

Ф. И. Товкач, Т. В. Иваница, А. И. Кушкина

Характеристика дефектных частиц вирусной природы у бактерий рода *Erwinia*

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. Г. Скрипалем)

*For the first time, it is shown that the expression products of defective prophages are typical not only of the defective lysogenic systems of phytopathogenic *Erwinia carotovora*, but also of epiphytic bacterium *Pantoea agglomerans*. It is established that viral particles like phage's capsids are packing a bacterial DNA, whose size is determined by the pulse field gel electrophoresis separation. Based on the data on capsid structures that form the virulent mutant ZF40/421, a proposition about the forming mechanism of defective virions of *E. carotovora* is made.*

Определение соотношения между полноценными и дефектными вирусами в окружающей среде является важной задачей современной вирусологии. Формирование дефектных вирионов при вирусных инфекциях связано с аттенуацией вирусной популяции и “угасанием” инфекций. С теоретической точки зрения сборка вирусных частиц и, особенно, фолдинг капсидов входят в разряд наиболее актуальных проблем современной биологии.

Наличие дефектных фагов обусловлено многими причинами. Во-первых, они могут быть результатом экспрессии неполных профагов, у которых сохранена структурная область генома [1]. Во-вторых, дефекты очень часто могут быть вызваны абортными фаговыми инфекциями, следствием которых является накопление неполных вирусных частиц [2]. В-третьих, в природе существуют оригинальные фаговые системы, например такие, как P2-P4. Развитие дефектного сателлитного фага P4 возможно только при условии использования им продуктов многих генов фага-помощника P2 [3].

Хотя дефектные фаги не способны вызывать полноценной инфекции, они могут играть важную роль в горизонтальном переносе генов путем трансдукции как в водных, так и в почвенных экосистемах. Кроме того, их наличие показательно для дефектно-лизогенных систем и абортных инфекций.

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (Есс) и *Pantoea agglomerans* (*E. herbicola*) являются представителями бактериальных консорциумов, которые ассоциированы с различными растениями. Изучение этих фитопатогенных бактерий невозможно без учета лизогенного состояния и участия умеренных фагов в их экологии.

Ранее было показано, что при лизогенной индукции штаммы *E. carotovora* различного происхождения синтезируют отдельные компоненты вирусной частицы — головки, базальные пластинки и хвостовые отростки, которые не собираются в целостный инфекционный вирион [1]. При этом хвостовые отростки представляют собой макромолекулярные каротоворицины (MCTV), убивающие близкородственные штаммы *E. carotovora*. Недавно мы впервые показали, что капсидные структуры дефектных умеренных фагов эрвиний упаковывают молекулы ДНК [4]. Происхождение этой ДНК неизвестно. С другой стороны, не установлено, способны ли частицы типа фаговых головок осуществлять генерализованную трансдукцию маркеров между штаммами *E. carotovora*. Важным вопросом является также обнаружение ДНК-содержащих вирусоподобных частиц (VLP-ДНК) у бактерий, которые,

как и пектолитические эрвинии, ассоциированы с растениями, например у такого эпифита, как *P. agglomerans*. Данная работа направлена на решение вышеуказанных проблем.

В качестве продуцентов VLP-ДНК использовали *E. carotovora* subsp. *carotovora* ZM1 и *P. agglomerans* Bg1. Лизогенную индукцию клеток осуществляли митомицином С (1 мкг на 1 мл активно растущих клеток) и налидиксовой кислотой (20 мкг/мл). Для определения относительной киллерной активности (A_{rel}) применяли метод зон лизиса. Эту величину выражали через соотношение диаметра индивидуальной зоны к диаметру максимальной зоны в данной серии исследований [5]. Концентрированные препараты VLP-ДНК получали методом дифференциального ультрацентрифугирования и хранили в буфере STMG.

Частицы VLP, содержащие молекулы ДНК, а также рестрикционные фрагменты разделяли в агарозных гелях. В качестве модельного использовали вирулентный мутант ZF40/421, который способен лизировать специфический лизоген Есс 62А-d1(ZF40c₁₀) [6]. Фаговые частицы получали методом слитного лизиса на минимальных чашках с лактозой. Для одновременного концентрирования и очистки частиц использовали волокнистую целлюлозу (23SS — фирма “Serva”). После наслаивания лизата, колонку промывали 0,15 М NaCl, а затем фракционировали 0,25 и 0,4 М NaCl.

Содержимое каждой фракции было проанализировано на наличие частиц с помощью электрофореза в агарозе. После этого в основных (пиковых) фракциях определяли титр фага, а также наличие капсидов и целостных вирионов с помощью электронной микроскопии.

Ранее мы показали, что штамм Есс ZM1 при лизогенной индукции продуцирует частицы, содержащие ДНК, которые по подвижности в гелях агарозы близки к капсиду фага ZF40 [4].

Установлено также, что МСТV этого штамма обуславливают фаг-фаговую индукцию и приводят к переходу фага ZF40 из состояния псевдолизогении к литическому или лизогенному развитию [7]. Бактериоцины данного штамма на газонах индикаторной культуры Есс 66А образуют негативные пятна лизиса, размер которых коррелирует с киллерной активностью. Бактериоцинов с такими свойствами у *E. carotovora* известно очень мало, поэтому их изучение может привести к получению новой информации о дефектной лизогении и бактериоциногенности у *E. carotovora*.

В процессе работы мы получили два спонтанных мутанта Есс ZM1 — 40i1 и 40i6, которые дают повышенный выход МСТV. На рис. 1, а представлена динамика изменения негативных зон лизиса на индикаторном штамме Есс 66А в зависимости от возраста культур Есс J2/S2 и ZM1(40i1), которые выращивали на минимальной среде А с лактозой.

Более детальный анализ киллерной активности (A_{rel}) показал, что в случае бактериального мутанта 40i1 выход МСТV имеет волнообразный характер, вне зависимости от того, какой индуктор применялся (см. рис. 1, б). Как видно из представленных результатов, наблюдается три “волны” выхода МСТV ZM1. Первая волна характерна для начальной логарифмической фазы роста — около 10^8 кл./мл (см. рис. 1, б, I). Вторая волна является показательной для нового пула индуцируемых бактериоцинов. Они появляются в середине (митомицин С) или в поздней логарифмической (налидиксовая кислота) фазе роста культуры (см. рис. 1, б, II). Третья волна выхода наблюдается в начальном стационарном периоде, когда количество клеток достигает 10^9 или более на 1 мл (см. рис. 1, б, III). Как следует из приведенного графика, “волны” выхода для двух индукторов находятся в противофазе, т.е. при достижении максимального выхода МСТV митомицинообработанными клетками, клетки, на которые воздействует налидиксовая кислота, дают минимум бактериоцинов. Очевидно, это различие отражает разные механизмы действия митомицина С и налидиксовой кислоты на SOS-систему, активация которой, в конечном итоге,

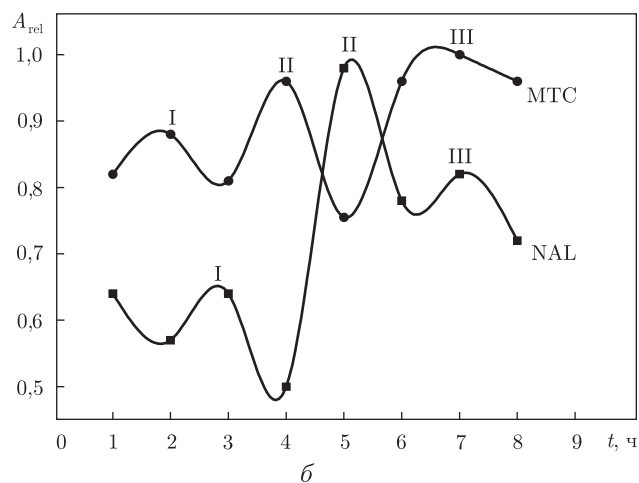
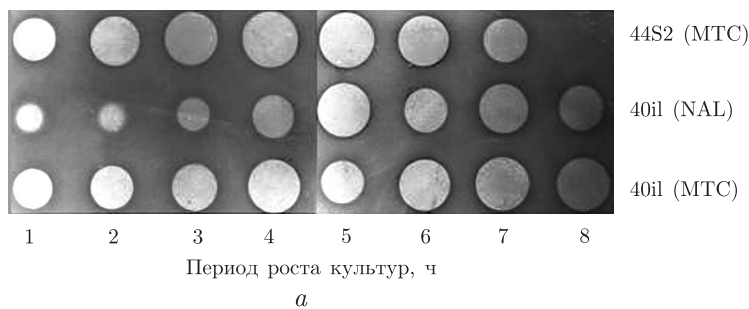


Рис. 1. Зоны лизиса МСТВ *E. carotovora* J2 S2(44S2) и ZM1(40i1), полученные на минимальных чашках с лактозой (а) и волновой выход каротоворицинов (МСТВ) штамма *E. carotovora* ZM1(40i1) при индукции клеток митомисином (МТС) и налидиксовой кислотой (NAL) (б: I, II, III — максимальный выход каротоворицинов)

приводит к дестабилизации дефектной лизогении *E. carotovora* и индукции дефектных фагов.

При воздействии на клетки Есс J2/S2 обоими индукторами волновой выход МСТВ обнаружен (см. рис. 1, б). Тем не менее он характерен для тиминовых ауксотрофных мутантов данного штамма [5]. Хотя общий выход каротоворицинов и, соответственно, эффективность индукции выше для митомисина С (см. рис. 1, б), для получения VLP-ДНК из штаммов Есс ZM1 и *Pantoea agglomerans* Bg1 была использована налидиксовая кислота. Этот выбор связан с тем, что при воздействии последней на лизогенные клетки эрвиний происходит частичная переориентация синтеза, приводящая к увеличенной продукции структур типа базальных пластинок и фаговых капсидов по сравнению с хвостовыми отростками [1]. Данный факт наряду с волновым выходом МСТВ (см. рис. 1, б), скорее всего, подтверждает положение о множественном характере дефектной лизогении у фитопатогенных эрвиний и ее поэтапной дерепрессии при лизогенной индукции [5].

Электрофоретический анализ концентрированных препаратов методом, описанным нами ранее [7], показал, что налидиксовые лизаты клеток обоих бактериальных мутантов Есс ZM1 — 40i1 и 40i6, а также штамма Bg1, хотя и в небольшом количестве, но содержат VLP-ДНК (рис. 2). Для того чтобы определить происхождение ДНК, упакованной в эти частицы, был проведен ее рестрикционный анализ с помощью эндонуклеаз Hind III, BamH I, EcoR I и Sal I. Как видно из данных, приведенных на рис. 3, гидролиз ДНК VLP

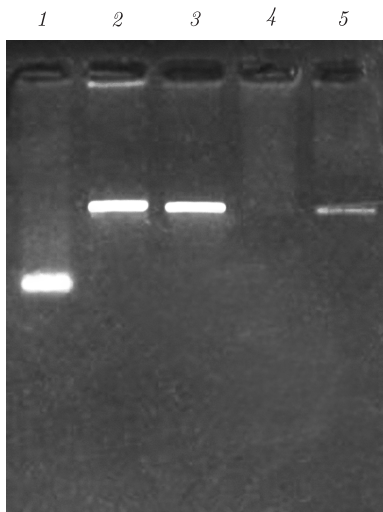


Рис. 2. Электрофореграмма VLP и ДНК штаммов *E. carotovora* 40i1 и 40i6 и *P. agglomerans* Bg1: 1 — VLP *E. carotovora* 40i1; 2 — VLP-ДНК 40i1; 3 — VLP-ДНК 40i6; 4 — VLP *P. agglomerans* Bg1; 5 — VLP-ДНК *P. agglomerans* Bg1

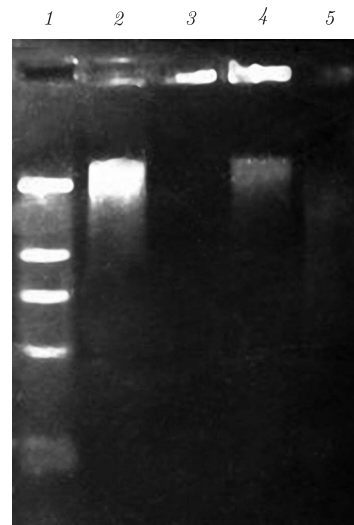


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов рестрикции VLP-ДНК *E. carotovora* в агарозном геле. Эндонуклеазы рестрикции: 1 — Hind III-фрагменты ДНК фага λ CI₈₅₇; 2 — Hind III; 3 — EcoRI; 4 — Sma I; 5 — Hpa I

мутанта 40i1 не приводит к образованию дискретных фрагментов. Этот факт достаточно убедительно свидетельствует о том, что в VLP упакована бактериальная ДНК. Однако нельзя полностью исключить, что эта ДНК может происходить от множественных профагов. Это возможно при условии, что фаговые капсиды, образованные после индукции, имеют одинаковый размер и представлены в полученных препаратах в эквимольярных количествах.

В наших условиях пока не разработаны подходы для осуществления трансдукции генетических маркеров с использованием штамма ZM1 и его VLP-ДНК. Тем не менее в независимых исследованиях была осуществлена попытка переноса плазмиды рKM101 (маркер устойчивости к ампицилину) VLP-частицами Eсс 62A в клетки *Escherichia coli* C600. Так как в этом случае не было получено положительных результатов, мы предположили, что VLP-ДНК не способны осуществлять инфекционный процесс и действительно являются дефектными в отличие от активных колиспецифичных MCTV этого штамма.

Для выяснения причины, лежащей в основе процесса образования дефектных вирусных частиц, мы использовали вирулентный мутант ZF40/421 [6]. Показано, что, так же как и аналогичный мутант $c_{5/5}$, он имеет дефекты в сборке частиц. Его основной капсид в избытке накапливается в фаголизатах и имеет подвижность меньшую, чем таковая нормального капсида фага дикого типа. Мутации, которые приводят к появлению мутантов ZF40/421 и $c_{5/5}$, являются плеотропными. Кроме формирования неправильных капсидов, фаг ZF40/421 осуществляет abortивную инфекцию, в результате которой образуется избыток капсидов типа I и II. Мутантный фаг ZF40/421, в отличие от фага ZF40 дикого типа, не способен осуществлять генерализованную трансдукцию плазмиды рKM101, тогда как мутант $c_{5/5}$ осуществляет перенос этой плазмиды со значительно более низкой частотой, чем точечный мутант c_6 фага ZF40. Кроме того, узоры рестрикции фагов ZF40/421 и $c_{5/5}$ существенно отличаются от таковых фага ZF40 дикого типа.

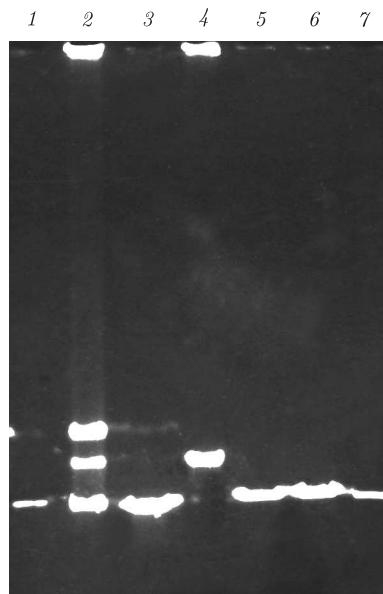


Рис. 4. Пульс-форетическое разделение молекул фаговой ДНК в агарозе. Полосы внизу геля соответствуют VLP-ДНК 40i1 (1), фага ZF40/421 (5) и фагов ZF40/421ф17 (6) и ZF40/421ф16 (7), обнаруженных при разделении общей фаговой популяции на колонке с ДЭАЭ целлюлозой (см. текст); 3 и 4 — нативные ДНК фагов Т3 и Т5 соответственно; 2 — смесь маркерных ДНК фагов Т7, Т5 и Т4 с размерами 40, 122 и 168 т. п. и снизу вверх соответственно

Разделение фаговых частиц на ионообменной колонке с ДЭАЭ-целлюлозой показало, что популяция фага ZF40/421 состоит из двух компонентов. Первый из них включает жизнеспособные частицы и капсиды, которые смываются с колонки 0,25 М NaCl, второй — вирионы и капсиды, которые могут быть элюированными при более высокой ионной силе — 0,4 М NaCl. Двухкомпонентный характер популяции фага ZF40/421 установлен нами впервые в этой работе, однако причины такой гетерогенности требуют дополнительных исследований. Что касается капсидных структур, то в обоих случаях их количество превалирует над количеством нативных вирионов. Электронномикроскопический и электрофоретический анализы показывают, что капсиды в подавляющем большинстве заполнены ДНК. Кроме того, капсиды мутанта ZF40/421 близки по электрофоретической подвижности к VLP-ДНК штамма Есс ZM1.

Таким образом, у *E. carotovora* возможно наличие одного из общих механизмов образования дефектных вирионов, который, как предполагалось ранее [1], связан со сборкой целостной частицы на уровне прикрепления хвостового отростка к головке фага.

Пульс-форетический анализ нативной ДНК VLP-частиц штамма Есс ZM1(40i1) показал, что они действительно упаковывают молекулы одинаковой длины (рис. 4, дорожка 1). По предварительной оценке размер этой ДНК составляет около 45 т. п. н. и совпадает с таковым ДНК фага ZF40/421 (см. рис. 4, дорожка 5), а также, возможно, с размером ДНК фага ZF40/421ф17 (дорожка 6). Последний, наряду с фагом ZF40/421ф16 (см. рис. 4, дорожка 7) представляет гетерогенную, возможно, двойную, популяцию фага ZF40. Точные механизмы возникновения профаговых дефектов, а также фаговой гетерогенности требуют более углубленного изучения дефектной лизогении эрвиний на уровне первичной последовательности профаговых геномов.

1. Товкач Ф. И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovota* // Микробиология. – 2002. – 71, № 3. – С. 359–367.
2. Deng Y. M., Liu C. Q., Dunn N. M. Genetic organization and functional analysis of a novel phage abortive system, Abi from *Lactococcus lactis* // J. Bacteriol. – 1999. – 67, No 1. – P. 135–149.
3. Lindqvist B. H., Deho G., Calendar R. Mechanisms of genome propagation and helper exploitation by satellite phage P4 // Microbiol. Rev. – 1993. – 57, No 3. – P. 683–702.
4. Іваниця Т. В., Товкач Ф. И. Предварительная характеристика ДНК-содержащих вирусоподобных частиц *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2007. – 69, № 3. – С. 19–26.
5. Товкач Ф. И., Балко А. Б., Мукевич Н. С. Особенности лизогенной индукции бактериоцинов у тиминных мутантов *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2006. – 68, № 3. – С. 33–46.
6. Кушкіна А. И., Панцина А. И., Товкач Ф. И. Вирулентные мутанты умеренного бактериофага ZF40 фитопатогенной *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Тез. Рос. школы-конф. “Генетика микроорганизмов и биотехнология”. – Москва; Пушчино-на-Оке, 2006. – С. 58.
7. Товкач Ф. И. Лизогенное состояние фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* // Доп. НАН України. – 2002. – № 7. – С. 170–173.

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 27.12.2007

УДК 591.545

© 2008

О. І. Худий, Л. В. Худа, О. Л. Цапок

Характеристика ростових процесів вирезуба *Rutilus frisii* (Nordmann) в умовах Дністровського водосховища

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Ю. Євтушенком)

*The growth characteristics of fishes enables to estimate a level of the well-being for separate individuals and populations. However, such researches demand the availability of a significant volume of animal materials. It can become a certain difficulty when the community of infrequent species is studied, as small samplings do not allow one to execute high-quality population researches. Applications of various extrapolation and approximation methods can become an output from such a situation. The application of such an approach to studying the nonpassage populations of a infrequent species, *Rutilus frisii* (Nordmann), is considered.*

Вивчення ростових характеристик риб дає можливість оцінити рівень благополуччя існування як окремих особин, так і популяції. Однак такі дослідження вимагають наявності значного об'єму тваринного матеріалу. Це може стати певною проблемою, коли йдеться про угруповання рідкісних видів, оскільки малі за чисельністю вибірки не дозволяють провести якісних популяційних досліджень. Виходом з такої ситуації може стати застосування різних екстраполяційних та апроксимаційних методів.

Розглянемо можливість застосування такого підходу при вивченні туводної популяції вирезуба — *Rutilus frisii* (Nordmann).

Вирезуб, занесений до “Червоної книги України” як вид I категорії (зникаючі) [1], ще у першій половині ХХ ст. був звичайною рибою в усіх основних річкових системах України.