ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ РИФАМПИЦИНРЕЗИСТЕНТНЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗНЫХ МУТАНТОВ E. COLI В/г

М. Г. ОГАНЕСЯН, А. В. АРУТЮНЯН

Было получено и изучено 200 рифампицинрезистентных РНК-полимеразных мутантов у *E. coli* В/г. Анализ показал, что у 5 мутантов проявляется высокоплейотропный эффект таких мутаций. Изменению подвергаются такие свойства как термочувствительность, ауксотрофность, способность супрессировать нонсенс мутации, генерационное время, что связано с изменениями свойств РНК-полимеразы.

Показано, что условнолетальные мутации в гене 43 бактериофага Т4 (ген, контролирующий биосинтез ДНК-полимеразы) обладают мутаторным эффектом, обусловленным тем, что мутантный фермент допускает ошибки при репликации ДНК [1]. Исходя из общности функций (матричная конденсация нуклеотидов) ферментов ДНК- и РНК-полимеразы, было высказано предположение, что мутантные РНК-полимеразы могут допускать ошибки на разных стадиях (узнавание, инициация, элонгация, терминация) процесса транскрипции генетической информации [2].

При этом предполагалось, что такого рода мутации должны иметь плейотропное (множественное) действие, поскольку РНК-полимераза участвует в транскрипции большинства (если не всех) генов. Действительно, удалось получить рифампицинрезистентные (затрагивают ген, кодирующий β -субъединицу РНК-полимеразы) мутанты *E. coli* К12 с высокоплейотропным эффектом [3].

Изучение около 80 РНК-полимеразных мутаций, полученных у штаммов *E. coli* К12, несущих амберные (SupD, SupE, SupF), охровый (SupC) и опаловый (UGA1) супрессоры, показало, что ряд мутантов претерпел изменение таких свойств, как термочувствительность, способность синтезировать важнейшие метаболиты (аминокислоты, нуклеотиды, витамины), характер супрессии нонсенс мутаций у бактерий (по способности сбрасывать лактозу или синтезировать триптофан) и бактериофагов, а также морфо-физиологические особенности клеток и их колоний [4].

В сообщении описываются рифампицинрезистентные РНК-полимеразные мутации с высокоплейотропным эффектом, полученные у *E. coli* В/г с целью отбора мутантов, пригодных для изучения приро-

ды возможных ошибок, допускаемых мутантной РНК-полимеразой при транскрипции генетической информации.

Материал и методика. Использовали штамм *E. coli* В/г WU36—10—11—12 leu_{am}^+ tur_{oc}^+ $SupE_{oc}$. В результате супрессии нонсенс мутаций в лейциновом и тирозиновом генах $SupE_{oc}$ супрессором (охровый конвертант супрессора $SupE$) фенотипически штамм становится прототрофом.

Были использованы фаг Т4В и его производные, содержащие нонсенс мутации (табл. 1).

Т а б л и ц а 1
Нонсенс мутанты фага Т4В

Фаг	Природа мутации	Чувствительность к супрессору
Н—78	амберная	$SupD$ $SupE$
Н ₂ —16	амберная	$SupE$
Н ₂ —36	амберная	$SupD$ $SupE$
Н ₃ —44	амберная	$SupE$ $SupF$
Н ₃ —54	амберная	$SupE$ $SupF$
ос—3	охровая	$SupB$
ос—5	охровая	$SupC$

Минимальной средой (МС) служила М9 [5], L-аминокислоты добавлялись в концентрации 20 мкг/мл. В качестве полноценных сред (ПС) применяли мясопептонный бульон (МПБ), индикаторную среду Эндо и Т-среду, содержащую дрожжевой экстракт 5 г, пептон 10 г и NaCl 5 г на 1 л H_2O ; после стерилизации добавляли глюкозу (0,1%).

Были использованы кристаллические препараты рифампицина («Lowson» Англия) и стрептомицинсульфата (отечественного производства). За исключением особо отмеченных случаев, концентрация рифампицина равнялась 50 мкг/мл, стрептомицинсульфата — 100 мкг/мл.

Выделение спонтанных рифампициностойчивых мутантов. Клетки штамма WU36—10—11—12, взятые из отдельных колоний, выращивались в пробирках с МПБ до титра $3—5 \times 10^8$ клеток/мл. Затем из каждой культуры по $2—4 \times 10^7$ клеток переносились в пробирки с МПБ, содержащим 50 мкг/мл рифампицина и инкубировались 48 час. при 37°. Из пробирок с помутневшим бульоном клетки переносились на среду Эндо, содержащую рифампицин в той же концентрации, и инкубировались при 37°. Колонии, образовавшиеся после 48-часовой инкубации из серийных разведений пересеивались еще трижды на ту же среду для получения чистых линий мутантов.

Методы анализа рифампициностойчивых мутантов. Ауксотрофность и термочувствительность определялись по росту на месте капель бактериальных суспензий или штрихов на полноценной и минимальных синтетических средах при 37° и 42°. Способность поддерживать развитие нонсенс мутантов фага Т4В определялась по Бензеру [6]. Используемые мутанты фага приведены в табл. 1. Одноочный цикл размножения (ОЦР) фага Т4В определялся по Элию и Дельбрюку [7], лактозосбраживающая способность—по окраске колоний на индикаторной среде Эндо.

Бактерии выращивались в Т-среде при усиленной аэрации. Через определенные промежутки времени брались пробы для определения титра. На стадии логарифмического роста определялось значение времени генерации по формуле [8]:

$$g = \frac{t_2 - t_1}{3,3 \lg \frac{B}{b}}$$

где g — время генерации, b — титр в момент t_1 , B — титр в момент t_2 .

Ночные культуры бактерий после 2-часового выращивания в свежей питательной среде высевались на чашки со средой Эндо. После 40-часовой инкубации при 37° исследовались размеры и форма колоний.

Результаты и обсуждение. Рифампицинрезистентные (риф-р) мутанты были получены у штамма WU36—10—11—12, содержащего две нонсенс мутации (амберную—в лейциновом гене, охровую—в тирозиновом) и SupE_{oc} супрессор, который подавляет проявление обеих нонсенс мутаций. Выбор этого штамма был обусловлен тем, что наличие системы нонсенс супрессии позволяло сравнительно легко отобрать риф-р мутации с плеiotропным действием, поскольку даже незначительные изменения выражения супрессорного гена (что могло произойти под влиянием риф-р мутации) должны были заметно повлиять на фенотип организма. Подобные изменения в проявлении каких-либо других генов могли остаться незамеченными.

Рост исходного штамма на полноценной агаризованной среде полностью подавляется концентрацией рифампицина 15 мкг/мл, а на минимальной—5 мкг/мл. Проверено 200 риф-р мутантов, которые по устойчивости к рифампицину подразделялись на две основные группы: 1—устойчивые к дозам антибиотика до 150 мкг/мл (мутанты гроВ401, гроВ402, гроВ403) и 2—способные расти при концентрации антибиотика более 400 мкг/мл (гроВ409, гроВ423).

Таблица 2
Минимальные концентрации рифампицина,
подавляющие рост риф-р мутантов на
ПС и МС при 37°

Группа	Штамм	Концентрация рифампицина, мкг/мл		
		МС	ПС	
I	WU36—10—11—12	5	15	
	{	гроВ 402	25	75
		гроВ 403	30	100
		гроВ 401	70	150
II	{	гроВ 409	> 100	> 400
		гроВ 423	> 100	> 400

Из табл. 2 видно, что как мутанты, так и исходный штамм на минимальной среде более чувствительны к рифампицину, чем на полноценной. При 27° риф-р мутанты по рифампицинчувствительности не отличаются от родительской культуры.

С целью отбора риф-р мутантов, отличающихся от исходного штамма помимо устойчивости к рифампицину и по другим признакам, был проведен их физиологический анализ. Исследовались следующие свойства штаммов: ауксотрофность, термочувствительность, супрессирующая способность SupI_{oc} супрессора, способность поддерживать

развитие дикого фага Т4В, способность сбраживать лактозу, время генерации и морфология колоний.

Ауксотрофность и термочувствительность. Ауксотрофность определялась высевом штаммов на минимальную среду. В результате этих опытов были выделены 3 ауксотрофных риф-р мутанта (groB401, groB409 и groB423). При идентификации ауксотрофности в первую очередь была проверена зависимость роста этих мутантов от лейцина и тирозина, поскольку, как было указано, даже небольшие нарушения супрессии нонсенс мутаций в лейциновом и тирозиновом генах могли привести к их фенотипическому проявлению. Причем, мутант может нуждаться или в одной из указанных аминокислот, или одновременно в обеих.

Таблица 3

Рост риф-р мутантов на ПС и МС при 37° и 42°

Температура	Штамм	ПС	МС	МС с добавками		
				лей	тир	лей + тир
37°	WU36—10—11—12	3	3	3	3	3
	groB 401	3	0	3	0	3
	groB 402	3	3	3	3	3
	groB 403	3	3	3	3	3
	groB 409	3	0	3	3	3
	groB 423	3	0	0	0	3
42°	WU36—10—11—12	3	3	3	3	3
	groB 401	3	0	0	0	3
	groB 402	3	3	3	3	3
	groB 403	3	0	0	0	0
	groB 409	3	0	3	0	3
	groB 423	3	0	0	0	3

Обозначения: лей—лейцин, тир—тирозин, 3—нормальный рост, 0—отсутствие роста.

Результаты опытов (табл. 3) свидетельствуют о том, что groB401 нуждается в лейцине, groB423—в лейцине и тирозине, а groB409 растет при добавке в среду либо лейцина, либо тирозина.

Наблюдается зависимость потребности в факторах роста от температуры инкубации. Сравнив данные, приведенные в табл. 3, можно заметить, что мутант groB401, нуждающийся при 37° в лейцине, при 42° нуждается и в лейцине, и в тирозине; groB409 при высокой температуре растет лишь на средах, содержащих лейцин, в то время как при 37° рост его поддерживается также тирозином. Мутант groB403 не растет при высокой температуре ни на одной из использованных сред, кроме сред, содержащих дрожжевой экстракт. Попытка идентифицировать потребность в факторах роста этого мутанта методом Холлидея [9] не увенчалась успехом.

Для того, чтобы определить обусловлена ли ауксотрофность этих мутантов нарушением супрессии нонсенс мутаций, была проверена способность SupEос супрессора подавлять нонсенс мутации в фаговом геноме.

Способность риф-р мутантов поддерживать развитие нонсенс мутантов фага T4B. О супрессирующей способности SupEос супрессора судили по развитию фагов, производных T4B, содержащих амберную и охровую мутации (табл. 4).

Данные, представленные в табл. 4, показывают, что только у мутанта гроВ423 полностью утрачена способность супрессировать как амберные, так и охровые мутации фагов T4B. У остальных мутантов в зависимости от температуры полностью или частично утрачивается способность супрессировать только амберные мутации фага T4B. Однако следует отметить, что мутант гроВ403 в отличие от исходной культуры приобретает способность при 37° поддерживать развитие фагов H-78 и H₂-36. Эти результаты говорят в пользу предположения о том, что ауксотрофность риф-р мутантов может быть обусловлена утратой способности SupEос эффективно супрессировать амберные или амберные и охровые мутации, особенно при 42°.

ОЦР фага T4B. Большинство выделенных риф-р мутантов нормально поддерживает развитие дикого фага T4B. Мутант гроВ402 отличается по этому свойству от родительского штамма и других риф-р мутантов. Как видно из табл. 4, фаг T4B очень слабо развивается на гроВ402, о чем свидетельствуют также результаты опыта по определению одиночного цикла и кинетики размножения фага T4B (рис. 1).

Выход фага в случае исходного штамма составляет 240 фаговых частиц на клетку, а у мутанта гроВ402 в 30 раз меньше (8 фаговых частиц.).

Родительский штамм независимо от температуры нормально сбраживает лактозу. Мутант гроВ401 при 27° на среде Эндо образует колонии светло-розового цвета. Это свидетельствует о том, что он при низкой температуре либо не сбраживает лактозу, либо сбраживает много хуже, чем исходный штамм. При высоких температурах (37° и 42°) эта способность частично восстанавливается.

Эксперименты по определению времени генерации показывают, что риф-р мутанты растут медленнее исходной культуры WU36—10—11—12. Время генерации (мин): WU36—10—11—12—25, гроВ409—30, гроВ401—43, гроВ403—58, гроВ402—60.

Среди риф-р мутантов оказались также колонии которых морфологически отличаются от колоний родительского штамма. Колонии мутантов гроВ402 и гроВ403 много меньше колоний WU36—10—11—12. При инкубации более 30 час. соотношение размеров колоний не изменяется. Колонии мутанта гроВ401 плоские, шероховатые, с изрезанными краями и неправильной формы.

Развитие консенс мутантов фага T4B

Фаг	Ш т л м м												
	WU36—10—11—12		гpo B 401		гpo B 402		гpo B 403		гpo B 409		гpo B 423		
	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	
H—78	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—	—
H ₂ —16	+++	+++	—	—	+	+	+++	+	++	+	—	—	—
H ₂ —36	—	—	—	—	—	—	+++	++	—	—	—	—	—
H ₂ —44	+++	+++	—	—	+	+	+++	++	++	+	—	—	—
H ₂ —54	+++	+++	++	—	+	+	+++	++	++	+	—	—	—
oc—3	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	—	—	—
oc—5	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	—	—	—
T4B	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Обозначения: +++ — нормальный рост фагов, ++ — ослабленный рост, + — очень слабый рост — — отсутствие роста.

Таким образом, результаты анализа позволили выделить 5 риф-р мутантов, которые помимо устойчивости к рифампицину отличаются от исходного штамма еще по одному или более признакам.

У штамма *E. coli* В/г WU36—10—11—12 получено 200 спонтанных риф-р мутантов. Чтобы практически исключить возможность отбора множественных мутантов, мутагены не применялись.

По своему основному признаку—рифампицинрезистентности—мутанты отличаются друг от друга. Ряд мутантов устойчив к высоким концентрациям рифампицина (400 мкг/мл и более), в то время как рост трех мутантов (гроВ401, гроВ402 и гроВ403) подавляется концентрацией антибиотика до 150 мкг/мл. *In vitro* синтез РНК, осуществляемый ферментами, выделенными из этих мутантов, также более чувствителен к рифампицину [10].

Было отобрано 5 риф-р мутантов (гроВ401, гроВ402, гроВ403, гроВ409 и гроВ423), которые отличаются друг от друга и от исходного штамма по ряду фенотипических признаков: аутокотрофности, термочувствительности, способности поддерживать развитие нонсенс мутантов фага Т4В, кинетике развития и выходу фага Т4В, способности сбраживать лактозу, времени генерации, морфологии колоний.

Результаты *in vitro* изучения синтеза РНК, выделенной из этих мутантов РНК-полимеразой, в присутствии рифампицина свидетельствуют о том, что рифампицинрезистентность мутантов обусловлена изменением свойств РНК-полимеразы [10].

Так как условия отбора риф-р мутантов практически исключали отбор множественных мутантов, можно предположить, что изменение одновременно с рифампицинустойчивостью ряда свойств клетки является результатом плейотропного действия риф-р мутаций.

Фялнал ВНИИ генетики,
г. Чаренцаван

Поступило 13.II 1978 г.

E. coli В/г ՇՏԱՄԻ ՄՈՏ ՌԻՖԱՄՊԻՑԻՆԱԿԱՅՈՒՆ ՌԵՔՊԼԻՄԵՆՐԱԶԱՅԻՆ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ՆՏԱՑՈՒՄԸ ԵՎ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Վ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

E. coli В/г շտամի մոտ ստացվել է ուսումնասիրվել են 200 ռիֆամպիցինակալուն ՌՆՔ-պոլիմերազային մուտանտներ: Փորձերի տվյալները ցույց տվեցին, որ հինգ մուտանտների մոտ արտահայտվում է այդ տիպի մուտացիաների բարձր պլեյոտրոպ էֆեկտ: Փոփոխվում են նաև շերմազգայնությունը, աուքոտրոֆությունը, նոնսենս մուտացիաներ սուպրեսսացման ունակությունը, գեներացիոն ժամանակը: Նշված փոփոխությունները կապված են ՌՆՔ-պոլիմերազի հատկությունների փոփոխման հետ:

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RIFAMPICYNE-
RESISTANT RNA-POLYMERASE MUTANTS OF
ESCHERICHIA COLI B/r

M. G. OGANESSIAN, A. V. ARUTYUNIAN

200 rifampicyne-resistant RNA-polymerase mutants of *Escherichia coli* B/r have been isolated and studied. The results presented in the paper indicate that 5 mutants demonstrate high pleiotropic effect. Subject to a change are such properties as thermosensitivity, auxotrophy, nonsense mutations supressing ability and generation time of mutants, and this is related to the changes of RNA-polymerase properties.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Speyer J. F., Karam J. D., Lenny A. B.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 693, 1966.
2. *Оганесян М. Г.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, 3, Ереван, 1970.
3. *Оганесян М. Г.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии, 30, Ереван, 1970.
4. *Оганесян М. Г.* Ингибиторы вирусной активности, 161, Рига, 1972.
5. *Адамс М.* Бактериофаги, 394, М., 1961.
6. *Benzer S., Champe S. P.* Proc. Nat. Acad. Sci. Wash., 47, 1025, 1961.
7. *Ellis E. L., Delbrück M.* J. Gen. Phistol., 22, 365, 1939.
8. *Тимаков В. Д., Гольдфарб Д. М.* В кн.: Основы экспериментальной медицинской бактериологии, 260, М., 1958.
9. *Hollliday R.* Nature, 178, 1987, 1956.
10. *Оганесян М. Г., Арутюнян А. В., Озолинь О. Н., Камзолова С. Г.* ДАН СССР, 233, 487, 1977.