ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ: ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
т. XXVIII, № 2, 1975

УДК 576.8.575.113

М. Г. ОГАНЕСЯН, М. Б. ЧИТЧЯН

МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ УФ ЛУЧЕЙ НА СУПРЕССОР-СОДЕРЖАЩИЕ ШТАММЫ ESCHERICHIA COLI

Определены спонтанный и УФ-индуцированный индексы реверсий у штаммов, отличающихся по гену супрессорной тРНК Sup C. Установлено, что наличие как амберной, так и охровой аллелей гена Sup C в клетке приводит к увеличению частот индуцированных реверсий к лейцин- и аденинезависимости по сравнению с контрольным штаммом.

Гипотеза о возможной роли генов тРНК в мутационном процессе основывается на следующем: известно, что мутации в генах компонентов аппарата белкового синтеза могут привести к переосмысливанию генетической информации. Относительно тРНК, в частности, установлено, что мутации в этих генах могут привнести как качественные, так и количественные изменения в процесс белкового синтеза [7, 8, 11, 12]. С другой стороны, белковый синтез—это тот узловой барьер, прохождением через который обусловлено становление большинства мутаций.

На основании этих фактов была предложена гипотеза, согласно которой мутации в генах, контролирующих биогенез компонентов аппарата белкового синтеза клетки, вносят существенные коррективы в процесс белкового синтеза [3].

В настоящее время получены первые экспериментальные доказательства роли генов тРНК и рибосом в мутационном процессе. Удалось показать, что выход мутаций у штаммов, отличающихся по генам либо супрессорной тРНК [6], либо рибосом [5], различен.

В настоящей работе изучалась зависимость выхода УФ-индуцированных мутаций от состояния генов супрессорных тРНК в исследуемом штамме.

Материал и методика. Бактериальные штаммы. В работе использовались штаммы E. coli (характеристика которых приводится в табл. 1), а также—CA266, CA180, CA265, CA167—в качестве пермиссивных хозяев для нонсенс мутантов фага T4 (получены из Кембриджской коллекции штаммов от С. Бреннера). В качестве хозяина для фагов T2 и T4 применяли E. coli B. Штамм K 12 (λ) использовали для получения исходных фаголизатов и титрования трансдуцирующего фага PIKc.

Бактериофаги. Использовалась коллекция нонсенс мутантов фага T4, описанных ранее [2], дикие фаги T2 и T4 и трансдуцирующий фаг PIKc.

Среды. Мясопептонный бульон (МПБ); мясопептонный агар 1,2 и 0,7% (МПА 1,2 и 0,7%). В качестве основной среды (ОС)—минимальная синтетическая среда Мс (1) с добавлением всех необходимых факторов роста в следующих концентрациях (мкг/мл): триптофан—40, треонин—20, аргинин—20, пролин—20, лейцин—20, аденин—10, тиамин—10. Селективные среды (ср1, ср2, ср3, ср4, ср5, ср6) готовили, исключая из ОС соответственно триптофан, треонин, пролин, аргинин, аденин, лейцин.

Таблица 1

Характеристика штаммов E. coli, использованных в работе

Штаммы	Генотип									Фенотип			Источник получения
	thi	trp	thr	pro	arg	leu	ade	Sup C	lac	laa	Su охра	Su амбер	
PA6021	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	получен из музея бактериальных культур Института общей генетики
CA167	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	получен от С. Бренера
CA167/15—26	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	конвертант Su охра→Su амбер, получен у охра Su+ штамма CA167 Оганесяном и Аланакян
PA6021/12	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	получен нами
PA6021/17	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	получен нами

+ дикая аллель.
— мутантная аллель.

Трансдукция. Шток фага P1Kc приготовляли методом агаровых слоев по Адамсу [1]. Трансдукцию проводили по методу, предложенному Леноксом [10]. Способность исследуемых культур супрессировать нонсенс мутации бактериофага T4 проверяли спот-тестом по Бензеру [1].

Определение выживаемости после УФ облучения. Культуру в логарифмической фазе роста отмывали центрифугированием и ресуспендировали в среде М9. На следующий день ее облучали под лампой ПРК—4 на расстоянии 50 см. Выживаемость культуры после облучения определяли путем высева соответствующих разведений на среду МПА 1,2%.

Определение спонтанных и индуцированных индексов реверсий. Облученную и контрольную культуры центрифугировали при 3000 об/мин, ресуспендировали в среде МПБ (исходя из того, что конечная концентрация клеток в обеих культурах одинакова) и инкубировали при 37°С с постоянной аэрацией, в течение 4 час. для стабилизации мутаций. Затем контрольную и облученную культуры отмывали центрифугированием и высевали на селективные среды (ср3, ср4, ср5, ср6) для выявления спонтанных и индуцированных ревертантов. Число ревертантов подсчитывали на 5-ые сутки после посева.

Результаты и обсуждение. Для регистрации изменений, вносимых генами тРНК в мутационный процесс, была выбрана следующая система: сравнение индуцированного индекса реверсий к прототрофности у штаммов, различающихся аллельным состоянием гена супрессорной тРНК.

В качестве исходного штамма был выбран полиауксотроф PA6021. Штамм PA6021/17, отличающийся от исходного штамма наличием охрового супрессора, был получен путем трансдукционного переноса супрессорного гена Sup C из штамма CA167 в штамм PA6021. При переносе амберного супрессора донором служил дериват штамма CA167—

CA167/15—26, способность которого супрессировать амберную мутацию обусловлена конверсией охрового супрессора в амберный [4].

В обоих случаях в качестве селективного маркера для отбора Su^+ трансдуктантов был выбран trp маркер. Тесное сцепление указанных маркеров обеспечило высокую частоту их котрансдукции как при переносе амберной, так и охровой аллелей супрессорного гена. При проверке Su^+ трансдуктантов на сохранение ими маркеров реципиента обнаружилось, что они сохраняют недостаточность по всем маркерам, за исключением треонина. По-видимому, треонинзависимость у исходного штамма обусловлена амбер мутацией, чувствительной как к амберному, так и к охровому супрессорам (табл. 2). Что же касается супрессирующей способности культур, то оказывается, что, в отличие от trp^+ трансдуктантов, trp^+ Su^+ трансдуктанты полностью повторяют картину супрессии нонсенс мутаций фага T4 донорными штаммами.

Таблица 2

Частота совместного переноса trp гена с неселективными маркерами

P1 донор	Реципиент	Селективный маркер trp		Частота котрансдукции неселективных маркеров с trp геном, %						
		количество полученных trp + трансдуктантов	количество проверенных trp + трансдуктантов	arg	leu	thr*	Sup C		ade	pro
							охра	амбер		
CA167	PA6021	80	32	0	0	22	22	0	0	0
CA167/15.26	PA6021	62	23	0	0	26	0	26	0	0

* Все Su^+ трансдуктанты одновременно ведут себя как thr^+.

При определении спонтанных индексов реверсий у штамма PA6021 и у Su^+ дериватов этого штамма была выявлена крайне низкая частота ревертирования к лейцин- и адениннезависимости у всех культур; спонтанные ревертанты по аргинину и пролину вообще не были обнаружены. Мутагенизация УФ лучами значительно повысила частоты реверсий по лейцину и аденину, что позволило судить о роли супрессорных тРНК в мутагенезе. Отсутствие же индуцированных ревертантов по аргинину и пролину, по всей видимости, можно объяснить крайне низкой частотой спонтанных реверсий по указанным маркерам.

Как показали результаты экспериментов, наличие в клетке супрессора не приводит к существенным изменениям в радиочувствительности ее (рис. 1). Если присутствие амберного супрессора и снижает несколько радиочувствительность культуры по сравнению с контрольным штаммом, то в случае с охровым супрессором каких-либо существенных различий между трансдуктантами и контролем не обнаруживается.

Иная картина наблюдается при сравнительном анализе индексов УФ-индуцированных реверсий у исследуемых культур. Наличие в клетке как амберного, так и охрового супрессоров приводит к увеличению частот реверсий к аденин- и лейциннезависимости по сравнению с кон-

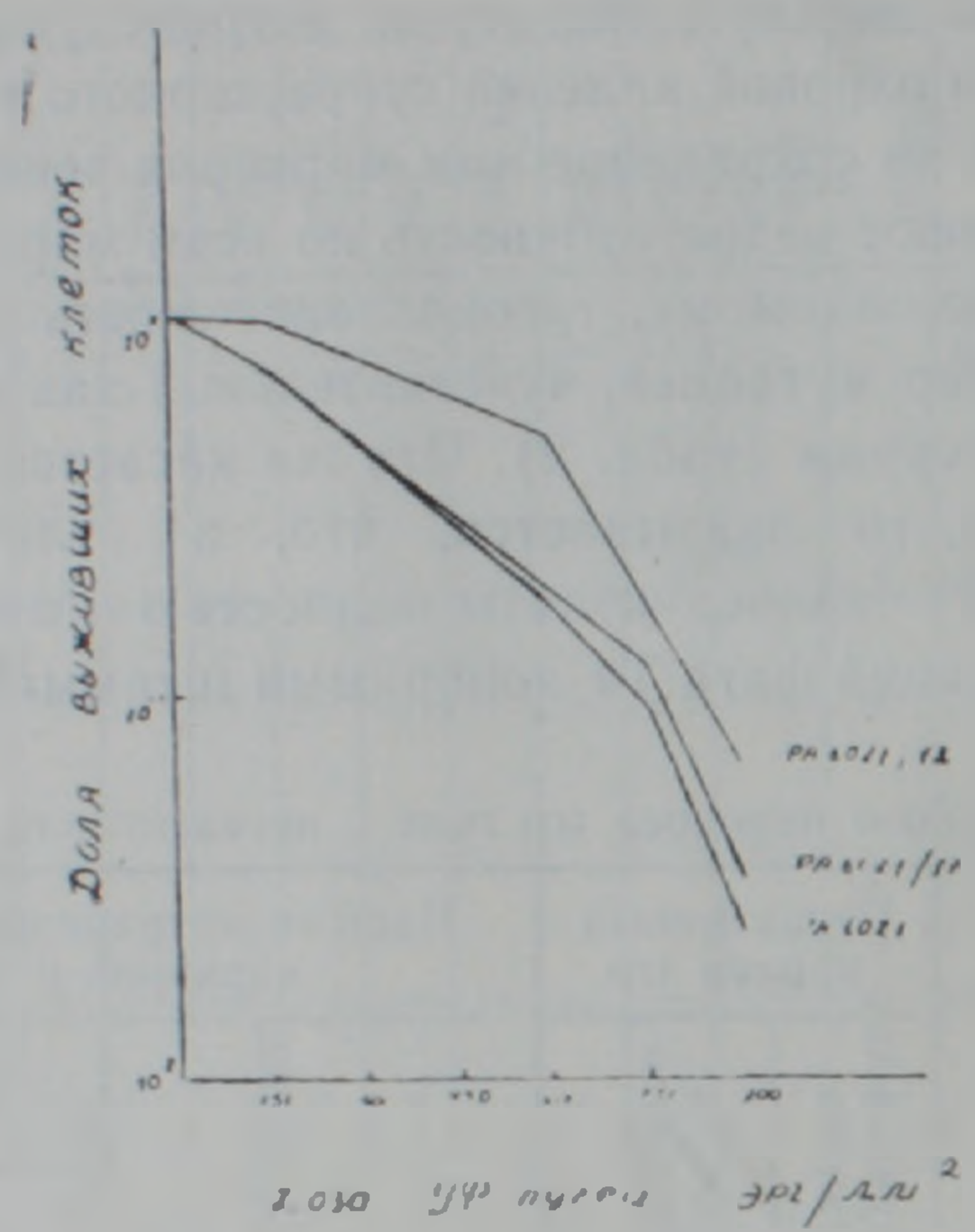

Рис. 1. Кривые УФ инактивации штаммов PA6021, PA6021/12, PA6021/17.

трольным штаммом. Причем увеличение индексов реверсий по аденину оказывается одинаковым в обеих культурах; как в случае с Su амбер⁻, так и в случае Su охра⁻ мутантами, соотношение долей реверсий трансдуктантов и контрольного штамма составляет 2,7:1 (табл. 3). Что же ка-

Таблица 3

УФ-индуцированный индекс реверсий к адениннезависимости у штаммов PA6021, PA6021/12 и PA6021/17

Штаммы	Выживаемость после УФ облучения, %	Проверено бактериальных клеток	Обнаружено ревертантов	Доля ревертантов на 10^6 клеток	Соотношение долей реверсий трансдуктантов и контроля
PA6021	2,5±1,5	$20,1 \cdot 10^8$	94	0,46	1
PA6021/17	2,0±1,5	$3,30 \cdot 10^8$	335	1,30	2,7
PA6021/12	2,5±1,5	$1,40 \cdot 10^8$	120	1,30	2,7

сается лейцинового маркера, то оказывается, что у штамма, несущего охровый супрессор, частота ревертирования к лейциннезависимости несколько выше, по сравнению с Su амбер⁻ штаммом: соотношение долей реверсий трансдуктантов и контроля в этом случае соответственно составляет 5,2:1 и 3,7:1 (табл. 4).

Полученные нами данные подтверждают высказанную ранее гипотезу относительно роли аппарата белкового синтеза, в частности роли генов тРНК в мутагенезе [3].

Таблица 4

УФ-индуцированный индекс реверсий к лейцинезависимости у штаммов PA6021, PA6021/12 и PA6021/17

Штамм	Выживаемость после УФ облучения, %	Проверено бактериальных клеток	Обнаружено ревертантов	Доля ревертантов на 10^6 клеток	Соотношение долей реверсий трансдуктантов и контроля
PA6021	2,5±1,5	$2,80 \cdot 10^8$	397	1,80	1
PA6021/17	2,0±1,5	$3,00 \cdot 10^8$	2337	9,40	5,2
PA6021/12	2,5±1,5	$2,23 \cdot 10^8$	1044	6,70	3,7

Эти результаты представляют, на наш взгляд, интерес в том аспекте, что если факт участия генов тРНК в неоднозначности считывания генетической информации считается установленным, то вопрос о роли их в мутационном процессе требует экспериментального доказательства. Так, известно, что наличие нонсенс кодонов в информационной РНК приводит к тому, что трансляция прекращается и образуется неполноценный, короткий пептид. Супрессия, осуществляемая генами тРНК с измененной антикодоновой [12] или какой-либо иной областью молекулы тРНК [9], приводит к восстановлению белкового синтеза, и, соответственно, к переосмысливанию генетической информации. При этом установлено, что как амберные, так и охровые мутации чувствительны к охровым супрессорам, в то время как супрессирующая способность амберных супрессоров ограничивается лишь амберными мутациями. Это свойство супрессорных тРНК вносить коррективы в процесс белкового синтеза не исчерпывается супрессией нонсенсных мутаций. Известно, что определенным образом измененные тРНК супрессируют так называемые мутации со «сдвигом рамки» [13]. Зависимость белкового синтеза от состояния генов супрессорных тРНК может нести не только качественный, но и количественный характер. В работе Рассела показано, что три формы одной и той же супрессорной тирозиновой тРНК, отличающиеся по степени модификации основания, примыкающего к антикодону, по-разному поддерживают синтез белка in vitro [8]. Поскольку незначительные изменения в молекуле тРНК, сохраняющей свои супрессорные свойства, отражаются на процессе белкового синтеза, можно было бы ожидать определенных различий в мутагенезе, обусловленных особенностями белкового синтеза, у выбранных нами штаммов, отличающихся аллельным состоянием супрессорного гена Sup C. Как показали результаты экспериментов, различие свойств супрессоров отразилось на мутационном процессе: так у штамма, несущего охровую аллель супрессора, индекс реверсий к лейцинезависимости оказался выше по сравнению с амберной аллелью. Одним из возможных объяснений увеличения частот реверсий к прототрофности у Su^+ штаммов может быть следующее: культуры, несущие супрессор, в отличие от Su^- штамма приобретают способность супрессировать нонсенсные мутации, возможно, индуцируемые УФ лучами наряду с реверсиями. С этой точки зрения можно объяснить и на-

блюдаемую разницу индексов реверсий по лейцину между Su охра⁺ и Su амбер⁺ штаммами, как результат неспецифичности охрового супрессора, позволяющей супрессировать наряду с охровыми и амберные мутации. По предварительным данным, указанная причина увеличения индекса реверсий у Su⁺ вариантов не единственная, поскольку при проведении экспериментов в условиях, снимающих указанное преимущество Su⁺ культур, частота индуцируемых реверсий у Su⁻ штамма PA6021 несколько увеличивается (по лейциновому маркеру), но не достигает уровня частот ревертирования Su⁺ дериватов.

Резюмируя настоящую работу, можно сказать, что полученные нами результаты подтверждают необходимость учета генетического потенциала клетки при оценке мутационного процесса; согласно нашим данным, гены тРНК могут играть определенную роль в сложном процессе мутагенеза, увеличивая частоты индуцированных мутаций.

Филиал Всесоюзного научно-исследовательского
института генетики и селекции промышленных
микроорганизмов, г. Чаренцаван

Поступило 25.VII 1974 г.

Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ. Բ. ՉԻԹՉՅԱՆ

ՈՒԼՏՐԱՄԱՆՈՒՇԱԿԱԳՈՒՅՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹՆԵՐԻ ՄՈՒՏԱԳԵՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՒՊՐԵՍՈՐ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ESCHERICHIA COLI ՇՏԱՄՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ամփոփում

Հետազոտվել են սպոնտան և ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներով ինդուկցված ռևերսիաների ինդեքսները սուպրեսորային ՌՆԹ պարունակող շտամների մոտ։ Ապացուցվել է, որ Sup C *գենի ամբեր կամ օխրա ալելների ներկայությունը բջջում հանգեցնում է ռևերսիաների մուտացիոն ինդեքսների մեծացմանը դեպի լեյցին և ադենին անկախության՝ ստուգիչ շտամի համեմատությամբ։*

Ադենինային մարկերի դեպքում ռևերսիայի ինդեքսի բարձրացումը միևնույնն է ցանկացած ալելի ներկայությամբ և ստուգիչ շտամի ռևերսիայի ինդեքսը գերազանցում է 2,7 անգամ։ Սուպրեսորային օխրա ալելը կրող շտամի լեյցին անկախության ռևերսիոն ինդեքսը ամբեր ալել կրող շտամի համեմատությամբ ավելի բարձր է։ Ստուգիչ շտամի ռևերսիոն ինդեքսի գերազանցումը համապատասխանաբար 5,2 և 3,7 անգամ է։

ЛИТЕРАТУРА

1. *Адамс М.* Бактериофаги. М., 1961.
2. *Майсурян А. Н., Ломовская Н. Д.* Молекулярная биология, 2, 389, 1968.
3. *Оганесян М. Г.* Биологический журнал Армении, 22, 12, 1969.
4. *Оганесян М. Г.* Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. Ереван, 5, 1970.
5. *Оганесян М. Г., Чахалян А. Х.* Тез. докл. 2-го Всесоюзн. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов: мутагенез и репарация», М., 23, 1973.
6. *Оганесян М. Г., Читчян М. Б.* Тез. докл. 2-го Всесоюзного симпозиума «Молекулярные механизмы генетических процессов: мутагенез и репарация», М., 58, 1973.

7. *Anderson K. W., Smith J. D.* G. Mol. Biol., 69, 349, 1972.
8. *Gefter M. L., Russell R. L.* G. Mol. Biol., 39, 145, 1969.
9. *Hirsh D. G.* Mol. Biol., 58, 439, 1971.
10. *Lennox E. S.* Virology, 1, 190, 1955.
11. *Novelli G. D.* Sumposium on Protein—Nucleic Acid Interaction, 129, 1969.
12. *Person S., Osborn M.* Proc. Nat. Acad. Sci., 60, 1030, 1968.
13. *Riddle D. L.* and *Roth J. R.* G. Mol. Biol., 66, 483, 1972.