это явление связывают с разрушением системы транспорта лактозы [5].

Возвращаясь к данным, представленным в таблице, отметим, что арабиноза, сорбит и ксилоза, с одной стороны, могут быть репрессорами утилизации одних углеводов, а с другой — их собственные системы утилизации могут подавляться другими углеводами. Это обстоятельство позволяет сконструировать метаболическую систему для исследования взаимодействия трех генов, воспроизводящую последовательный рост клеток на трех источниках углерода. Исследован рост на смесях маннит — арабиноза — глицерин, глюкоза — сорбит — глицерин и глюкоза — сорбит — галактоза. Во всех случаях результаты носят сходный характер. В качестве примера на рисунке 2 приводятся данные, полученные при использовании смеси маннит — арабиноза — глицерин. Кривая роста культуры имеет два лаг-периода: первый — после исчерпания маннита, второй — арабинозы. Первый лаг-период интересен тем, что здесь, по-видимому, происходит снятие репрессирующего действия маннита на утилизацию арабинозы и развивается репрессия арабинозой утилизации глицерина. На наш взгляд, в этот период клетки «производят выбор» между двумя источниками углерода и энергии. За ходом этого процесса наблюдали, вводя в среду ^{14}C арабинозу и ^{14}C глицерин, по интенсивности накопления в клетке кислоторастворимой и включенной радиоактивности. На рисунке 2 видно, что после исчерпания маннита в первый лаг-период активируется утилизация и второго, и третьего компонентов, затем утилизация третьего подавляется. Выбор предпочтительного источника углерода заканчивается некоторой стабилизацией уровня его усвоения при одновременном подавлении уровня утилизации глицерина. Таким образом, первый источник углерода одновременно подавляет использование и второго, и

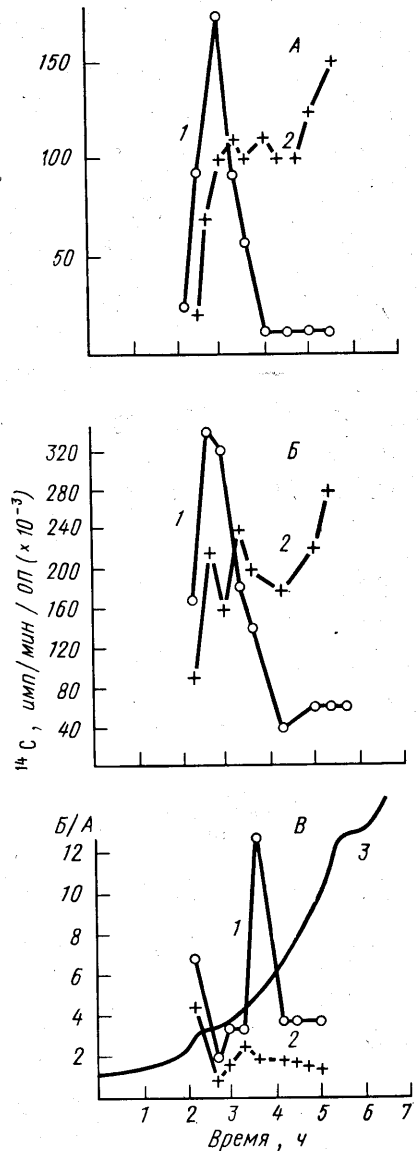


Рис. 2. Изменение включенной (A) и кислоторастворимой (B) радиоактивности клеток *Escherichia coli* при импульсном (60 с) введении меченых арабинозы и глицерина во время роста на смеси маннит — арабиноза — глицерин. B — отношение кислоторастворимая : включенная радиоактивность:

1, 2 — введение глицерина и арабинозы соответственно, 3 — рост культуры (оптическая плотность)

третьего, при его исчерпании снимается репрессия одновременно с утилизации второго и третьего источников. В дальнейшем устанавливается репрессия вторым компонентом утилизации третьего. Из сказанного ясно, что репрессия использования третьего источника углерода является результатом утилизации второго; одного лишь присутствия второго компонента в среде недостаточно.

На рисунке 2, В показано изменение отношения кислоторастворимой радиоактивности к включенной для второго и третьего источников углерода. Это отношение в процессе роста меняется в несколько раз, но всегда остается более высоким для третьего источника. Можно принять, по-видимому, следующую трактовку понятий кислоторастворимой и включенной радиоактивности. Кислоторастворимая радиоактивность характеризует количество источника углерода (углевода), проникшее в клетку и находящееся в ней в виде низкомолекулярных (и поэтому кислоторастворимых) продуктов его превращений. Включенная радиоактивность характеризует количество меченого источника углерода, оказавшееся к моменту фиксации в полимерных (поэтому нерастворимых в кислоте) соединениях, которые при выбранном времени инкубации с меткой (60 с) можно считать (вследствие малой относительной скорости их превращения) конечными продуктами метаболизма источника углерода. Другим конечным продуктом превращения является углекислый газ, который из клетки, однако, выводится и потому в балансе метки не учитывается. При сделанных допущениях следует (см. рис. 2, В), что третий источник углерода по сравнению со вторым (репрессором) превращается в клетке медленнее, так как большая его доля находится в составе низкомолекулярных соединений. Это обстоятельство согласуется с выводом Ж. Моно [8] о том, что при диауксии первым утилизируется углеводов, обеспечивающий более высокую скорость роста.

Катаболитная репрессия при росте клеток на смеси источников углерода позволяет оптимизировать метаболизм в заданных условиях. Как было сказано выше, катаболитная репрессия носит, вероятно, множественный характер, направлена на множество генов. В рамках приведенных экспериментов это выражается в том, что первый источник углерода неспецифически подавляет использование второго и третьего, а репрессия снимается также неспецифично с утилизации и второго, и третьего источников. Неселективность активации генов в лаг-периоде, по-видимому, имеет смысл для ускорения адаптации клеток к новым условиям. Неселективную активацию генов можно объяснить в рамках существующих в настоящее время представлений о механизмах катаболитной репрессии [1] следующим образом. Поскольку уровень цАМФ в лаг-периоде значительно возрастает, а затем снижается [10], концентрация цАМФ позволяет индуцироваться обоим генам. В дальнейшем в результате усвоения источников углерода и энергии активность аденилатциклазы снижается и концентрация цАМФ достигает значения, при котором возможна индукция только второго гена.

В заключение считаем своим долгом выразить признательность Г. П. Бенингу за обсуждение результатов и критические замечания.

Литература

1. Гершанович В. Н., Большакова Т. Н. и др. Транспорт углеводов и регуляция активности катаболитчувствительных генов у *Escherichia coli*. — В кн.: Молекулярные основы генетических процессов. М.: Наука, 1981, с. 37.
2. Еременко В. В., Николаев А. Я. Регуляция синтеза ферментов катаболитной репрессией с участием аденозин-3,5-цикломонофосфата у микроорганизмов. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1977, № 2, с. 209.
3. Clark D. J., Marr A. G. Studies on the repression of β -galactosidase in *Escherichia coli*. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, v. 92, p. 85.
4. Sohn M., Horibata K. Inhibition by glucose of the β -galactoside enzyme system of *Escherichia coli*. — *Journ. Bacteriol.*, 1959, v. 78, p. 601.
5. Dykhuizen D., Hartl D. Transport by the lactose permease of *E. coli* as the basis of lactose killing. — *Journ. Bacteriol.*, 1978, v. 135, p. 876.

6. Magasanik B. Glucose effects: inducer exclusion and repression. — In: The Lactose Operon. Cold Spring Harbour Lab., 1970, p. 189.
7. McGinnis J. F., Paigen K. Catabolite inhibition — a general phenomenon in the control of carbohydrate utilization. — Journ. Bacteriol., 1969, v. 100, p. 903.
8. Monod J. Recherches sur la Croissance de Cultures Bacteriennes. Hermann, Paris, 1942.
9. Pastan I., Adhya S. Cyclic adenosine 5-monophosphate in Escherichia coli. — Bact. Rev., 1976, v. 40, p. 527.
10. Peterkofsky A. Regulation of Escherichia coli adenylate cyclase by phosphorylation-dephosphorylation. — Trends Biochem. Sci., 1977, v. 2, p. 12.
11. Peterkofsky A., Gasdar C. The Escherichia coli adenylate cyclase complex: activation by phosphoenolpyruvate. — Journ. Supramolec. Str., 1978, v. 9, p. 219.

Поступила 12 октября 1984 г.