

ORIGINAL ARTICLE

**Influence of N-phenyl-2-naphthylamine on the Activity
of Adenylate Cyclase Signaling System and the
Virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp.
*Sepedonicus***

A.M. Goncharova

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of RAS, Irkutsk, Russia

*E-Mail: goncharova@sifibr.irk.ru

Received November 1, 2016

The effect of N-phenyl-2-naphthylamine was obtained from exudates of pea root on growth, virulence and signaling-specific of potato phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. It is shown that the compound in a physiological concentration of the peas 9 mkM had no effect on *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, but when exposed to N-FNA in a concentration of 45 mkM was observed reduction in growth of planktonic culture *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, as well as changes in the activity of adenylate cyclase signaling system components in this phytopathogen.

Key words: adenylate cyclase, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, cAMP, N-phenyl-2-naphthylamine, phosphodiesterase.

Abbreviations: ACC – аденилатциклазная сигнальная система; АЦ – аденилатциклаза; рАЦ – растворимая аденилатциклаза; тАЦ – трансмембранная аденилатциклаза; ФДЭ – фосфодиэстераза; тФДЭ – трансмембранная фосфодиэстераза; рФДЭ – «растворимая» аденилатциклаза; N-ФНА – N-фенил-2-нафтиламин; Cms – *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*; Rvl – *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*; Psp – *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*

Как известно, в контроле метаболизма бактерий и экспрессии генов факторов вирулентности участвуют различные аутоиндукторы, а также вторичные мессенджеры различных сигнальных систем. Примерами таких регуляторов являются вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы (АСС) цАМФ и синтезирующая его аденилатциклаза (АЦ) (Kereszt *et al.*; 2011; Smith *et al.*, 2004). Помимо аденилатциклазы, концентрацию цАМФ определяет фермент фосфодиэстераза (ФДЭ), переводящая цАМФ в неактивную нециклическую форму. Также из литературных данных известно, что аденилатциклаза и фосфодиэстераза присутствуют в клетках бактерий в растворимых и трансмембранных формах (Яковлев *и др.*, 2009).

Большинство данных о роли цАМФ и аденилатциклаз в процессах роста бактерий и экспрессии факторов вирулентности относятся к патогенам животных (McDonough, Rodriguez, 2012; Оно *et al.*, 2014), в то время как растительные патогены и симбионты остаются практически не изучены.

Известно, что длительная коэволюция позволила растениям выработать различные механизмы защиты от патогенных бактерий (Горбачева *и др.*, 1991; Метлицкий *и др.*, 1985). Например, различные фенольные соединения, выделяемые корнями бобовых в ризосферу, играют значительную роль в защите растения от патогенных бактерий (Макарова, 2010).

Фенольное соединение N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА) относительно недавно был выделен из экссудатов корней гороха *Pisum sativum* L.v. (Макарова *и др.*, 2012). Ранее нами было показано, что N-ФНА в физиологической для гороха концентрации 9 мкМ значительно ингибировал рост планктонной культуры, а также изменял активность компонентов АСС у специфичного для гороха мутуалиста *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rvl) и бактериального патогена *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Psp) (Ломоватская *и др.*, 2016).

Целью настоящей работы было изучить влияние N-ФНА на активность компонентов АСС и факторов вирулентности планктонной культуры биотрофного

патогенна, возбудителя кольцевой гнили картофеля, *Clavibacter michiganensis* sps. *sepedonicus* (Cms).

MATERIALS AND METHODS

В настоящей работе использовали бактерии Cms, штамм 6889, полученный от ФГБУ Всероссийского центра карантина растений Московской области.

Глубинную (планктонную) культуру бактерий выращивали в колбах на среде (рН 7.0), содержащей картофельный отвар, глюкозу – 7,5 г/л.

N-ФНА выделяли из экссудатов корней гороха посевного сорта Ямальский методом газожидкостной хроматографии (Макарова *и др.*, 2012). После автоклавирования в среду культивирования бактерий добавляли раствор N-ФНА в метаноле до конечных концентраций 9 мкМ (опыт 1) и 45 мкМ (опыт 2). Контролем служили образцы без добавления N-ФНА. Титр бактерий определяли на планшетном спектрофотометре "Immunochem 2100" ("HighTechnologyInc.", США) при 655 нм.

Активность растворимой аденилатциклазы (рАЦ), растворимой фосфодиэстеразы (рФДЭ), целлюлазы (КФ 3.2.1.4) и пектиназы (КФ 3.1.1.11), а также уровень цАМФ определяли в среде роста бактерий после отделения бактериальных клеток. В клетках бактерий определяли активность растворимой и мембранной аденилатциклаз, фосфодиэстераз, а также пектиназы и целлюлазы.

Трехсуточную культуру исследуемых бактерий центрифугировали при 3000 оборотах в течение 10 минут. Осадок бактерий ресуспендировали в 3 мл инкубационной среды: 50 мМ трис-НСI буфер, рН 7,2, 1мМ дитиотреитол («Sigma», США). Далее суспензию помещали в ультразвуковой соникатор "BransonUltrasoniccorp" (USA) на 2 цикла и центрифугировали при 105 000 g в течение 90 минут. Осадок ресуспендировали в 3 мл инкубационной среды. Далее, к 500 мкл исследуемого образца добавляли 50 мкл 0,5мМ АТФ. Для трансмембранной аденилатциклазы (тАЦ) в качестве кофактора добавляли 3 мМ MgSO₄ («Реахим» Россия), а для рАЦ - 3мМ MnCl₂ («Реахим» Россия).

Для определения активности различных форм

ФДЭ (тФДЭ и рФДЭ) использовали ингибиторный анализ со специфическим ингибитором ФДЭ 0.1 мМ теофиллином («Sigma», США), который добавляли в инкубационную среду в образцы для определения активности АЦ. При выделении ФДЭ в инкубационную среду и в часть образцов теофиллин не добавляли. Реакцию проводили при 27 °С в течение 30 минут и останавливали кипячением в течение 3 минут на водяной бане. Об активности ФДЭ судили по разнице в концентрации цАМФ в пробах с теофиллином и без него. Активность ферментов выражали в наномолях цАМФ/мг белка в мин.

Образцы для определения концентрации цАМФ кипятили сразу. Очистку образцов от присутствия других циклических нуклеотидов и различных примесей проводили на колонке с нейтральной окисью алюминия (Lomovatskaya *et al.*, 2006). Количество цАМФ определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа (Lomovatskaya *et al.*, 2011). Белок определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Активность целлюлазы и пектиназы бактерий оценивали по методу определения редуцирующих сахаров (Вешняков *и др.*, 2008). Активность ферментов выражали в мг/мл восстанавливающих сахаров, образующихся в результате гидролиза карбоксиметилцеллюлозы и пектата натрия

соответственно в течение 3 ч при 27°С.

Эксперименты проводили в трех аналитических повторностях.

Полученные результаты обрабатывали статистически с вычислением ошибки среднего.

RESULTS

Результаты проведенных исследований показали, что N-ФНА в концентрации 9 мкМ не оказывал влияния ни на рост, ни на активность компонентов АСС фитопатогена *Cms* (данные не представлены). Однако, в присутствии 45 мкМ N-ФНА наблюдалось снижение титра бактерий (рис. 1). В этих условиях значительно возрастал уровень цАМФ как в клетках бактерий, так и в среде их культивирования (рис. 2). При этом значительно возрастала активность рАЦ, как в самих бактериях, так и в среде их роста (рис. 3), тогда как рФДЭ активировалась лишь в клетках бактерий, а в среде роста существенно подавлялась (рис. 4). Активность трансмембранных форм АЦ и ФДЭ практически не менялась (данные не представлены).

Одним из факторов вирулентности *Cms* выступают пектиназы и целлюлазы, разрушающие клеточные стенки растений. В присутствии N-ФНА активности пектиназы и целлюлазы как в самих бактериях *Cms*, так и в среде их роста, практически не менялись (рис.5).

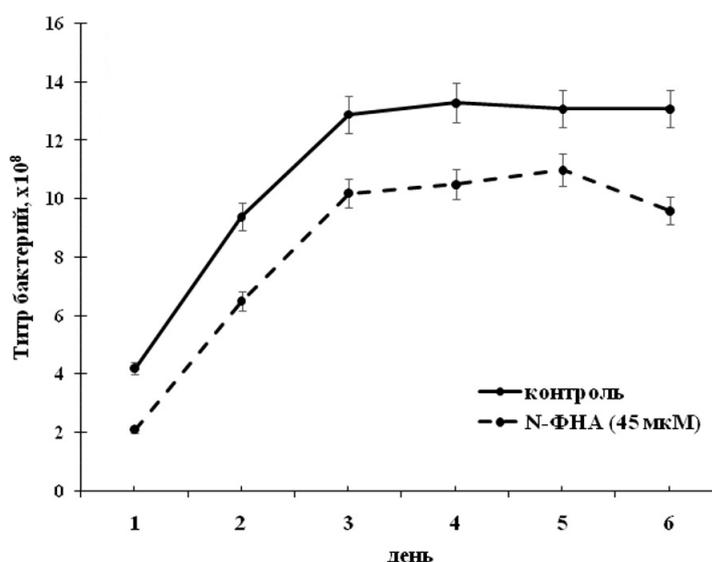


Figure 1. Влияние N-ФНА (45мкМ) на рост *Cms*

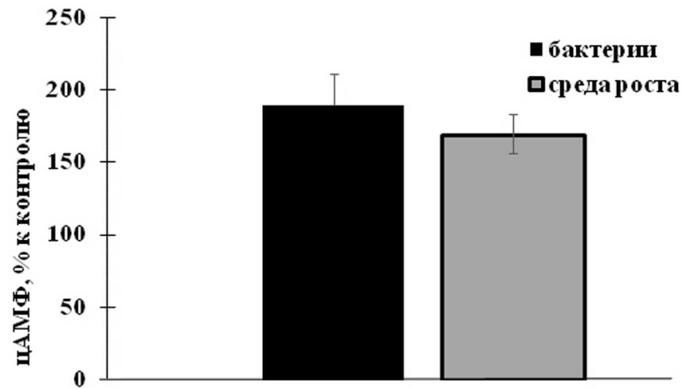


Figure 2. Влияние N-ФНА на концентрацию цАМФ у *Cms*

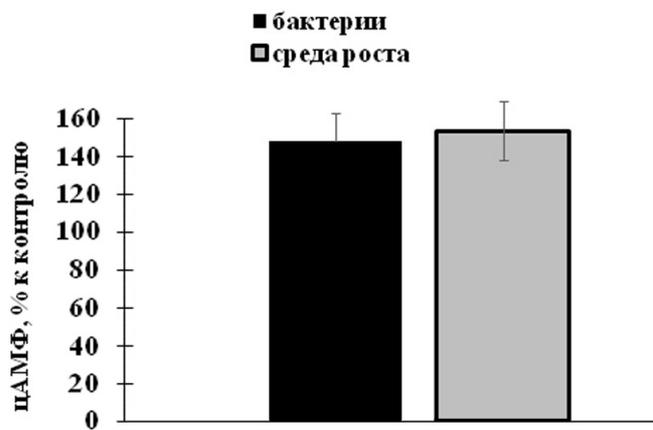


Figure 3. Влияние N-ФНА на активность pAC у *Cms*

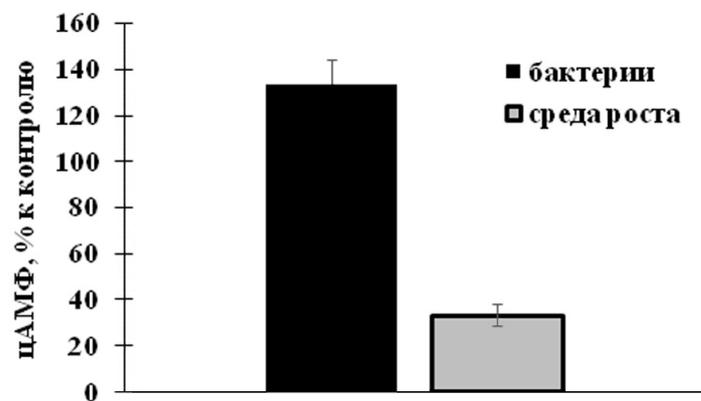


Figure 4. Влияние N-ФНА на активность pFDЭ у *Cms*

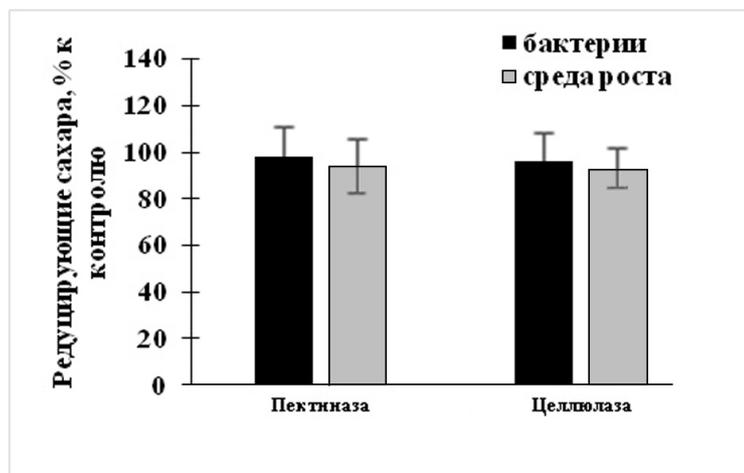


Figure 5. Влияние N-ФНА на активность пектиназы и целлюлазы у *Sms*

DISCUSSION

Исследования показали, что увеличение концентрации цАМФ у *Sms* при воздействии 45 мкМ N-ФНА связано с большей активацией рАЦ, по сравнению с рФДЭ. В свою очередь, избыток сигнальной молекулы цАМФ привел к снижению способности клеток *Sms* к размножению, но не оказал влияния на активность их эндо- и экзо-пектиназ и целлюлаз. Как было показано ранее, контроль над пектиназой и целлюлазой у *Rvl* и бактериального патогена *Psp* осуществляет тАЦ (Ломоватская и др., 2015). Вероятно, что активность этих гидролитических ферментов практически не менялась из-за сохранения 100% активности тАЦ.

Также результаты исследований показали, что N-ФНА в физиологической для гороха концентрации 9 мкМ не оказывал влияния на бактерий *Sms*. Напротив, у *Rvl* и *Psp*, для которых горох является растением-хозяином, эта концентрация N-ФНА снижала титр планктонной культуры, что сопровождалось также снижением уровня цАМФ (Ломоватская и др., 2016). Таким образом, можно сделать вывод о том, что уровень цАМФ является весьма консервативным показателем для каждого вида бактерий. Поэтому как снижение, так и повышение нормы его уровня у бактерий приводит к снижению титра их планктонной культуры. В настоящее время нельзя сказать, почему на рост *Sms* и активность компонентов АСС оказывает влияние только 45 мкМ N-ФНА, но можно

предположить, что это носит неспецифический характер, в отличие от *Psp* и *Rvl*.

REFERENCES

- Вешняков В.А., Хабаров Ю.Г., Н.Д. Камакина Н.Д. (2008) Сравнение методов определения редуцирующих веществ: метод Бертрана, эбулиостатический и фотометрический методы. *Химия растительного сырья*, **4**, 47–50.
- Горбачева Л. А., Дударева Н.А., Салганик Р.И. (1991) Молекулярные механизмы устойчивости растений к патогенам. *Успехи современной биологии*, **111**, 122- 136.
- Ломоватская Л.А. Макарова Л.Е., Кузакова О.В., Романенко А.С., Гончарова А.М. (2016) Влияние N-фенил-2-нафтиламина на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы и вирулентность бактериальных фитопатогенов и мутуалистов растений. *Прикладная биохимия и микробиология*, **52**, 1–6.
- Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Рыкун О.В. (2015). Трансмембранная аденилатциклаза контролирует факторы вирулентности фитопатогена *Pseudomonas syringae* и мутуалиста *Rhizobium leguminosarum*. *Микробиология*, **84**, 404-410.
- Метлицкий, Л.В., Озерцовская, О.Л., Березин, И.В. (1985). Как растения защищаются от болезней. М.: Наука, 192 с.
- Макарова Л.Е. (2010) *Физиологическое значение*

- фенольных соединений при формировании бобово-ризобияльного симбиоза в неблагоприятных условиях. Дис. докт. биол. наук, СИФИБР СО РАН, Иркутск.
- Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. (2012) Роль аллелопатических соединений в регуляции и формировании бобово-ризобияльного симбиоза. *Прикл. биохимия и микробиология*, **48**, 1–9.
- Яковлев А.В., Яковлева О.В., Ситдикова Г.Ф. (2009). Аденилатциклазная и гуанилатциклазная системы внутриклеточных вторичных посредников. *Учебное пособие. Казанский государственный университет*. Казань. 48 с.
- Boswell-Smith V., Spina D., Page C. (2006) Phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. pharmacol*, **147**, 252–257.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254.
- Hirsch A.M., Fujishige N.A. (2012) Molecular signals and receptors: communication between nitrogen-fixing bacteria and their plant hosts *Biocommunication of Plants*, **14**, 255–280.
- Kereszt A., Mergaert P., Maroti G., Kondorosi E. (2011) Innate immunity effectors and virulence factors in symbiosis. *Current opinion in microbiology*, **14**, 76 – 81.
- Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Krivolapova N.V., Kopytchuk V.N. (2006). Biotic stress influence on the activity of the various forms of adenylate cyclase in cell organelles potato plants. *J. of Stress Physiology & Biochemistry*, **2**, 10- 16.
- Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. (2011) *Plant Cell Rep.*, **30**, 125–132.
- McDonough K.A., Rodriguez A. (2012) The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword. *Nat. Rev. Microbiology*, **10**, 27 – 38.
- Ono K. Oka R., Toyofuku M., Sakaguchi A., Hamada M., Yoshida S., Nomura N. (2014) cAMP signaling affects irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbes Environ*, **29**, 104 – 106.
- Smith R.S., Wolfgang M.C., Lory S. (2004) Adenylate cyclase-controlled signaling network regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse model of acute Pneumonia. *Infect. Immunology*, **72**, 1677 – 1684.