

Geny szlaku laktozowego u *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia enterocolitica*

MALGORZATA SKWARK

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin

Skwark M.

Genes of *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* lactose pathways

Summary

The purpose of the study was to discover why *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* do not utilize lactose in comparison with *Escherichia coli* which does utilize this disaccharide.

The study included 16 *Escherichia coli* strains, 16 *Y. enterocolitica* strains and 15 *Y. pseudotuberculosis* strains. Genotypic analysis demonstrated the presence of the *lacY* gene (encoding the *lac* permease which catalyses transport of lactose through the plasma membrane of the cell) in 16 strains of *E. coli* and in 15 of *Y. pseudotuberculosis* as well as the *lacZ* gene (encoding β -galactosidase that cleaves lactose sugar into galactose and glucose) in all the analyzed strains.

No *Y. enterocolitica* strains contained the *lacY* gene, and its lack may be proof that it is impossible for *Y. enterocolitica* to synthesize β -galactosidase permease and that this, in turn, may be one of the reasons why these bacteria do not destroy disaccharide lactose. Lactose is also not utilized by *Y. pseudotuberculosis* strains, probably due to the lack of expression of *lacY* gene.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, lactose permease, β -galactosidase, β -galactosidase permease, *lacY*, *lacZ*

Mechanizm fermentacji laktozy przez pałeczki *Escherichia coli* jest dobrze poznany procesem. Laktoza jako disacharyd ulega rozłożeniu pod wpływem działania enzymu β -galaktozydazy na dwa cukry składowe – galaktozę i glukozę. W szlak laktozowy zaangażowane są ponadto inne enzymy, każdy z nich jest kodowany przez oddzielny gen. Ekspresja tych genów ulega jednak wspólnej regulacji (9, 12, 13). Geny strukturalne enzymów szlaku laktozowego skupione są w tzw. operonie laktozowym. Należą do nich: *lacZ* – gen kodujący β -galaktozydazę, tj. enzym hydrolizujący wiązania β -galaktozydowe między resztami glukozy i galaktozy; *lacY* – gen determinujący syntezę permeazy β -galaktozydowej odpowiedzialnej za transport laktozy do wnętrza komórki bakteryjnej, oraz *lacA* – gen kodujący transacetylazę galaktozydową katalizującą acetylację tiogalaktozydów z acetylo-CoA jako donorem acetylowym, której fizjologiczne funkcje nie zostały dotychczas poznane (6-8, 10). Ekspresja wszystkich trzech genów podlegać może jednoczesnej indukcji przez cząsteczkę laktozy. Na tej podstawie założono, że przed tymi genami musi znajdować się niezależny element genetyczny, który reguluje ich ekspresję. W regulacji tej bierze udział kilka genów: gen regulatorowy (gen *lacI*), który koduje cząsteczkę represora zdolną do przejścia w inne miejsce, do operatora, gdzie indukuje ona sygnał wyłączający operon; operator, który otrzymuje sygnał wyłączający z represora; trzy geny kodujące enzymy szlaku laktozowego, które są transkrybowane na jedno mRNA oraz promotor będący

miejszem, gdzie przyłącza się polimeraza RNA indukująca syntezę mRNA (2, 9, 12-14).

Aby drobnoustroje mogły rozłożyć laktozę, muszą posiadać dwa z wymienionych enzymów, tzn. β -galaktozydazę oraz permeazę β -galaktozydową. β -galaktozydaza jest disacharydazą katalizującą hydrolizę laktozy do glukozy i galaktozy, które bakteria może wykorzystać jako źródło węgla (5), natomiast permeaza β -galaktozydowa jest ważnym białkiem transportującym, które przenosi β -galaktozydy i protony przez błonę cytoplazmatyczną (16, 18). Każdy drobnoustrój niezdolny do rozkładu laktozy nie posiada β -galaktozydazy. Bakterie określane jako późno fermentujące laktozę wykazują normalną aktywność β -galaktozydazy, natomiast aktywność permeazy β -galaktozydowej jest u nich niska (17).

Trzy gatunki bakterii, tj. *E. coli* i *Yersinia pseudotuberculosis* oraz *Yersinia enterocolitica* należą do Gram-ujemnych pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae*. Gatunki te obejmują szczepy chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt, a także szczepy uznawane za niepatogenne (3). Charakteryzują się one wzrostem zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych (17). Na podłożu MacConkeya szczepy *Y. pseudotuberculosis* oraz *Y. enterocolitica* rosną w postaci laktozoujemnych kolonii, natomiast szczepy *E. coli* w postaci kolonii laktozododatnich. Wymienione gatunki reagują dodatnio w teście ONPG (rozkład O-nitrofenylo- β -D-galaktopyranozydu). Rozkład tego substratu świadczy o obecności β -galaktozydazy, enzymu odpowiedzialnego za rozkład laktozy (4).

Mimo pozytywnego wyniku testu ONPG ani szczepy *Y. pseudotuberculosis*, ani *Y. enterocolitica* nie rozkładają jednak tego cukru. Brak tej cechy, pomimo syntezy β -galaktozydazy nasuwa przypuszczenie, że szczepy tych gatunków nie zawierają permeazy β -galaktozydowej.

Celem badań była próba określenia przyczyny braku fermentacji laktozy przez szczepy *Y. pseudotuberculosis* oraz *Y. enterocolitica* za pomocą metody PCR. Metodę tę zastosowano ze względu na jej czułość i wysoką swoistość.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 16 szczepów *E. coli*, 16 szczepów *Y. enterocolitica* i 15 *Y. pseudotuberculosis*. Szczepy te wyizolowano od zwierząt takich, jak: prosięta, cielaki, źrebki, gołębie, konie oraz szynszyle, a także od człowieka. Dane szczegółowe dotyczące wszystkich szczepów umieszczono w tabeli (tab. 1).

Ocenę morfologii kolonii przeprowadzono na podstawie obserwacji wzrostu bakterii na podłożu MacConkeya firmy Oxoid. Badane szczepy posiewano redukcyjnie na płytki z tym podłożem, następnie inkubowano je w temperaturze pokojo-

wej (20°C) przez 48 godzin oraz w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

Identyfikację biochemiczną wymienionych szczepów przeprowadzono w oparciu o analizę 11 cech. Wstępną diagnostykę wykonywano stosując testy API (BioMérieux) obejmujące 10 reakcji przeznaczonych do identyfikacji poszczególnych gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae*. Ponadto, w celu określenia zdolności szczepów do fermentacji laktozy, posiewano je na podłoże OF Basal Medium (o składzie: Bacto-Trypton – 2 g, Sodium Chloride – 5 g, Dipotassium Phosphate – 0,3 g, Bacto-Brom Thymol Blue – 0,08 g, Bacto-Agar – 2 g), zalecane przez firmę Difco, z 1% dodatkiem cukru. Szczepy inkubowano w temp. 37°C przez 96 h, odczytując wyniki co 24 h.

Izolacji chromosomalnego DNA dokonano, wykorzystując zestaw do izolacji DNA genomowego firmy A&A Biotechnology zgodnie z protokołem. Do reakcji PCR – do identyfikacji genu permeazy laktozowej (*lacY*) oraz laktazy (*lacZ*) *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* i *E. coli* wykorzystano primery zaprojektowane i przygotowane przez firmę A&A Biotechnology. Startery opracowano z uwzględnieniem sekwencji nukleotydowej *Yersinia pestis*, *E. coli* oraz innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Amplifikację bakteryjnego DNA wykonywano w standardowych warunkach przewidzianych dla reakcji PCR. Reakcję przeprowadzano w objętości 25 μ L, w mieszaninie reakcyjnej zawierającej substraty: wodę dejonizowaną, 10^x stężony bufor do Taq polimerazy, 25 mmol MgCl₂, 2 mmol dNTP, parę starterów (*lacY*₁ i *lacY*₂), specyficznych dla *lacY* lub *lacZ*₁ i *lacZ*₂, specyficznych dla *lacZ*, Taq polimerazę (5 u/1 μ L). Substraty reakcji stanowiły produkty firmy Fermentas oraz A&A Biotechnology. Do każdej mieszaniny reakcyjnej (23 μ L), dodawano 2 μ L roztworu zawierającego wcześniej wyizolowany i oczyszczony DNA bakteryjny. Proces amplifikacji przeprowadzono przy użyciu termocyklera firmy Eppendorf. Wykonano 35 cykli amplifikacji, tak dla *lacY*, jak i dla *lacZ*. Denaturacja wstępna obejmowała 120 s w temperaturze 94°C, ponadto na każdy cykl składały się: denaturacja – w temperaturze 94°C przez 30 s, wiązanie primerów – w temperaturze 56°C przez 30 s (*lacZ*) i 57°C przez 30 s (*lacY*), wydłużanie – w temperaturze 72°C przez 60 s. Wydłużanie końcowe natomiast przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 120 s.

Elektroforetyczny rozdział DNA przeprowadzono w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny (2,5 μ L / 50 mL żelu). Próbkę (9 μ L) produktu amplifikacji mieszano z 6-krotnie stężonym buforem stosowanym do nanoszenia próbek DNA do studzienek żelu (0,25% błękit bromofenolowy, 0,25% ksylenu cyjanu FF, 30% glicerol w wodzie) według Kura (11), po czym nanoszono na żel. Do identyfikacji produktów PCR stosowano marker PCR firmy DNA – Gdańsk M1 (pUC19/MspI). Żele analizowano, obserwując prążki DNA i porównując je z markerem M1 w iluminatorze UV (TL – 1, Biometra).

Wyniki i omówienie

Wszystkie szczepy charakteryzowały się wzrostem typowym dla gatunku *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* i *E. coli*; wyrastały na pożywce MC już po 24 godzinach, zarówno w temperaturze 37°C, jak i w temperaturze 20°C (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*). Identyfikacja biochemiczna oparta na analizie 11 reakcji potwierdziła przynależność szczepów do gatun-

Tab. 1. Wykaz szczepów bakteryjnych użytych w eksperymencie

Lp.	Rodzaj/gatunek	Liczba szczepów /serotyp	Miejsce izolacji	Sposób pozyskania
1.	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	12/ O:1 1/ IIA	Katedra Immunologii i Mikrobiologii AR Szczecin	uzyskane z kolekcji Katedry
		1/ O:9	Zakład Higieny Weterynaryjnej Łomża	uzyskany z kolekcji Katedry
		1/ IIA	Państwowy Instytut Weterynaryjny Puławy	uzyskany z kolekcji Katedry
2.	<i>Escherichia coli</i>	1/O149 1/O147 3/*	Katedra Immunologii i Mikrobiologii AR Szczecin	uzyskane z kolekcji Katedry
		1/*	Państwowy Zakład Higieny Warszawa	uzyskany z kolekcji Katedry
		1/* 1/O138	Państwowy Instytut Weterynaryjny Puławy	uzyskane z kolekcji Katedry
		1/O157 2/O157H7 1/O149 1/O8 1/O141 1/O101 1/O147	Centralne Laboratorium Weterynaryjne Weybridge	uzyskane z kolekcji Katedry
3.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	16 / O:3	Zakład Higieny Weterynaryjnej Łomża	uzyskane z kolekcji Katedry

Objaśnienia: * – szczep nie oznaczony serologicznie

ków *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* (1, 4, 17). Uzyskano jednakową aktywność biochemiczną (100% reakcji pozytywnych bądź 100% negatywnych) w odniesieniu do wszystkich badanych cech. Potwierdzono ponadto brak fermentacji laktozy przez szczepy *Y. pseudotuberculosis* oraz *Y. enterocolitica* oraz jej rozkład przez pałeczki *E. coli*.

Analiza genotypowa pozwoliła na stwierdzenie u 16 badanych szczepów gatunku *E. coli*, 15 szczepów *Y. pseudotuberculosis* oraz 16 szczepów *Y. enterocolitica* fragmentu chromosomalnego DNA o wielkości 207 pz, będącego genem *lacZ* determinującym syntezę β -galaktozydazy (ryc. 1). Obecność genu *lacZ* u gatunku *E. coli* wykazali inni autorzy (5-8). Wszystkie badane szczepy wykazały także reakcję dodatnią w teście ONPG już po 24-godzinnej inkubacji, co świadczy o ekspresji genu *lacZ* w postaci produktu, tj. β -galaktozydazy.

Odnotowany brak fermentacji laktozy przez *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* pomimo syntezy β -galaktozydazy nasunął przypuszczenie, że gatunki te nie wytwarzają permeazy β -galaktozydowej.

Analiza molekularna wykazała obecność fragmentu chromosomalnego DNA o wielkości 468 pz, będącego genem *lacY* kodującym syntezę permeazy β -galaktozydowej u 16 badanych szczepów z gatunku *E. coli* i 15 szczepów *Y. pseudotuberculosis*. Genu *lacY* nie wykryto u żadnego szczepu *Y. enterocolitica* (ryc. 1, tab. 2).



Ryc. 1. Detekcja produktów PCR – obecność genów *lacZ* i *lacY* w DNA chromosomalnym szczepów *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* i *E. coli*

Objaśnienia: M – wzorzec masy molekularnej DNA – marker pUC19/MspI, 0 – próba kontrolna ujemna, 1 – produkt PCR – gen *lacZ*, 2 – produkt PCR – gen *lacY*

Tab. 2. Analiza fenotypowa i genotypowa szczepów *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* i *E. coli*

Gatunek	Liczba szczepów wykazujących reakcję dodatnią			
	fermentacja laktozy	ONPG	<i>lacZ</i>	<i>lacY</i>
<i>Escherichia coli</i>	16	16	16	16
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0	15	15	15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	16	16	0

Objaśnienia: 1 – *lacZ* – obecność genu *lacZ* w DNA chromosomalnym badanych szczepów, 2 – *lacY* – obecność genu *lacY* w DNA chromosomalnym badanych szczepów

Obecność genu *lacY* u gatunku *E. coli* wykazali inni autorzy (5-8). Opisany we wcześniejszej pracy (15) brak występowania wymienionego genu u pałeczek *Y. pseudotuberculosis*, przy zastosowaniu pary starterów komplementarnych do fragmentu DNA zdefiniowanego jako *lacY*, konserwatywnego dla bakterii z gatunku *E. coli*, a jednocześnie wykazującego 94% homologii z regionem genomu *Y. pestis*, wywołany był prawdopodobnie uzyskaniem fałszywie negatywnych wyników. Przy zastosowaniu bowiem innej pary, komplementarnej do sekwencji nukleotydowej DNA uniwersalnej dla *Y. pestis*, *E. coli* oraz innych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* okazało się, że analizowany gen *lacY* występuje u wszystkich badanych szczepów *Y. pseudotuberculosis*, które poprzednio wykazywały pod tym względem reakcję negatywną.

Reasumując, można domniemywać, że przyczyną braku fermentacji laktozy przez szczepy *Y. pseudotuberculosis* oraz *Y. enterocolitica* może być niezdolność tych bakterii do syntezy permeazy β -galaktozydowej, co z kolei może wynikać z niewystępowania genu *lacY* u *Y. enterocolitica*, względnie z braku ekspresji wymienionego genu u *Y. pseudotuberculosis*.

Ponadto wydaje się bardzo istotne, iż zastosowana technika PCR w kierunku identyfikacji genów *lacZ* i *lacY*, umożliwia dalszą analizę negatywnych wyników uzyskiwanych na poziomie fenotypowym.

Piśmiennictwo

1. Bisping W.: Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin-Hamburg 1988.
2. Brown T. A.: Genomy. PWN, Warszawa 2001.
3. Czernomysz-Furowicz D., Furowicz A. J.: Zakażenia pokarmowe wywołane przez *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*. [w:] Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową. (red.) Boroń-Kaczmarek A., Furowicz A. J. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1999, 164-179.
4. Ewing W. H.: Media and Reagents, [w:] Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th Ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York 1986, 509-530.
5. Jacobson R. H., Matthews B. W.: Crystallization of β -galactosidase from *Escherichia coli*. Mol. Biol. 1992, 223, 1177-1182.
6. Kaback R. H.: Handbook of biological physics, Elsevier Science B.V. Amsterdam 1996, 2, 203-227.
7. Kaback R. H.: In and out and up and down with the lactose permease of *Escherichia coli*, [w:] Friedlander M., Mueckler M. Int. Rev. of Cyt., New York Academic Press, Inc. 1992, 137A, 97-125.
8. Kaback R. H.: The lac carrier protein in *Escherichia coli*, Membr. Biol. 1983, 76, 95-112.
9. Kercher M. A., Lu P., Lewis M.: Lac repressor-operator complex. Curr. Opin. Struct. Biol. 1996, 7, 76-85.
10. Kunicki-Goldfinger W. J. H.: Życie bakterii. PWN, Warszawa 1998.
11. Kur J.: Podstawy inżynierii genetycznej. Teoria ćwiczeń, testy, PG, Gdańsk 1994.
12. Lewis, M., Chang G., Horton N., Kercher M. A., Pace H. C., Schumacher M. A., Brennan R. G., Lu P.: Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. Sci. 1996, 271, 1247-1254.
13. Pace H., Kercher M., Lu P., Miller J., Chang G., Lewis M.: Lac repressor quaternary structure, repression, induction, and essential amino acids. TIBS 1997, 22, 334-339.
14. Perros M., Steitz T., Fried M., Hudson M. Lewis M.: DNA looping and lac repressor – lac CAP interaction. Sci. 1997, 274, 1929-1932.
15. Skwarck M.: An attempt to explain the reason of missing lactose fermentation capability in *Yersinia pseudotuberculosis*. Adv. Agric. Sci. 2002, 8 (1), 107-112.
16. Venkatesan P., Kaback R. H.: The substrate – binding site in lactose permease of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 9802-9807.
17. Zaremba M. L., Borowski J.: Mikrobiologia lekarska. Wyd. II. PZWL, Warszawa 1997.
18. Zhuang J., Prive G. G., Werner G. E., Ringler P., Kaback R. H., Engel A.: Two – Dimensional Crystallization of *Escherichia coli* Lactose Permease. Struct. Biol. 1999, 125, 63-75.

Adres autora: mgr inż. Małgorzata Skwarck, ul. Chopina 55, 71-450 Szczecin; e-mail: measol@wp.pl