

М. Г. ОГАНЕСЯН, Э. Г. МУГНЕЦЯН

АНАЛИЗ ПЛЕЙОТРОПНОГО ПРОЯВЛЕНИЯ СТРЕПТОМИЦИНОВЫХ МУТАЦИЙ У ШТАММА ESCHERICHIA COLI CA 167

Выделено свыше 100 спонтанных стрептомицинустойчивых (стрептомицинрезистентных СМ-р) и стрептомицинзависимых (СМ-з) мутантов у штамма СА 167, несущего охра-супрессор *sup C*. Проведен феногенетический анализ всех мутантов. Изучено поведение охра-супрессора на примере супрессии охровой мутации в β -галактозидазном гене амберных, охровых и опаловых мутаций в жизненно важных генах бактериофага Т4. Среди изученных мутантов обнаружена высокая плеiotропия, которая проявляется в изменении таких свойств, как температурочувствительность, ауксотрофность и др. Полученные мутанты применимы для изучения механизмов рибосомного контроля над двусмысленностью процесса трансляции.

В ряде работ была отмечена роль компонентов белоксинтезирующего аппарата клетки, в частности рибосом, в специфичности трансляции [1—5]. Удалось показать, что изменения рибосом приводят к двусмысленности (ambiguity, misreading) процесса трансляции, отмечаемой как при генетическом изменении рибосом путем получения мутаций в *str* и *gam* локусах [6, 7], так и при воздействии на транслирующие рибосомы добавлением антибиотика стрептомицина (СМ). Показано, что локус отношения к стрептомицину (*str A* локус) определяет структуру белка S 12. Этот же белок непосредственно вовлечен в кодон-антикодонное узнавание [8]. В норме процессу трансляции присуща некоторая двусмысленность, контролируемая рибосомой [4]. По данным Горини и сотрудников, эта двусмысленность специфична [4]: *gam* мутации и добавление стрептомицина усиливают, а СМ-р мутации ограничивают ее [6, 9]. Однако механизмы усиления или ограничения двусмысленности трансляции пока не выяснены. Задачей настоящей работы являлось получение и изучение новой группы рибосомных мутантов у штаммов, несущих нонсенс-супрессор, с целью получения дополнительных данных о природе стимулирования и ограничения измененными рибосомами процесса супрессии и о вкладе белка, контролируемого *str A* локусом, в эти явления.

Материал и методика. Бактерии. В работе использованы чувствительные к стрептомицину бактерии *E. coli* K12. Штамм СА 167 несет охра-супрессор *sup C*, охровую мутацию в Z гене лактозного оперона, сбрасывает лактозу (лак⁺ фенотип). Штамм 594, мутантный по *lac Z* гену, не несет супрессора, вследствие чего имеет лак⁻ фенотип.

Бактериофаги. При проведении анализа супрессора были использованы фаги, охарактеризованные ранее [2].

Питательные среды. В качестве индикаторной среды при определении способности сбраживать лактозу использовали среду Эндо. Минимальной средой для выявления ауксотрофов служили жидкая и агаризованная среды М9, с добавлением 10 мкг/мл тиамина [10]. Состав жидкой полноценной среды следующий: аминокислоты—500 г, пептон—20 г, натрий хлористый—10 г, глюкоза—4 г, воды до 1 л. Твердая питательная среда готовилась из жидкой добавлением 12 г агара на литр среды. Во всех необходимых случаях добавляли 200 мкг/мл стрептомицина.

Выделение и анализ мутантов. Стрептомициновые мутанты выделялись по ранее описанному методу [2]. Проверка способности СМ-р и СМ-з мутантов супрессировать различные нонсенсные мутации бактериофага Т4 производилась по Бензеру [11].

Для фенотипического анализа мутанты, нанесенные на чашки Петри с индикаторной, полноценной и минимальной средами, инкубировались в термостатах при 27°, 37°, 42°С в течение 48 час.

Результаты и обсуждение. Выделено более 100 спонтанных СМ-р и СМ-з мутантов штамма СА167. Частота возникновения СМ-р мутантов этого штамма низка (10^{-10} — 10^{-9}), частота возникновения СМ-з мутантов на порядок ниже, что согласуется с литературными данными [2]. Так, из 100 полученных СМ-р мутантов только 8 оказались СМ-зависимыми (табл. 1). Стрептомицин, добавленный к чув-

Таблица 1
Рост стрептомициновых мутантов *E. coli* СА167
на полноценной среде Эндо при 37°С

Номера мутантов штамма СА167	Рост мутантов на среде Эндо	
	без стрептоми- цина	с добавлением стрептомицина
СМ-р мутанты		
С1—С19, С21—С38	3	3
С40—С60, С62, С64—	3	3
С66, С68—С70, С72—	3	3
С94, С96—С98, С101	3	3
СМ-з мутанты		
С20, С39, С61, С63, С100	0	3
С67, С71, С95, С99,	0	3
СА167 — контроль	3	0

Условные обозначения: 0—отсутствие роста; 3—нормальный рост.

ствительному штамму, приводит к гибели большей части клеток и отбору с низкой частотой спонтанных СМ-р и СМ-з мутантов с изменениями в *str A* локусе.

Исследование роста полученных мутантов на минимальной среде позволило выделить группу мутантов (табл. 2), которые оказались ауксотрофами с полным или частичным генетическим блоком. Из 100 проверенных контрольных клеток штамма СА167 ни одна не проявила ауксотрофности, что исключает возможность стихийного отбора ауксотрофов. На то, что ауксотрофность, выявленная в данном случае, яв-

Таблица 2

Рост ауксотрофов на различных средах при 37°C

Номера мутантов	Минимальная среда М9		Полноценная среда Эндо	
	без стрептомицина	с добавлением стрептомицина	без стрептомицина	с добавлением стрептомицина
СМ-р мутанты				
C23, C37, C72, C78, C90	0	0	3	3
C26, C66	0	1	3	3
C87	1	1	3	3
СМ-з мутанты				
C95, C100, C25, C30	0	1	0	3
SA167 — контроль	3	0	3	0

Условные обозначения: SA167—родительский штамм; 0—отсутствие роста; 1—очень слабый рост; 3—нормальный рост.

ляется результатом СМ-р и СМ-з мутаций, указывают эксперименты по переносу трансдукции *str* A локуса из ауксотрофов в дикий штамм SA167. Все проверенные трансдуктанты оказались ауксотрофами.

Стрептомициновые мутации могут приводить к ауксотрофности, по всей вероятности, либо за счет изменения процесса трансляции, либо из-за дисбаланса ферментов, вследствие нарушения регуляторных механизмов клетки.

Инкубацией всех мутантов при различных температурах нами выделены температурочувствительные мутанты (табл. 3). Эти мутанты по-разному ведут себя на минимальной и полноценных средах во время роста при различных температурах.

Можно представить различные пути появления температурочувствительности у части стрептомициновых мутантов. Так, например, можно предположить, что при 42°C протекает синтез ферментов, однако синтезированные белковые молекулы (с измененными аминокислотами вследствие изменения трансляции) функционально не активны. Возможно, при 42°C прекращается синтез необходимых белковых молекул, вследствие чего такие мутанты при высоких температурах не растут.

Незначительные изменения работы супрессора, связанные со стрептомициновой мутацией, могут регистрироваться на системе взаимодействия нонсенс-супрессоров с нонсенс-мутациями, чем и объясняется наш выбор штамма SA167 в качестве исходной культуры. Обнаружение лак[±], лак⁻ фенотипов наряду с лак⁺ фенотипом (табл. 4) у полученных мутантов (на примере лактозного оперона самой бактерии) указывает на то, что стрептомициновая мутация оказывает свое влияние на работу охра супрессора. Поведение супрессора у полученных мутантов изучалось также проведением анализа супрессора с использованием различных нонсенс мутаций у бактериофага T4. Результаты

Таблица 3

Рост температурочувствительных мутантов *E. coli* CA167 на различных средах при разных температурах инкубации

Номера мутантов	Рост на минимальной среде М9						Рост на полноценной среде					
	без стрептомицина			с добавлением стрептомицина			без стрептомицина			с добавлением стрептомицина		
	при температурах (С)						при температурах (С)					
	27°	37°	42°	27°	37°	42°	27°	37°	42°	27°	37°	42°
СМ-р мутанты												
С48, С74	1	1	0	1	1	0	3	3	0	3	3	0
С35	3	1	0	3	1	0	3	3	0	3	3	0
С60	1	1	0	3	3	0	1	1	0	3	3	0
СМ-з мутанты												
С95, С100	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	3	0
С25, С30	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	3	1
СА167 контроль	3	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	0

Таблица 4

Рост мутантов *E. coli* CA167 на индикаторной среде Эндо при 37°С

Номера мутантов	Без стрептомицина	С добавлением стрептомицина
СМ-р мутанты		
С1—С4, С11—С13, С15, С18, С34, С37, С40, С41—С47, С49, С52, С53, С64—С66, С68, С69, С72, С76, С79—С80, С84, С86, С96—С98, С100	+	+
С5, С6, С8—С10, С14, С16, С17, С21, С22—С23, С48, С50, С62, С77, С78, С81, С82, С83, С85, С88, С89, С91, С92, С93	±	±
С35, С36, С40, С48, С54, С55, С56, С58, С59, С60, С70, С94	—	—
СМ-з мутанты		
С20, С101	0	±
С39, С61, С63, С67, С71, С95, С97, С96	0	—
СА167	+	0

Условные обозначения: +—нормальная способность сбраживать лактозу; ±—ослабленная способность сбраживать лактозу; ——утрата способности сбраживать лактозу; 0—отсутствие роста.

анализа приведены в табл. 5. По характеру работы супрессора все мутанты можно подразделить на несколько групп. В первую группу входят мутанты, которые, как и исходный штамм СА167, супрессируют только охровые мутации. Добавление стрептомицина приводит к тому,

Таблица 5

Изменение характера супрессии нонсенс мутантов фага Т4 стрептомициновыми мутантами E. coli CA167 при 37°C

Номера мутантов штамма CA167	Без стрептомицина				С добавлением стрептомицина			
	Т4	охра	опал	амбер	Т4	охра	опал	амбер
СМ-р мутанты								
С2—С4, С6, С7, С8, С9, С10, С12— С19, С21—С25, С26—С35, С37—С43, С45, С46, С47, С49—С50, С51—С55, С57—С58, С62, С64—С66, С68—С70, С72, С74, С84, С86—С89, С91, С93—С98	3	3	0	0	3	3	0	0
С1, С11, С90, С92, С102	3	3	0	0	3	3	3	0
С48, С56, С59, С60	3	0	0	0	3	0	0	0
С73, С101	0	0	0	0	3	3	3	0
С36, С85	3	0	3	0	3	0	3	0
СМ-з мутанты								
С39, С61, С63, С67, С71, С95, С99, С100	3	3	0	0	3	3	0	0
С20	0	0	0	0	3	3	3	0
CA167	3	3	0	0	0	0	0	0
94	3	0	0	0	0	0	0	0

Условные обозначения: 0—отсутствие зоны лизиса; 3—четкая литическая зона.

что мутанты второй группы, кроме охровых, супрессируют и опаловые мутации фага Т4. Мутанты третьей группы не супрессируют мутаций бактериофага Т4. Четвертую группу составляют стрептомицинзависимые мутанты, которые при наличии стрептомицина в среде супрессируют как охровые, так и опал-мутации фага Т4. Мутанты пятой группы супрессируют не охровые, а мутации опал у фага Т4.

Таким образом, стрептомициновая мутация приводит к нарушению специфичности в работе охра-супрессора. Пути, приводящие к нарушениям в работе супрессоров в результате стрептомициновой мутации, остаются невыясненными. Температурочувствительность, ауксотрофность, выявленные у стрептомициновых мутантов штамма CA167, свидетельствуют о плейотропности как результате стрептомициновой мутации.

Ереванский государственный университет,
кафедра генетики и цитологии (группа
молекулярной генетики)

Поступило 20.IX 1976 г.

Մ. Դ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Է. Դ. ՄՈՒՂՆՅԱՆ

E. coli CA 167 ՇՏԱՄԻ ՍՏՐԵՊՏՈՄԻՅԻՆԱՅԻՆ ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐԻ
ՊԼԵՅՈՏՐՈՓԻԿ ԱՐՏԱՀԱՅՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Մսիտակուց սինթեզող ապարատի կոմպոնենտները կարող են ազդել
տրանսլյացիայի սպեցիֆիկության վրա: Այդ պրոցեսում ուղղորդման գերը

պարզարանելու համար անջատվել և մորֆո-գենետիկական ուսումնասիրության են ենթարկվել 100-ից ավելի ստրեպտոմիցինային (սիբոսոմային) մուտանտներ: Սկզբնական շտամը հանդիսանում է *E. coli* CA 167, որը կրում է օխրա սուպրեսոր, վերջինիս հատկությունների փոփոխությունը ուսումնասիրվել է մուտացիաները սուպրեսիայի ենթարկելու նրա ունակությամբ: Ուսումնասիրված մուտանտների մոտ բացահայտվել է բարձր պլեյոտրոպիայի երևույթ, որն արտահայտվել է մուտանտների հատկությունների փոփոխման մեջ. ինչպիսիք են, օրինակ, ջերմազգայնությունը կամ որոշ նյութեր սինթեզելու ունակությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Оганесян М. Г. Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. Ереван, 18, 1970.
2. Оганесян М. Г., Барегамян И. Н. Биологический журнал Армении, 7, 1974.
3. Daves J. et al. J. Mol. Biol. 12, 1966.
4. Cortni L., Kataja. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1, 1964.
5. Strigini P., Bryckman. J. Mol. Biol., 75, 1973.
6. Piggot P. et al. J. Bacteriology, 110, 1972.
7. Rosset R. et al. J. Mol. Biol., 39, 1959.
8. Pongs O., Nierhus. Febs lett. 41, 1974.
9. Bissel D. M. J. Mol. Biol, 14, 1965.
10. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
11. Benzer S., Champe S. P. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 74, 1961.