

18. Torrence P., Walters J., Auckler C., Wieter P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 3, 890—899, 1973.
19. Nordlung J., Wolf S., Levy H. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 133, 439—444, 1970.
20. Zakharian R. A., Karagezryan K. G., Ovakimian S. S., Vardanian M. B., Gasparian H. T. ISY—JCS World Congress, Tokyo, Abstr. 3P12, 26—38, 1988.

Поступило 5.V 1990 г.

Биолог. журн. Армении № 1.(46).1993

УДК 577.214

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ФОСФАТАЗ НА СКОРОСТЬ РОСТА РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУР *E. coli*

Н. Г. НАЛБАНДЯН, И. М. ЗАРАФЯН, Н. С. АМБАРЦУМЯН

Институт молекулярной биологии АН Армении, Ереван

В клетках *E. coli*/psrcC, несущих плазмиду psrcC с онкогеном v-src, обнаружена тирозинспецифическая фосфопротенинкиназная активность, характерная для онкобелка pp60^{src}. Показано, что NaF подавляет скорость роста исследованных культур, в то время как ортованадат Na оказывает ингибирующее влияние на рост культуры *E. coli*/pBR322 в среднем на 15—20% глубже, чем культуры *E. coli*/psrcC. Экспрессия онкобелка src в клетках *E. coli* влияет на физиологическое состояние клеток.

Հետազոտված է ֆոսֆատազների անորդանական ինհիբիտորների (NaF) օրթովանազաթթվի ազդեցությունը pBR322 և psrcC պլազմիդներ կրող *E. coli* բջիջների աճի վրա: V—src օնկոգենը ունեցող *E. coli*/psrcC բջիջներում հայտնաբերված է pp60^{src} օնկոպրոթեին քնորոշ թիրոզին հատուկ ֆոսֆոպրոթեին-կինազային ակտիվություն: Ցույց է տրված, որ NaF-ը միանման է ազդում բոլոր հետազոտված բջիջների աճի վրա, մինչդեռ Na օրթովանազաթթուն միջին հաշվով 15—20% ավելի խորն է ճնշում *E. coli*/pBR322 բջիջների աճը քան *E. coli*/psrcC: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ src օնկոպրոթեին արտահայտությունը *E. coli* բջիջներում օրոշակի ազդեցություն է թողնում վերջիններիս ֆիզիոլոգիական վիճակի վրա:

Two strains of *E. coli* carrying pBR322 and psrcC plasmids, were investigated in terms of influence on their growth properties of two types of phosphatase inhibitors—NaF and Na—orthovanadate. Na orthovanadate inhibits the growth rate of *E. coli*/pBR322 on 15—20% deeper than *E. coli*/psrcC. The results indicate that, expression of src oncoprotein in *E. coli* changes the physiological state of the cells.

Фосфатазы ингибируются по тирозину—онкоген v-src.

Онкоген v-src, кодируемый геномом вируса RSV*, кодирует белок pp60^{src}, который обладает специфической протеинкиназной активностью и фосфорилирует белки-мишени по остаткам тирозина [5].

Ранее нами было показано, что клонированный в клетках *E. coli* онкоген v-src способен спонтанно экспрессироваться за счет наличия в участке генома, прилегающем к кодирующей части гена v-src, последовательностей прокариотического промотора и сайта узнавания

Сокращения: RSV—вирус саркомы Рауса.

рибосом [1]. Проявление этой активности в клетках *E. coli* приводит к ускорению синтеза ДНК и пролиферативной активности клеток. Видимо, это явление связано с фосфорилированием по тирозину дополнительных белков в клетке *E. coli* [2].

Полученные данные указывают на возможную роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности генов прокариотических клеток. Вопрос о роли фосфорилирования белков в регуляции активности прокариотических клеток до сих пор еще не нашел адекватного решения [4]. Изучение имеющейся модельной системы позволит продвинуть решение этого вопроса.

Материал и методика. В работе использовали культуры клеток *E. coli*, содержащие онкоген (*E. coli*/psrcC) и не содержащие этот онкоген (*E. coli*/pBR322). Была проведена оценка скоростей роста культур при длительных инкубациях и при добавлении в культуральную среду ингибиторов фосфатаз—NaF (ингибитор сериновых и треониновых фосфатаз) и ортованадата Na (Na_3VO_4 ингибитор тирозиновых фосфатаз) [6].

Скорость роста культур оценивали по величине k ($k = \mu_0/\mu_x$, где μ_0 —удельная скорость роста культуры, выращиваемой в среде без добавок, μ_x —удельная скорость роста культур, выращиваемых при наличии ингибиторов различных концентраций).

Результаты и обсуждение. Отношение удельной скорости роста культуры *E. coli*/psrcC к удельной скорости роста культуры *E. coli*/pBR322 составляло при выращивании до конца экспоненциальной стадии роста $\mu_{0\text{psrcC}}/\mu_{0\text{pBR322}} = 1,07 \pm 0,27$. Наблюдаемое различие невелико и статистически недостоверно. Видимо, ограничения, накладываемые методом спектрофотометрического определения скорости роста культур, не позволяют выявить статистически достоверные различия между культурами при длительных инкубациях, тогда как использование изотопной метки выявляет существенную разницу. К сожалению, этот метод не приемлем для длительных инкубаций.

Исследовано также поведение этих культур при добавлении в среду ингибиторов фосфатаз. Ингибиторы подбирались исходя из предположения, что изменение физиологического состояния культуры *E. coli*/psrcC связано с фосфорилированием дополнительных белков клетки по тирозину. В этом случае ингибирование тирозиновых фосфатаз должно было бы привести к увеличению времени жизни дополнительных фосфорилированных белков и, как следствие, к различной реакции культур *E. coli*/psrc и *E. coli*/pBR322 на ингибирование.

В табл. 1 (а) приведены данные о степени ингибирования (k) культур *E. coli*/psrcC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в среду различных концентраций NaF. Видно, что NaF подавляет рост культур, причем степень ингибирования одинакова как в случае с *E. coli*/pBR322, так и с *E. coli*/psrcC.

Добавление в культуральную среду ортованадата Na приводит к совершенно иным эффектам (табл. 1 б). Увеличение концентрации ортованадата Na практически не приводило к изменению величины k , как в случае с культурой *E. coli*/pBR322, так и с *E. coli*/psrcC. Мы предположили, что отсутствие влияния ортованадата на клетки

Таблица 1. (а). Степень ингибирования (*k*) культур *E. coli*/psrcC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в L-среду различных концентраций NaF.

Культуры	<i>k</i> для различных концентраций NaF, мМ			
	50	100	150	200
psrcC	1.05±0.1	1.2±0.2	1.22±0.1	2.0±0.3
pBR322	1.10±0.1	1.18±0.2	1.22±0.06	2.0±0.4
td	0.25	0.212	0.0121	0.136

(б) Степень ингибирования (*k*) культур *E. coli*/psrcC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в L-среду различных концентраций ортованадата Na.

Культуры	<i>k</i> для различных концентраций Na ₂ VO ₄ , мМ		
	0.25	0.5	1.0
psrcC	0.96±0.1	0.9±0.06	0.98±0.05
pBR3.2	1.01±0.02	0.94±0.1	1.04±0.04
td	0.625	0.663	1.296

(в) Степень ингибирования (*k*) культур *E. coli*/psrcC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в L-среду CaCl₂ и различных концентраций ортованадата Na.

Культуры	<i>k</i> для различных концентраций Na ₂ VO ₄ , мМ	
	0.5	1.0
psrcC	0.98±0.07	1.01±0.04
pBR322	1.17±0.1	1.23±0.2
td	3.72	2.4

E. coli связано с плохой проницаемостью этих веществ внутрь клеток. Поэтому в дальнейших экспериментах в среду добавляли CaCl₂, который, как известно, повышает проницаемость мембран клеток *E. coli*. В табл. 1в приведены данные об изменении величины *k* в зависимости от изменения концентрации ортованадата в среде при добавлении CaCl₂. Наблюдается зависящее от концентрации ингибитора изменение величины *k* в случае с культурой *E. coli*/pBR322 и практически полное отсутствие ингибирования культуры *E. coli*/psrcC. Различия, наблюдаемые между двумя культурами, достоверны по критерию Стьюдента. Сходная картина наблюдается и при использовании для инкубации бактерий минимальной солевой среды M9 (табл. 2а и б).

Таким образом, из полученных данных видно, что оба соединения NaF и Na-ортованадат в условиях *in vivo* приводят к ингибированию

Таблица 2. (а) Степень ингибирования (*k*) *E. coli*/psrC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в минимальную среду (M9) различных концентраций ортованадата Na.

Культуры	<i>k</i> для различных концентраций Na ₂ VO ₄ , мМ				
	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0
psrC	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.12 ± 0.05	1.15 ± 0.1	1.24 ± 0.13
pBR322	1.16 ± 0.2	1.12 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.12 ± 0.05	1.07 ± 0.03
td	0.314	0.77	0.448	0.821	2.06

(б) Степень ингибирования (*k*) *E. coli*/psrC и *E. coli*/pBR322 при добавлении в минимальную среду (M9) CaCl₂ и различных концентраций ортованадата Na.

Культуры	<i>k</i> для различных концентраций Na ₂ VO ₄ , мМ				
	0.25	0.5	1.0	2.0	5.0
psrC	1.32 ± 0.3	1.36 ± 0.2	1.36 ± 0.04	1.37 ± 0.04	1.5 ± 0.06
pBR322	1.53 ± 0.4	1.49 ± 0.2	1.3 ± 0.02	1.47 ± 0.05	1.72 ± 0.03
td	1.75	3.182	1.582	2.52	4.518

роста культур *E. coli*. Однако, если NaF в одинаковой степени ингибирует обе исследованные культуры *E. coli*, то Na-ортованадат по-разному влияет на них. Величина *k* в случае с культурой *E. coli*/pBR322 существенно больше, чем в случае с *E. coli*/psrC. Полученные данные указывают на то, что проявление тирозинспецифической протеинкиназной активности в клетках *E. coli*/psrC приводит к изменению физиологического состояния клеток, выражающемуся в аномальной реакции клеток на ортованадат Na. Неодинаковая реакция культур на ортованадат Na указывает также на то, что изменение физиологического состояния клеток *E. coli*/psrC связано с фосфорилированием по тирозину белков в клетке, что стимулирует их пролиферативную активность. Другим возможным объяснением этого явления может быть изменение под действием онкобелка src мембраны клеток *E. coli*/psrC таким образом, что она практически становится непроницаемой для ортованадата Na.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Н. С., Налбандян Н. Г., Мазуренко Н. Н., Татосян А. Г. Мол. биол., 127—133, 1989.
2. Амбарцумян Н. С., Налбандян Н. Г., Фаворова О. О., Татосян А. Г. Мол. биол., 1992 (в печати).
3. В кн. Метаболизм микроорганизмов (под ред. Н. С. Егорова), изд-во Московского университета, Москва, 1986 г., с. 114—116.
4. Cozzone A. J. Ann. Rev. Microbiol., 42, 97—112, 1988.
5. Erikson R. L., Collett M. S., Erikson A. F. Pusch o. PNAS USA, 76, 6260—6264, 1979.
6. Kamps M. P., Sefton B. M. Oncogene, 2, 3:5—315, 1988.

Поступило 22.VII 1991 г.