

и), БЕКТИ-  
осква), КО-  
Петербург),  
^БАЕВ Э.И.  
КОВА О.П.  
Ф. (Киев),  
АРИН В.В.  
I.K. (Омск),

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2000

*С.А.Ермолаева, Ю.Ф. Белый, И.  
С. Таргаковский*

### АВТОРЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ СЕКРЕТИРУЕМЫХ БЕЛКОВ У *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Га-  
малеи, Москва

Спектр белков, секретируемых бактериями *Listeria monocytogenes*, существенно зависит от состава среды культивирования. Добавление в среду Brain Heart Infusion (BHI) активированного угля (АУ) приводит к секреции ряда дополнительных белков с мол. м. от 20 до 100 кД, продукция которых не наблюдается в чистой среде BHI. Эффект зависит от адсорбционной емкости угля: при снижении адсорбционной емкости за счет уменьшения концентрации угля или предварительного его насыщения компонентами питательной среды наблюдается снижение уровня продукции дополнительных белков. Предварительная обработка среды активированным углем с последующим его удалением перед засевом не изменяет спектра секретируемых белков, хотя существенно замедляет рост *L. monocytogenes*. Полученные данные показывают, что эффект активированного угля заключается в устранении из среды культивирования продукта жизнедеятельности самих листерий, действующего как авторегулятор синтеза ряда секретируемых белков.

Журн. микробиол., 2000, Ns 5, С. 3—6

Ключевые слова: *Usteria monocytogenes*, секретируемые белки, активированный уголь, экспрессия белков

#### ВВЕДЕНИЕ

Грамположительные бактерии *Usteria monocytogenes* являются факультативными внутриклеточными паразитами, вызывающими тяжелые заболевания у людей и животных. В число секретируемых белков, необходимых для проявления патогенности листерий, входят тиолзависимый ге-молизин — листериолизин О, две фосфо-липазы, металлопротеаза, нуклеатор актина ActA и др. Гены, кодирующие эти белки, объединены в несколько оперонов, транскрипция которых зависит от положительного регулятора PrfA [5, 7].

Недавно было показано, что экспрессия РПА-зависимых факторов вирулентности значительно усиливается в присут-

*S.A. Ermolaeva, Yu. F. Belyi, I.S.  
Ga/ta/co vsky*

### AUTOREGULATION OF THE EXPRESSION OF SECRETED PROTEINS IN *USTERIA* *MONOCYTOGENES*

Gamaleya Research Institute of Epidemiology and  
Microbiology, Moscow, Russia

The spectrum of proteins secreted by *L. monocytogenes* greatly depends on the composition of the cultivation medium. The introduction of activated charcoal (AC) into brain heart infusion (BHI) leads to the secretion of a number of additional proteins with mbl.wt. ranging between 20 and 100 kD, whose production is not observed in pure BHI. The effect depends on the absorption capacity of AC: when adsorption capacity is reduced due to a decrease in the concentration of AC or its preliminary saturation with the components of the cultivation medium a drop in the level of the production of additional proteins is observed. The preliminary treatment of the medium with AC with its subsequent elimination prior to inoculation does not change the spectrum of secreted proteins, though greatly inhibits the growth of *L. monocytogenes*. The data obtained in this investigation indicate that the effect produced by AC is based on the elimination of some product of *L. monocytogenes* vital activity from the cultivation medium; this product acts as the autoregulator of the synthesis of a number of secreted proteins.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2000, No. 5, P. 3—6

Key words: *Usteria monocytogenes*, secreted proteins, activated charcoal, expression of proteins

ствии активированного угля [2, 6]. Мы наблюдали более чем 15-кратное увеличение продукции листериолизина О и более чем 30-кратное — лецитиназы при выращивании листерий в присутствии активированного угля [2]. Продемонстрировано, что это сопровождается существенным изменением профиля секретируемых белков, лишь часть которых была идентифицирована как уже известные факторы вирулентности [1], остальные нуждаются в идентификации. Возможно, среди них есть еще не известные факторы, существенные для вирулентности *L. monocytogenes*. Столь значительный эффект вызывает интерес к механизму, посредством которого активированный уголь влияет на листерий.

[асов)

41.

А.Калугина

«С-инфо», 2000

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован штамм *L.monocytogenes* NCTC10527, любезно предоставленный Dr.W.Goebel (Германия). Бактерии культивировали в жидкой или на твердой среде (ВШ, «Difco»). Для анализа профиля секретируемых белков листерии засеивали до оптической плотности (OD600) около 0,1 мл и культивировали с покачиванием при 37° в течение 16 ч. В случаях, когда это указано, в жидкую среду перед авто-клавированием добавляли активированный уголь до концентрации 0,2%. Более низкие концентрации получали разведением стерильной средой ВШ непосредственно перед засевом.

Для устранения из среды культивирования компонентов, адсорбируемых углем, жидкую среду ВШ автоклавировали в присутствии активированного угля в указанной концентрации, а затем активно перемешивали при 37° С в течение 1 ч. Перед засевом активированный уголь удаляли фильтрованием через мембрану Milli-pore с диаметром пор 0,22 мкм. В некоторых экспериментах в обработанную таким образом среду добавляли перед засевом свежий уголь из стерильной 6% водной суспензии.

Для уменьшения адсорбционной емкости уголь насыщали компонентами питательной среды. С этой целью среду ВШ, содержащую 0,002% активированного угля, инкубировали при 37°С с покачиванием в течение времени от 1 ч до 7 дней, затем уголь осаждали центрифугированием в стерильных условиях и разводили в свежей среде ВШ в концентрации 0,2%, после чего проводили засев.

Бактерии из 16 час культуры разводили в 20 раз в свежей среде и подрощивали на шутеле при 37°С в течение 12ч, определяя ОП культуры по поглощению света с длиной волны 600 нм (OD600).

Клетки 16 час культуры осаждали центрифугированием при 12 тыс об./мин в течение 3 мин. Белки из супернатанта осаждали центрифугированием в аналогичных условиях в течение 10 мин после инкубирования при 0° в течение 1 ч в присутствии 10% трихлоруксусной кислоты.

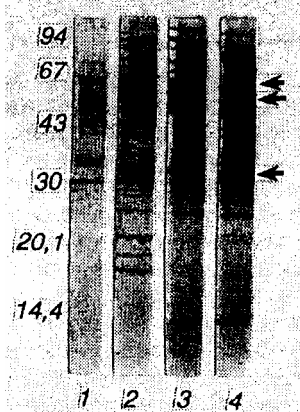


Рис. 1. Зависимость спектра секретируемых белков *L.monocytogenes* от концентрации активированного угля в среде культивирования. 1 — ВНИ; 2, 3, 4 — 0,2; 0,02; 0,002% угля соответственно. Здесь и на рис. 2, 4: слева — мол.м. (кД), стрелки — белок Р60, листериолизин О, фосфолипаза С.

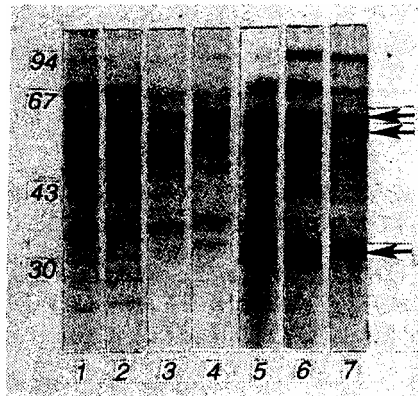


Рис. 2. Влияние предварительной обработки среды ВНИ активированным углем с последующим его удалением на продукцию секретируемых белков *L.monocytogenes*. 1 — ВНИ; 2, 3, 4 — 0,2; 1; 2% активированного угля соответственно, 5, 6, 7 — в обработанную 2% угля среду перед засевом добавлено соответственно 0,2, 0,02, 0,002% свежего угля.

Осадок белков промывали дважды 70% этано-лом, растворяли в буфере (0,03 М трис НС1, рН 6,8 — 1 % SDS, 8% глицерин, 0,0005% бромфе-нол, 2,5% бета-меркаптоэтанол) и кипятили в течение 5 мин. Белки наносили в количестве, соответствующем 300 мкл культуры с ОП 2,4, на дорожку прибора для минизлектрофореза (BioRad) и разделяли в 12% ПААГ в системе Лэммли. Окрашивали белки Кумасси в присутствии 40% метанола, избыток краски отмывали 7% уксусной кислотой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ •

Уровень экспрессии факторов патогенности *L.monocytogenes* вырастал с увеличением концентрации активированного угля, в присутствии которого выращивались бактерии [2]. Профиль секретируемых белков также менялся в зависимости от количества присутствующего в среде культивирования угля.

Максимальное количество дополнительных белковых полос по сравнению со средой ВНИ без угля (рис. 1, дорожка 1) наблюдали в присутствии 0,002% угля (рис. 1, дорожка 4). При 0,2% угля общее изменение спектра несколько меньше, исчезали дополнительные низкомолекулярные (до 20 кД) белки, а также некоторые средномолекулярные (27, 43 кД), что может быть связано как с их сорбцией углем, так и с др. причинами. Зато в присутствии 0,2% угля наблюдали максимальное увеличение продукции белков с мол.м. около 100, 58, 34, 32 и 29 кД (рис. 1, дорожка 2). Спектр белков, секретируемых листериями в присутствии 0,02% угля, промежуточный по отношению к крайним концентрациям (рис. 1, дорожка 3).

Ранее [1] нами с помощью поликло-

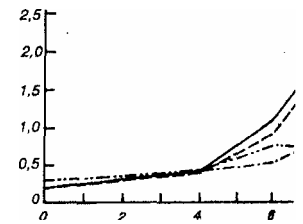


Рис. 3. Скорость роста *L.monocytogenes* предварительно обработан) углем. По оси абсцисс — время (ч); по оси о) ВНИ; 2, 3, 4 - 0,2; 1; 2% активирош

нальных антител были ны белки с мол.м. 58 и лизин О и фосфатици:

фичная фосфолипаза С дальнейшем; отмечены 1). Уровень их проду) увеличением концентр! что коррелирует с изме ствующей ферментатив культуральной жидкост ки неизменным (вне за сутствия угля) остается Р60 (рис. 1), также ран) ванного с помощью ан'

Предварительная обр активированным углем с удалением перед засевом) водила к существенн) профилю секретируемы Предварительная обраб максимальной рабоче) 0,2% угля вообще не пр) ниям спектра (рис. 2, » личением концентраци) рительной обработке д< исчезновение белковы около 70 и 45 кД (ри Увеличение концентр; приводило к появлению количества листериол! фосфолипазы С (34 кД) приводила к значитель скорости роста листер! обработке 2% активи (рис. 3).

Однако добавление г жего активированного) варительно обработанш водило к характерным филя секретируемых бе количества листериоли липазы С, а также ней ных белков с мол. м. Добавление к обработч угля существенно умен личество белка в кульч

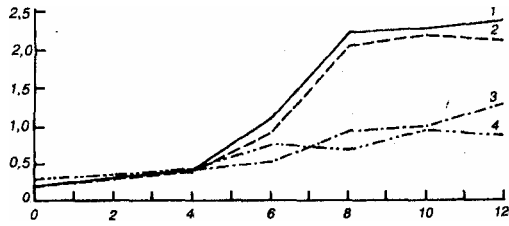


Рис. 3. Скорость роста *L.monocytogenes* в среде ВНІ, предварительно обработанной активированным углем.  
По оси абсцисс — время (ч); по оси ординат — ОД при 600 нм. 1 — ВНІ; 2, 3, 4 — 0,2; 1; 2Ж активированного угля соответственно.

нальных антител были идентифицированы белки с мол.м. 58 и 34 кД: листерио-лизин О и фосфатидилинозитол специфичная фосфолипаза С (фосфолипаза С в дальнейшем; отмечены стрелками на рис. 1). Уровень их продукции возрастал с увеличением концентрации угля в среде, что коррелирует с изменениями соответствующей ферментативной активности в культуральной жидкости [2]. Практически неизменным (вне зависимости от присутствия угля) остается количество белка Р60 (рис. 1), также ранее идентифицированного с помощью антител [3].

Предварительная обработка среды ВНІ активированным углем с последующим его удалением перед засеваем бактериями не приводила к существенным изменениям в профиле секретируемых белков (рис. 2). Предварительная обработка в течение 1 ч максимальной рабочей концентрацией 0,2% угля вообще не приводила к изменениям спектра (рис. 2, дорожка 2). С увеличением концентрации угля при предварительной обработке до 1% наблюдалось исчезновение белковых полос с мол.м. около 70 и 45 кД (рис. 2, дорожка 3). Увеличение концентрации угля до 2% приводило к появлению в незначительных количествах листериолизина О (58 кД) и фосфолипазы С (34 кД). Обработка среды приводила к значительному уменьшению скорости роста листерий, особенно при обработке 2% активированным углем (рис.3).

Однако добавление перед засеваем свежего активированного угля к среде, предварительно обработанной 1% углем, приводило к характерным изменениям профиля секретируемых белков: увеличению количества листериолизина О и фосфолипазы С, а также неидентифицированных белков с мол. м. от 29 до 100 кД. Добавление к обработанной среде 0,2% угля существенно уменьшало общее количество белка в культуральной жидко-

сти, что приводило к ухудшению разрешения на электрофорезе (рис. 2, дорожка 5). Возможно, это связано с адсорбцией белков культуральной жидкости активированным углем в условиях обедненной среды. В присутствии 0,02% активированного угля в обработанной среде белковый профиль был практически неотличим от профиля в необработанной среде в присутствии 0,2% угля (рис. 2, дорожка 6 и рис. 1, дорожка 2). Также похожи спектры белков культуральной жидкости при выращивании листерий в обработанной среде в присутствии 0,02% угля (рис. 2, дорожка 7) и в необработанной среде в присутствии 0,002% угля (рис. 1, дорожка 3).

Предварительное насыщение активированного угля компонентами питательной среды должно уменьшать его адсорбционную емкость по отношению к компонентам свежей среды и секретируемым продуктам листерий. Действительно, инкубация угля в среде ВНІ в концентрации 0,002%, после которой уголь концентрировали в стерильных условиях и добавляли в свежую среду в концентрации 0,2%, уменьшала эффект присутствия угля на профиль секретируемых белков. Предварительное насыщение в течение 1 ч уменьшало интенсивность полос с мол. м. около 100 и менее 34 кД (рис. 4, дорожки 1 и 2). Увеличение времени инкубации до 7 дней приводило к практически полному исчезновению дополнительных белковых полос в спектре по сравнению со средой

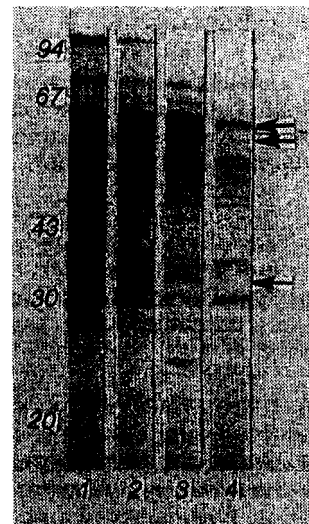


Рис. 4. Эффект снижения адсорбционной емкости активированного угля на продукцию секретируемых белков *L.monocytogenes*.  
1 — ВНІ с 0,2% активированного угля; 2, 3 — ВНІ с 0,2% угля, насыщенного компонентами этой же среды\* в течение, соответственно, 1 ч, 7 сут; 4 - ВНІ.

работки среды [еяющим его уемых белков

юванного угля яную 2Ж угля етственно,0,2,

ы 70% этано- 1трисНС1,рН )5% бромфе-и кипятили в і количестве, ]ысОП2,4,на жтрофореза Г в системе сси в присушки отмывали

ов патоген-гал с увели-ированного выращива-секретируе->ависимости [его в среде <симальное х белковых :ой ВНІ без вдали в при-дорожка 4). ние спектра ополнитель-Ю кД белки, стекулярные вязано как с причинами. і наблюдали здукции бел-г, 32 и 29 кД лков,секре-рисутствии по отноше-иям (рис. 1,

.ю поликло-

ВНИ без угля, за исключением полос, соответствующих листеролизину О и фосфолипазе С (рис. 4, дорожки 3 и 4).

#### О БСУЖДЕНИИ

Ранее нами показано, что изменение уровня продукции факторов вирулентности *L.monocytogenes*, в частности, листеролизина О и лецитиназы, зависит от концентрации активированного угля в среде культивирования [2]. Для среды ВНИ максимальный уровень продукции наблюдался в присутствии 0,2% угля, снижаясь как при уменьшении, так и при увеличении концентрации угля. Наблюдая за изменением спектра секретируемых белков листерий, мы выявили, что максимальное разнообразие белков, дополнительных по отношению к чистой среде ВНИ, наблюдается при более низких концентрациях угля (рис. 1), однако при концентрации 0,2% наблюдается максимальное увеличение количества отдельных белков, некоторые из которых служат известными факторами вирулентности. При добавлении в среду активированного угля в концентрациях более 0,2% нам не удавалось получить хорошего разрешения белков культуральной жидкости в геле, вероятно, из-за их сорбции углем. Таким образом, изменение спектра белков культуральной жидкости зависит от концентрации угля, т.е. от его адсорбционной емкости. Действительно, предварительное снижение сорбционной емкости активированного угля путем его насыщения компонентами среды вызывало примерно тот же эффект, что и уменьшение концентрации угля в среде.

Эффективность угля как неспецифического сорбента позволила предположить, что в основе эффекта присутствия активированного угля лежит его взаимодействие либо с компонентом среды культивирования, либо с веществом, продуцируемым самими листериями. Скажем, сорбция какого-либо компонента среды на частицах угля может приводить к уменьшению его доступности для бактерий. Однако, по-видимому, не изменение состава среды культивирования приводит к изменению спектра. Так, обработка среды культивирования концентрациями угля, десятикратно превышающими рабочую, судя по уменьшению скорости роста, приводит к устранению значительной части питательных веществ, необходимых для поддержания роста листерий, однако вызываемые ею изменения спектра секретируемых белков незначительны и несравнимы с выз-

ванными присутствием активированного угля. В то же время присутствие в процессе культивирования всего лишь 2% от количества угля, которым среда была обработана (0,02% против 1%), вызывает характерные изменения в спектре.

Таким образом, мы полагаем, что изменение спектра белков, секретируемых листериями, зависит от адсорбционной емкости, которой обладает уголь, физически присутствующий в среде в процессе культивирования листерий. Наши данные указывают, что в основе эффекта активированного угля лежит взаимодействие активированного угля с продуктом самих листерий.

Известно, что процессы авторегуляции оказывают не меньшее влияние на метаболизм бактерий, чем изменение внешних условий. Регуляция транскрипции генов в зависимости от накопления в окружающей среде секретируемого бактериями лиганда, получившая название quorum sensing, описана у многих бактерий [8]. Обнаружен ряд систем такого рода, регулирующих разнородные по своему функциональному значению группы генов, в том числе гены вирулентности у патогенных бактерий [8]. Возможно, что продукция ряда секретируемых белков у *L.monocytogenes* регулируется именно накоплением в среде их ауторепрессора, что подкрепляется наблюдаемой зависимостью продукции секретируемых факторов вирулентности от стадии роста культуры [4]. Мы полагаем, что активированный уголь может взаимодействовать с таким гипотетическим ауторепрессором, вызывая таким образом индукцию экспрессии секретируемых белков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ермолаева С.А., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. и др. // Мол. генетика. — 1994. — № 6. - С. 3 — 8.
2. Ermolaeva S.A., Belyi Yu.F., Tartakovsky I.S. // FEMS Microbiol. Let. - 1999. - V. 174. - P. 134 - 141.
3. Ermolaeva S.A., Varfolomeeva N.A., Selyi Yu.F. et al. // Ibid. - 1997. - V. 150. - P. 189 - 195.
4. Mengaud J., Dramsi S., Coin E. et al. // Mol. Microbiol. - 1991. - V. 5, No: 9. - P. 2273 - 2283.
5. Portnoy D.-A., Chakraborty T., Goebel W. et al. // Infect. Immun. - 1992. - V. 60. - P. 1263 - 1267.
6. Ripio M.T., Dominguez-Bernal G., Suaret M. et al. // Res. Microbiol. - 1996. - V. 147. - P. 371 - 384.
7. Sheehan B., Kocks C., Dramsi S. et al. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. - 1994. - V. 192. - P. 187 - 216.
8. Swift S., Throup J., Bycroft D. et al. // Mol. Microbiol. Series H: Cell Biology. - 1998. - V. 103. - P. 185 - 208.

Поступила 11. II. Ю

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ 01

Н.А. Волчек, Т.И.

#### СРАВНИТЕЛЬНО-ИЗОЛЯТОРНО-СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫДЕЛ ПО ГЕНУ OBE

НИИ  
эксперимента  
бург

Обработка стрептококков позволяющая выявлять белок, способный к агрегации альбумина и глобулинов G. В белке у всех исследованных групп C и (по уровню экспрессии функционального гена) с помощью иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител к IgG- и HSA-cwot H3A-связывающей домене. Спрессированная к белку G. В ридентификации и молекулярном химографии и кодировании

Жури. микробиол

Ключевые слова: < стрептококк, IgG-связывающая домена, ридентификация, па G белка

#### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что белок G, способный к агрегации иммуноглобулинов [2, 4, 9], штаммов стрептококков, происходящих из различных источников, является основным компонентом плазмы крови человека. Этот белок участвует в адгезии и инвазии, а также в патогенности. Исследования показали, что белок G является основным компонентом плазмы крови человека. Этот белок участвует в адгезии и инвазии, а также в патогенности. Исследования показали, что белок G является основным компонентом плазмы крови человека. Этот белок участвует в адгезии и инвазии, а также в патогенности.