

М. Г. ОГАНЕСЯН, А. Х. ЧАХАЛЯН

УФ-ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ У РИБОСОМНЫХ МУТАНТОВ *ESCHERICHIA COLI*

Проведен сравнительный анализ частоты спонтанных и УФ-индуцированных реверсий к прототрофности у двух изогенных штаммов, отличающихся аллельным состоянием *Str^r* локуса, контролирующего синтез одного из структурных белков малой субъединицы рибосом и определяющего отношение культуры к стрептомицину.

Выявлено различие в частоте как спонтанных, так и УФ-индуцированных лейциновых и аргининовых ревертантов. При этом частота встречаемости ревертантов обоих типов у стрептомицинрезистентного штамма сдвигается в сторону уменьшения по сравнению со стрептомицинчувствительной культурой.

В настоящее время становится очевидным, что мутации следует рассматривать не как одномоментный акт, а как многоэтапный процесс, охватывающий различные стадии индукции и проявления первичного мутационного изменения. Было высказано предположение, что своеобразие процессов, протекающих в клетке с момента возникновения мутации до регистрации ее в эксперименте, обуславливается генотипом культуры. Тогда же было предположено, что, наряду с другими факторами, состояние рибосом может внести изменения в мутационный процесс [2]. Это предположение основывалось на данных, свидетельствующих о том, что мутации в генах, определяющих структуру основных компонентов белоксинтезирующей системы и, в частности рибосом, могут приводить к неоднозначному считыванию генетической информации и нарушению процесса биосинтеза белков [4, 12]. А поскольку большинство мутаций на пути ген-признак проходит через аппарат белкового синтеза, естественно ожидать, что мутантные рибосомы могут играть определенную роль в мутагенезе, изменяя частоту и спектр мутаций. В настоящее время получены первые экспериментальные данные, подтверждающие это предположение [5—7].

В данной работе проводился сравнительный анализ частот спонтанных и УФ-индуцированных реверсий к прототрофности у штаммов, отличающихся функционально различными рибосомами.

Материал и методика. Бактериальные штаммы: в работе использовали штаммы *E. coli*, характеристика которых приводится в табл. 1.

В качестве перmissive хозяев для амбер, охра и опал мутантов фага T4 использовали штаммы CA 266, CA 180, CA 265, CA 167 и CA 70, полученные из Кембриджской коллекции.

Бактериофаги: использовали нонсенс мутанты фага T4, полученные от Майсурия, дикие фаги T2, T4 и трансдуцирующий фаг P1 Kc.

Таблица 1

Характеристика штаммов, использованных в работе

Штаммы	Г е н о т и п *							Источник получения
	his	met	arg	leu	lac	Sup E	StrA	
CA 180	+	+	+	+	—	—	+	Получен от Бреннера
CA9—180	+	+	+	+	—	—**	—	Получен Оганесяном и Барегамян [3]
JS 335	—	—	—	—	—	—	+	Получен от Флакса
JS9—335	—	—	—	—	—	—**	—	P1 (CA 180) трансдук- тант JS 335

* — обозначения приводятся по Тейлору (1972).

** — из-за рестрикации супрессора (Sup E) стрептомициновой мутацией фенотип этих культур Su^- .

± — слабо сбраживает лактозу.

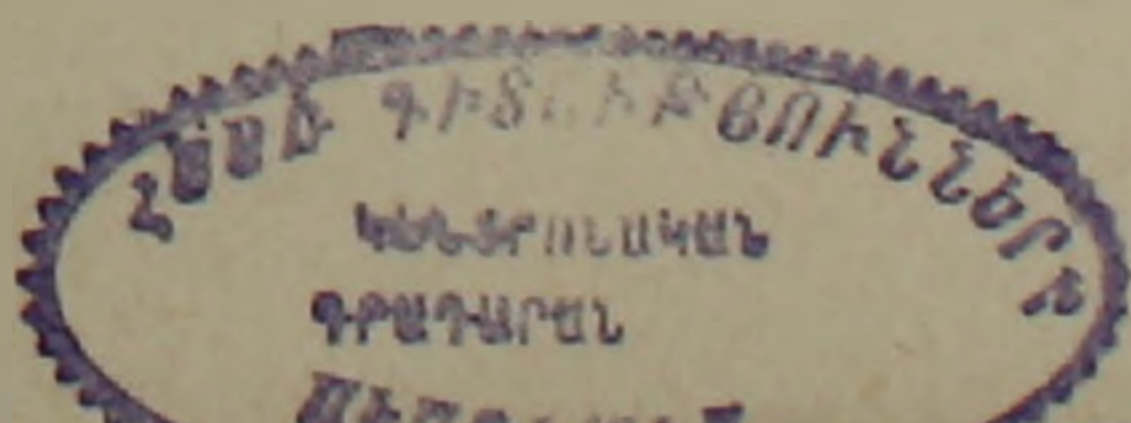
Среды: 1. Мясопептонный бульон (МПБ). 2. 1,2% мясопептонный агар (МПА 1,2%). 3. Минимальная синтетическая среда M9 по Адамсу [1]. 4. Минимальная синтетическая среда M9 с добавлением необходимых аминокислот в концентрации 20 мкг/мл—L форма и 40 мкг/мл DL форма (основная среда—ОС). 5. Среда 1—из среды ОС исключен лейцин. 6. Среда 2—из среды ОС исключен аргинин. 7. Среда 3—из среды ОС исключен метионин. 8. Среда 4—из среды ОС исключен гистидин. 9. Среда для выращивания фага P1 и для трансдукции следующего состава: дрожжевой экстракт—5 г, пептон—10 г, NaCl—5 г, гидролизат казеина—1 г, глюкоза—1 г. При необходимости в среды добавляли стрептомицин в концентрации 200 мкг/мл.

Трансдукция. Шток P1Ks получали выращиванием фага на газоне донорного штамма методом агаровых слоев [1]. Трансдукцию и отбор стрептомицинрезистентных (CM-P) рекомбинантов осуществляли по методу, описанному Лебоем, Коксом и Флаксом [13].

Эксперимент по УФ-облучению. Бактерии в логарифмической фазе роста отмывали от бульона центрифугированием и ресуспендированием в среде M9. УФ-облучение производили под лампой ПРК-4 на расстоянии 50 см при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Число жизнеспособных клеток определяли путем посева соответствующих разведений облученной культуры в чашки с 1,2% МПА. Во избежание фотореактивации опыты проводили в затемненной комнате.

Определение частоты спонтанных и УФ-индуцированных ревертантов. Облученную и контрольную культуры осаждали центрифугированием и ресуспендировали в МПБ с таким расчетом, чтобы конечная концентрация жизнеспособных клеток обеих культур была одинаковой. Для избавления от мутационных гетерозигот культуры инкубировали при 37° с постоянной аэрацией 4 час., затем отмывали центрифугированием и высевали на селективные среды 1, 2, 3, 4 для определения спонтанных и УФ-индуцированных ревертантов. Число ревертантов подсчитывали на третьи сутки после посева.

Результаты и обсуждение. Для изучения роли рибосом в мутационном процессе необходимо было конструирование штаммов, отличающихся друг от друга лишь по одному гену, затрагивающему функции рибосом. С этой целью мы использовали мутации в StrA локусе, т. к. установлено, что изменения этого гена приводят к нарушению структуры S12 белка рибосом, имеющего важное значение в процессе трансля-



ции [14, 15]. Кроме того, показано, что такая мутантная рибосома может обусловить ограничение генотипической супрессии нонсенс и миссенс мутаций и, следовательно, повлиять на проявление супрессоров [3, 4, 11, 12].

Контрольным штаммом в экспериментах служил полнауксотрофный стрептомицинчувствительный штамм JC-335. В качестве донора был выбран спонтанный СМ-Р мутант 9-180, который вследствие плеiotропного эффекта мутации в *StrA* локусе отличается от исходного СА 180-го штамма по ряду признаков, указанных в табл. 1, а также мукоидной морфологией колоний при 27° на минимальной и полноценной средах. Мутант 9-180 интересен также и тем, что обусловленное стрептомицин-резистентностью ограничение супрессора не зависит от наличия или отсутствия стрептомицина в среде, что отличает данный мутант от ранее описанных [7, 12].

СМ-Р дериват 9-335 был получен путем трансдукционного переноса *StrA* локуса от штамма 9-180 штамму JC-335. Полученные трансдуктанты были проверены по росту на минимальных синтетических средах с определенными добавками без и со стрептомицином при 27, 37 и 42° для определения возможных фенотипических изменений, обусловленных стрептомицинрезистентностью. Оказалось, что трансдуктанты сохраняют потребность во всех факторах роста, по которым недостаточен реципиент. Слабо выраженная мукоидная морфология колоний проявляется при 27° только на минимальной среде. Проверка же супрессирующей способности трансдуктантов показала, что исследуемая мутация в *StrA* локусе, приводит к полной рестрикции *SupE* супрессора в реципиентном штамме JC-335 так же, как и в мутанте 9-180. Кроме того, СМ-Р дериват JC-335 отличается от исходного штамма замедленным ростом в МПБ (рис. 1) и большей радиорезистентностью (рис. 2), что, по-видимому, является результатом плеiotропного эффекта СМ-Р мутации.

Изучение частоты спонтанных ревертантов у JC-335 и СМ-Р трансдуктанта JC9-335 выявило крайне низкую частоту ревертирования по метионину и гистидину, что исключило возможность сравнения изучаемых культур по этим маркерам. Что же касается лейцинового и аргининового маркеров, то оказалось, что по сравнению с контрольным штаммом у трансдуктанта обнаруживается в 3 раза меньше аргининовых и в 10 раз меньше лейциновых ревертантов (табл. 2).

Существенное различие наблюдается и в частоте УФ-индуцированных ревертантов (табл. 3). Так, среди проверенных $2,3 \cdot 10^9$ клеток контрольного штамма было обнаружено 5429 лейциновых ревертантов, в то время как среди $1,62 \cdot 10^9$ клеток трансдуктанта — 2125, т. е. соотношение долей реверсий 2-х культур составило 2:1. Частота же УФ-индуцированных аргининовых ревертантов у трансдуктанта в 8 раз меньше, чем у JC-335.

Таким образом, как в случае спонтанного, так и УФ-индуцированного мутагенеза наблюдается уменьшение частоты ревертантов у стреп-

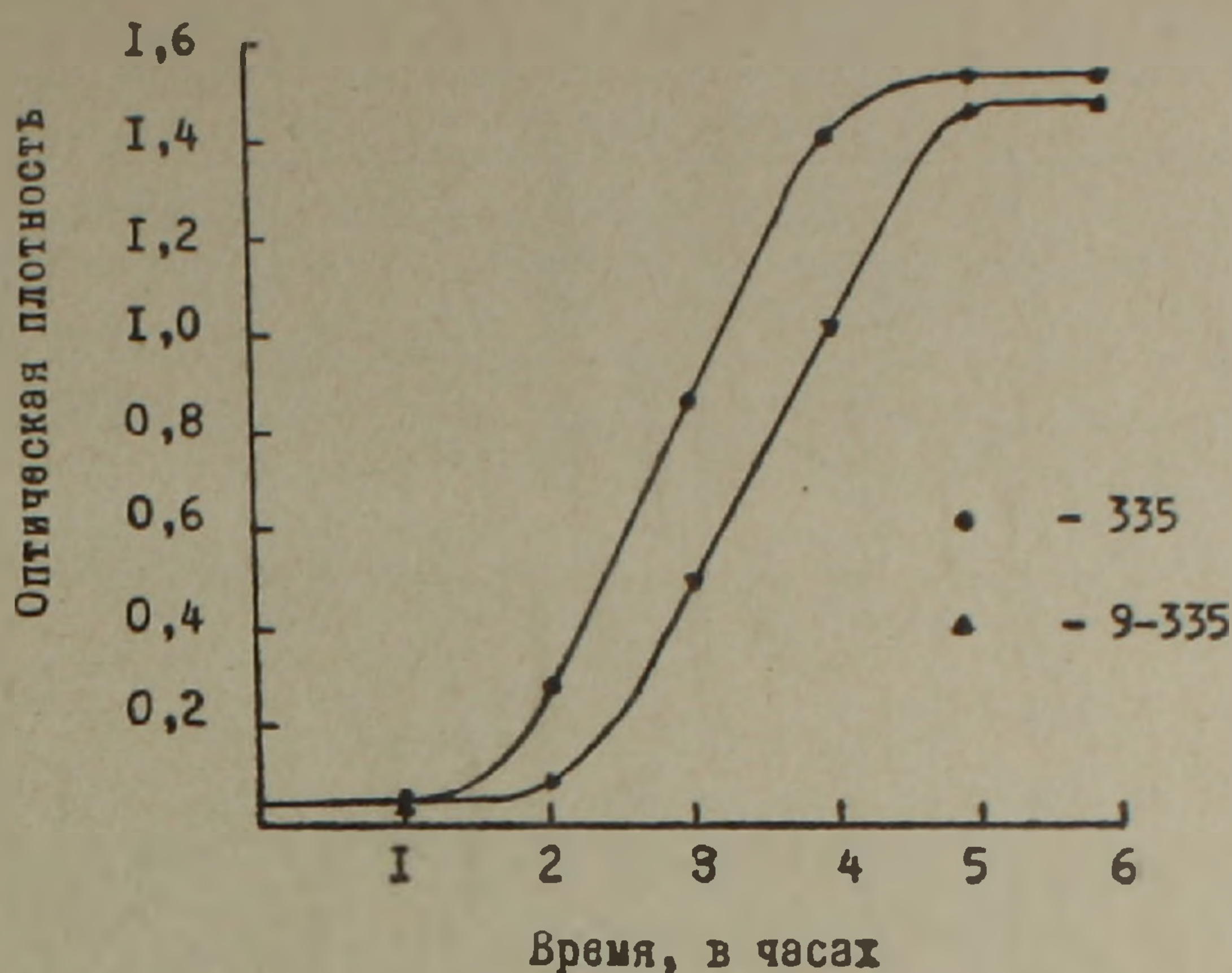


Рис. 1. Рост JC-335 и JC 9-335 в МПБ.

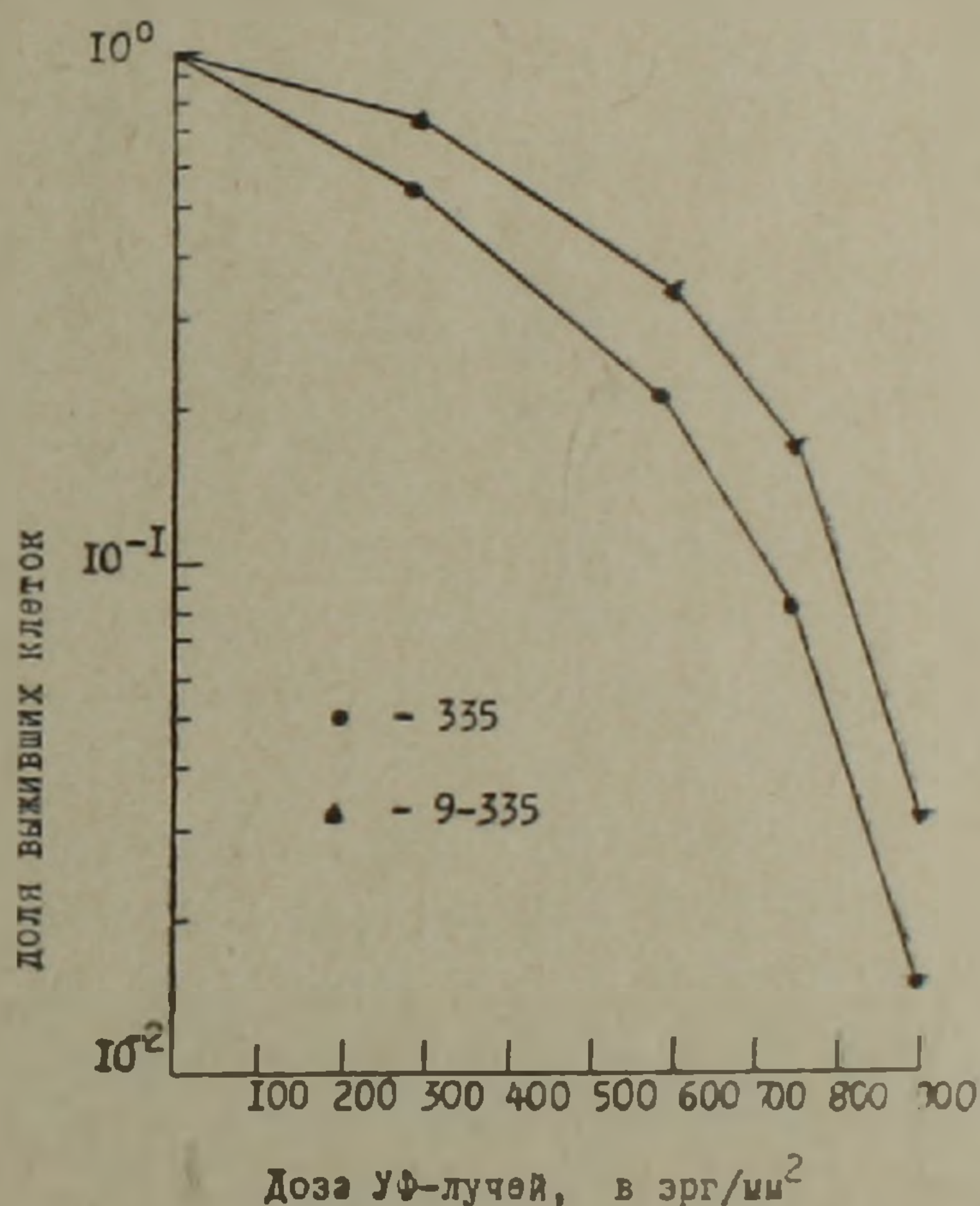


Рис. 2. Выживаемость JC-335 и JC 9-335 после УФ-облучения.

томицинрезистентного трансдуктанта по сравнению с реципиентной стрептомицинчувствительной культурой. И поскольку сравниваемые штаммы отличаются друг от друга лишь отношением к стрептомицину, естественно полагать, что изменение частоты ревертирования является следствием мутации в стрептомициновом гене. Это дает основание полагать, что сообщенные ранее [5] и приведенные здесь результаты, а также результаты двух других лабораторий [6, 7, 10] могут служить доказательством ранее высказанного предположения об участии рибосом в реализации мутаций [2].

Таблица 2

Частота встречаемости спонтанных лейциновых и аргининовых ревертантов у штаммов JC—335 и JC 9-335

Штаммы	Маркеры	Всего проверено бактериальных клеток	Обнаружено ревертантов	Доля ревертантов на 10^9 клеток	Соотношение долей реверсий двух культур
335	лейцин	$4,1 \cdot 10^{10}$	356	8,00	10:1
9-335	лейцин	$3,9 \cdot 10^{10}$	53	0,80	
335	аргинин	$3,7 \cdot 10^{10}$	15	0,81	3:1
9-335	аргинин	$3,2 \cdot 10^{10}$	6	0,27	

Таблица 3

Частота встречаемости УФ-индуцированных лейциновых и аргининовых ревертантов у JC 335 и JC 9-335

Штаммы	Маркеры	Всего проверено бактериальных клеток	Обнаружено ревертантов	Доля ревертантов на 10^6 клеток	Соотношение долей реверсий двух культур
435	лейцин	$2,3 \cdot 10^9$	5129	2,76	2:1
9-345	лейцин	$1,62 \cdot 10^9$	2125	1,36	
335	аргинин	$2,3 \cdot 10^8$	98	0,046	8:1
9-335	аргинин	$6,7 \cdot 10^8$	7	0,006	

Уменьшение количества ревертантов у СМ-Р штамма является, по-видимому, следствием того, что резистентность к стрептомицину ограничивает генетическую супрессию и препятствует проявлению части супрессорных мутантов. Вероятность такого объяснения подтверждается данными, полученными Скавронской с сотруд. [6, 7] и Кларком [10]. Так, показано, что в присутствии СМ-Р мутации наблюдается примерно десятикратное уменьшение частоты УФ-индуцированных ревертантов по маркерам, несущим нонсенс мутации. Причем, изучение супрессирующей способности ревертантов позволило заключить, что в основе такого снижения мутабельности лежит известное свойство СМ-Р мутаций ограничивать нонсенс супрессию. Добавление стрептомицина снимает это ограничение и повышает число регистрируемых ревертантов до контрольного уровня.

При анализе полученных нами результатов обращает на себя внимание тот факт, что стрептомицинрезистентная мутация в разной степени изменяет индекс реверсии по отдельным маркерам как в случае спонтанного, так и УФ-индуцированного мутагенеза. Если в присутствии СМ-Р мутации спонтанных лейциновых ревертантов образуется в 10 раз меньше, то снижение количества УФ-индуцированных ревертантов происходит всего в 2 раза. Иная картина наблюдается по аргининовому маркеру. Индекс спонтанных аргининовых ревертантов у СМ-Р штамма в меньшей степени отличается от контрольного, чем индекс УФ-индуцированных ревертантов. Возможно, указанный факт свидетельствует

о том, что природа рибосомной мутации качественно определяет спектр возникающих мутаций.

Резюмируя изложенное, можно заключить, что рибосомы, как один из основных компонентов аппарата белкового синтеза, принимают активное участие в мутационном процессе, оказывая влияние на спектр и частоту регистрируемых мутантов.

Филнал всесоюзного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов, г. Чаренцаван

Поступило 15.V 1974 г.

Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Խ. ԶԱԽԱԼՅԱՆ

ՈՒՆԻՎԵՐՍԱԼ ՆՈՒՇԱԿԱԳՈՒՅՆ ՃԱՌԱԴԱՅԹՆԵՐՈՎ ԻՆԴՈՒԿՎԱԾ ՄՈՒՏԱԳԵՆԵԶԸ ESCHERICHIA COL-Ի ՌԵԲՈՍՈՄԱՅԻՆ ՄՈՒՏԱՆՆԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ֆունկցիոնալ առումով տարբեր ռիբոսոմներ կրող երկու շտամների մոտ կատարված է սպոնտան և ուլտրամանուշակագույն ճառագայթների ազդեցությամբ ստացված պրոտոտրոֆ ռեբոսոմների հաճախականության համեմատական անալիզ:

Ի հայտ է բերված ինչպես սպոնտան, այնպես էլ ՈՒՄ-ճառագայթների ազդեցությամբ ինդուկցված լեյցին-անկախ և ադինին-անկախ ռեբոսոմների հաճախականության տարբերություն: Ընդ որում, ստրեպտոմիցինի նկատմամբ կայուն շտամի մոտ երկու տիպի մուտացիաների հաճախականությունը փոքրանում է ստրեպտոմիցինի նկատմամբ զգայուն կուլտուրայի համեմատությամբ:

Ռիբոսոմային մուտանտի և սկզբնական շտամի՝ լեյցին-անկախ սպոնտան ռեբոսոմների քանակների հարաբերությունը կազմում է 1:10, իսկ ադինին-անկախ ռեբոսոմներինը՝ 1:3: ՈՒՄ-ճառագայթերով ինդուկցված մուտացիաների դեպքում ստրեպտոմիցինի նկատմամբ կայուն շտամի մոտ լեյցին-անկախ ռեբոսոմների հաճախականությունը փոքր է 2 անգամ, իսկ ադինին-անկախ ռեբոսոմներինը՝ 8 անգամ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Оганесян М. Г. Биологический журнал Армении, 22, 12, 27—35, 1969.
3. Оганесян М. Г., Барегамян И. Н. В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. Ереван, 18, 1970.
4. Оганесян М. Г., Джанполадян Л. О. Мат-лы 2-ой научной конференции института экспериментальной биологии. Ереван, 10, 1968.
5. Оганесян М. Г., Чахалян А. Х. Тезисы докладов 2-ого Всесоюзного симпозиума Молекулярные механизмы генетических процессов: мутагенез и репарация, М., 23, 1973.

6. Скавронская А. Г., Алешкин Г. И., Лиходед Л. Я. Генетика, 9, 3, 92, 1973.
7. Скавронская А. Г., Алешкин Г. И., Лиходед Л. Я. Генетика, 9, 10, 163, 1973.
8. Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М., 1971.
9. Biswas D. K., Gorini L. J. Mol. Biol., 64, 119, 1972.
10. Clarke C. H. Mutat. Res. 19, 1, 43, 1973.
11. Gartner T. K., Orias E. J. Bact. 91, 1021, 1966.
12. Gorini L. Cold. Spr. Harb Symp. quant. Biol. 34, 101, 1969.
13. Leboy R., Cox E. C., Flaks J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 52, 1967, 1964.
14. Ozaki M., Mizushima S., Nomura M. Nature 222, 333, 1969.
15. Traub S., Nomura M. Science 160, 1968, 1968.