

М. Г. ОГАНЕСЯН, М. Б. ЧИТЧЯН

ЗАВИСИМОСТЬ 1-МЕТИЛ-3-НИТРО-1-НИТРОЗОГУАНИДИН- ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА ОТ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНА СУПРЕССОРНОЙ tPHK SupC У АСИНХРОННЫХ И СИНХРОНИЗИРОВАННЫХ КУЛЬТУР ESCHERICHIA COLI

Изучалось влияние генов транспортных РНК на химический мутагенез, индуцированный нитрозогуанидином. Обнаружено, что как у асинхронных, так и у синхронизированных культур *Escherichia coli* индексы реверсий к лейциннезависимости у штаммов, несущих амберную либо охровую аллель гена супрессорной tPHK SupC, уменьшаются по сравнению с исходным Su⁻штаммом.

Результаты последних работ свидетельствуют о влиянии генов tPHK и рибосом на радиационный мутагенез [1—4]. В данной работе изучалось влияние генов tPHK на химический мутагенез, индуцированный 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидином (НГ). Критерием участия гена супрессорной tPHK SupC в мутационном процессе служили различия индексов НГ-индуцированных реверсий к прототрофности у ауксотрофных штаммов, отличающихся друг от друга аллельными состояниями гена супрессорной tPHK SupC.

Материал и методика. В работе использовали штаммы РА6021, РА6021/12 и РА6021/17, характеристика которых приведена в предыдущем сообщении [4]. Используемые полноценные и минимальные среды также описаны ранее [4]. Полусинтетическую среду (ПСС) готовили на основе минимальной среды М9 с добавлением необходимых факторов роста и 0,01% раствора гидролизата казенна. Фенэтилакогель (ФЭА) использовали в концентрации 0,3%. Обработку НГ проводили в ацетатном буфере при pH 5,6, в котором НГ растворяли непосредственно перед испытанием.

Получение синхронизированной культуры. Суточную культуру разводили в ПСС и инкубировали при 37°C до логарифмической фазы роста, после чего добавляли ФЭА. После двухчасовой инкубации с ФЭА культуру отмывали центрифугированием, ресуспендировали в ПСС и переносили в водяную баню на 25°C. О времени удвоения синхронизированной культуры судили по изменению оптической плотности и титра изучаемой культуры. Определение оптической плотности проводили на фотоэлектрокалоприметре (ФЭК-56-ПМ).

Определение спонтанных и НГ-индуцированных индексов реверсий. Культуру в логарифмической фазе роста отмывали центрифугированием и ресуспендировали в буфере (либо в НГ-содержащем буфере из расчета конечной концентрации мутагена 100 мкг/мл).

Культуру в течение 30 мин выдерживали на водяной бане при 37°C, затем отмывали буфером и высевали на селективные среды для отбора ревертантов.

Обработка синхронизированной культуры нитрозогуанидином. Из синхронно растущей культуры в течение 2-х час. через определенные промежутки времени брали пробы, обрабатывали мутагеном (в течение 30 мин при 37°C), после чего отмывали буфером и высевали на селективные среды для отбора ревертантов.

Результаты и обсуждение. Определение индексов спонтанных реверсий к лейцин- и адениннезависимости выявило крайне низкую частоту ревертирования исходного штамма по обоим маркерам. Введение в клетку любой из аллелей супрессорного гена SupC не привело к какому-либо заметному изменению индексов реверсий по изучаемым маркерам (табл. 1).

Таблица 1

Индексы спонтанных и НГ-индуцированных реверсий к лейцин- и адениннезависимости у изучаемых штаммов

Штамм	Обработка	Проверено бактериальных клеток по признаку		Обнаружено ревертантов по потребности		Индекс реверсий по признаку	
		лейцин-зависимость	аденин-зависимость	в лейцине	в аденине	лейцинзависимость	аденилзависимость
РА6021	СП*	$1,20 \cdot 10^9$	$1,20 \cdot 10^9$	4	3	$< 1 \cdot 10^{-9}$	$< 1 \cdot 10^{-9}$
	НГ**	$8,33 \cdot 10^8$	$8,33 \cdot 10^8$	37260	2	$45,0 \cdot 10^{-6}$	$< 1 \cdot 10^{-9}$
РА6021/17	СП	$2,20 \cdot 10^9$	$2,20 \cdot 10^9$	3	3	$< 1 \cdot 10^{-9}$	$< 1 \cdot 10^{-9}$
	НГ	$1,20 \cdot 10^9$	$1,20 \cdot 10^9$	11170	4	$11,2 \cdot 10^{-6}$	$< 1 \cdot 10^{-9}$
РА6021/12	СП	$4,20 \cdot 10^9$	$4,20 \cdot 10^9$	5	4	$< 1 \cdot 10^{-9}$	$< 1 \cdot 10^{-9}$
	НГ	$3,63 \cdot 10^9$	$3,63 \cdot 10^9$	11405	3	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$< 1 \cdot 10^{-9}$

* СП—спонтанно

** после обработки НГ.

Обработка нитрозогуанидином не оказала влияния на индексы реверсий по адениновому маркеру. В то же время индексы реверсий к лейциннезависимости у всех штаммов по сравнению со спонтанным фоном существенно увеличились. При этом обнаружилось, что по сравнению с исходным штаммом НГ-индуцированный мутагенез у штамма, несущего охровую аллель гена SupC, выражен в 4 раза слабее, а в случае с амберной аллелью в 13 раз (табл. 1).

Поскольку НГ индуцирует максимальное число мутационных изменений в точке репликации хромосомы [5], была проведена серия экспериментов по изучению НГ-индуцированного мутагенеза у культур, синхронизированных по редупликации хромосом. В качестве синхронизирующего агента был использован ФЭА, который селективно ингибирует синтез ДНК. При этом хромосомы клеток, вступившие в цикл репликации до добавления ФЭА, завершают его нормально [6, 7]. На рис. 1 приведены результаты синхронизации исходного штамма РА6021 (рис. 1).

Сразу после добавления ФЭА выявляются различия в росте контрольной и обработанной ФЭА культур. В то время как оптическая плотность контрольной культуры растет непрерывно, у обработанной культуры она растет значительно медленнее, а к концу второго часа рост почти полностью прекращается. После удаления ФЭА оптические плотности контрольной и обработанной культур выравниваются.

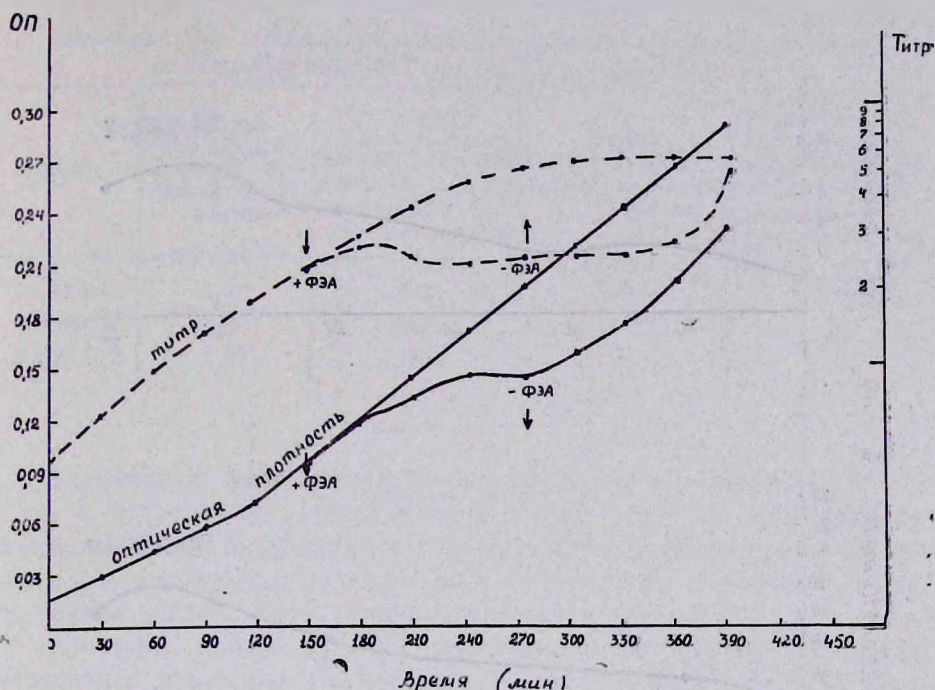


Рис. 1. Синхронизация феноэтилалкоголем штамма РА6021.

Результаты по определению титров синхронно растущей культуры показали, что среднее время для удвоения синхронизированной культуры составляет 2 часа при 25°C (аналогичные результаты были получены и для штаммов РА6021/17 и РА6021/12).

Мутагенная обработка синхронизированных культур выявила ту же закономерность зависимости частот мутаций от аллельного состояния гена супрессорной гРНК SupC, которая наблюдалась при изучении мутагенеза у асинхронных культур (рис. 2). Исходный штамм РА6021 обнаруживал большую мутабельность по сравнению со штаммом, содержащим охровый супрессор. При сравнении штамма РА6021 с амберным производным разница в мутабельности оказалась еще более значительной.

При этом у всех трех штаммов максимальный выход ревертантов наблюдался на 100—110 мин обработки.

Таким образом, независимо от того, связан ли наблюдаемый максимум мутаций с обратными мутациями в лейциновом гене или это результат изменений в каком-либо супрессорном гене, приводящих к восстановлению лейциннезависимости, различные аллели гена SupC приводят к существенному изменению уровня мутабельности. При этом общий характер кривых остается неизменным, с хорошо выраженным увеличением выхода мутаций на одном и том же участке.

При сравнении приведенных данных с ранее полученными [4] результатами по УФ-индуцированному мутагенезу у изучаемых штаммов

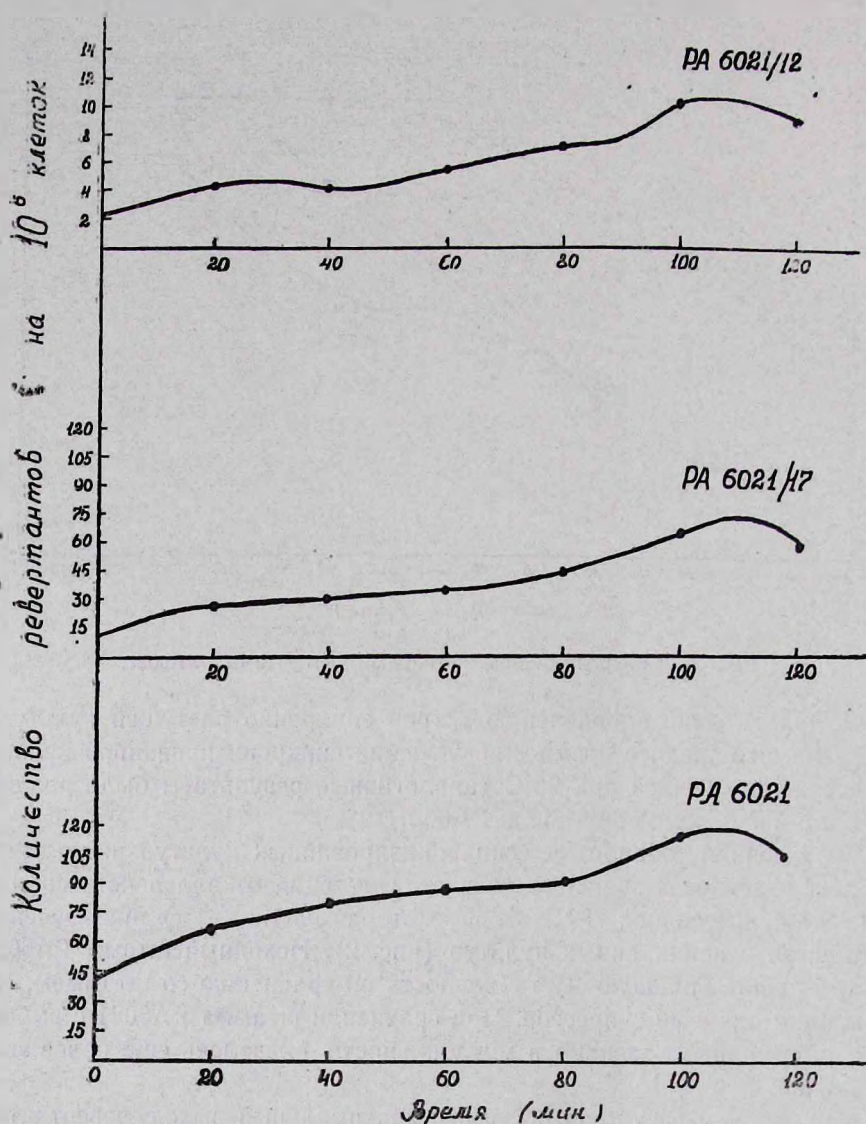


Рис. 2. НГ-индуцированные реверсии к лейциннезависимости у синхронизированных культур штаммов РА6021, РА6021/17 и РА6021/12.

обнаруживается, что в зависимости от использованного мутагена введение в клетку супрессора может привести либо к увеличению, либо к уменьшению индексов реверсий к прототрофности по сравнению с исходным Su⁻штаммом. Так, наличие в клетке как амберной, так и охровой аллелей SupC гена привело к увеличению УФ-индуцированных частот реверсий к лейциннезависимости по сравнению с исходным штаммом (табл. 2).

Таблица 2

Зависимость УФ- и НГ-индуцированной мутабельности к лейциннезависимости от аллельного состояния гена *SupC* у изучаемых штаммов

Штамм	Индекс УФ-индуци- рованных ре- версий на 10 ⁶ клеток	Соотношение УФ-индуциро- ванных индексов реверсий исходно- го штамма и Su ⁺ производных, %	Индекс НГ-индуциро- ванных реверсий на 10 клеток	Соотношение НГ-индуциро- ванных индексов реверсий исходно- го штамма и Su ⁺ производных, %
РА6021	1.45	100	45,00	100
РА6021/17	7,90	545	11,20	25
РА6021/12	7,00	483	3,50	7

Полученные результаты, по-видимому, можно интерпретировать в свете современных представлений о мутагенезе, согласно которым мутации у *E. coli* индуцируются либо вследствие ошибок, происходящих при гес А-зависимой репарации, либо из-за ошибок репликации, обусловленных повреждением репликационного механизма [8].

Конечный выход мутаций определяется как работой указанных механизмов репарации и репликации, так и химической природой первичных премутационных повреждений [9]. Исходя из этого, можно предположить, что вовлечение генов супрессорных тРНК в мутационный процесс может осуществляться многими путями. Например, возможно, что в зависимости от аллельного состояния гена *SupC* по-разному будет осуществляться супрессия индуцируемых нонсенс-мутаций в генах, имеющих непосредственное отношение к восстановлению лейциннезависимости, а также в генах, ответственных за механизмы репарации, репликации, рекомбинации. Возможно также, что вмешательство генов тРНК в мутационный процесс осуществляется иными путями, в том числе путем изменения регуляторной функции тРНК в биосинтезе белка.

Согласно гипотезе, предложенной Седвиком [10], механизм мутагенного действия УФ-лучей связывается с гес А exг А —зависимым типом пострепликативной репарации (так называемой «SOS» репарацией). Индукция мутаций нитрозогуанидином связана с нарушениями репликационного механизма [11]. Исходя из этого, можно предположить, что обнаруживаемое увеличение или уменьшение индексов реверсий у Su⁺ штаммов является результатом специфического участия гена супрессорной тРНК в мутагенезе. Указанная специфичность участия может обуславливаться тем, какой механизм обеспечивает становление мутаций при обработке данным мутагеном, а также способом вовлечения гена супрессорной тРНК в формирование мутаций. При этом большее или меньшее изменение индекса реверсий, обусловленное присутствием амберного или охрового супрессора в клетке, по-видимому, зависят от того, преимущественно какого типа замены оснований индуци-

руются в каждом конкретном случае и в каких генах происходят эти замены.

Чаренцаванский филиал
ВНИИ генетики

Поступило 17.I 1977 г.

Մ. Դ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Մ. Բ. ՉԻՏՉՅԱՆ

**1-ՄԵԹԻԼ-3-ՆԻՏՐՈ-1-ՆԻՏՐՈՋՈՒԿՈՒԱՆԻԿԻՆՈՎ ՄՈՒՏԱԳԵՆԵԶԻ
ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՒՊԵՐԵՍՈՐԱՅԻՆ ԵՐԹ ՍՈՒՍԿԻՆՈՎ
ՎԻՃԱԿԻՑ *ESCHERICHIA COLI* ԱՍԻՆԵՐՈՆ ԵՎ ՍԻՆԵՐՈՆ
ԿՈՒՆՏՐՈՒՐԱՆԵՐԻ ՄՈՏ**

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է տրանսպորտային ՌՆԹ-ի գեների մասնակցությունը նիտրոդոգուանիդինով ինդուցված քիմիական մուտագենեզում, հայտնաբերվել է, որ *E. coli*-ի ինչպես ասինխրոն, այնպես էլ սինխրոն կոպտուրաների մոտ լեյցին-անկախություն ունեցող գործակիցը այն շտամների մոտ, որոնք պարունակում են սուպրեսորային տՌՆԹ ՍուՍ գենի ամբեր կամ օխրա լակ, իջնում է հյալիտային Սու-շտամի համեմատությամբ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Оганесян М. Г., Чахалян А. Х. Тез. докл. II Всесоюзн. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов: мутагенез и репарация», 23, М., 1973
2. Оганесян М. Г., Чахалян А. Х. Биологический журнал Армении, 27, 8, 1974.
3. Оганесян М. Г., Читчян М. Б. Тез. докл. II Всесоюзн. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов: мутагенез и репарация», 58, М., 1973.
4. Оганесян М. Г., Читчян М. Б. Биологический журнал Армении, 28, 2, 1975.
5. Cerda-Olmedo E., Hanawalt P. C. J. Mol. Biol., 33, 705, 1968.
6. Silver S. J. Bacteriol., 93, 2, 1967.
7. Trelck R. W., Konetzka W. A. J. Bacteriol., 88, 6, 1964.
8. Ishii Y., Kondo S. Mut. Res., 27, 1, 1975.
9. Kondo S. Genetics Suppl., 73, 109, 1973.
10. Sedwick J. Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 1025, 1975.
11. Jimenez-Sanchez A., Cerda-Olmedo E. Mut. Res., 28, 337, 1975.