

ВЛИЯНИЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ СРЕДЫ НА ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ РНК-ПОЛИМЕРАЗНЫХ МУТАЦИЙ

М. Г. ОГАНЕСЯН, А. В. АРУТЮНЯН

Для доказательства плеiotропного проявления РНК-полимеразных мутаций рифампицинрезистентные аллели из различных мутантов были перенесены в исходную культуру при помощи трансдукции. Большинство рекомбинантов повторяло свойства РНК-полимеразного мутанта. Перенос тех же аллелей в два других генетически отличающихся штамма показал, что в зависимости от генетического окружения плеiotропный эффект РНК-полимеразных мутаций проявляется по-разному.

В 1970 г. соавтором данной статьи было выдвинуто предположение о возможных ошибках на разных стадиях процесса транскрипции, допускаемых мутантными РНК-полимеразами [1]. Ранее нами у *E. coli* В/г была выделена большая группа рифампицинрезистентных (риф-р) мутантов, у которых изменен ген, кодирующий β -субъединицу РНК-полимеразы. У пяти мутантов наряду с резистентностью к рифампицину изменились и другие свойства (плеiotропный эффект) [2].

В настоящем сообщении приводятся данные, свидетельствующие о том, что отмеченные изменения являются результатом плеiotропного проявления мутаций в РНК-полимеразном гене и подвержены влиянию генотипической среды.

Материал и методика. Были использованы штаммы *E. coli* K12 Δ Ura⁺ Hfr argH SupE (получен от С. З. Миндлин), CH327 F⁻ thl argH trp SupE str-r, а также *E. coli* В/г WU36-10-11-12 leu^{am} tyro^c SupE^{oc} (получен от Пирсона, США) и его риф-р производные, свойства которых описаны в табл. 1.

Применялись фаги Т4В и его производные с различными нонсенс мутациями [3], а также трансдуцирующий фаг Р1. В качестве минимальной использовалась среда М9 [4], а полноценных—мясо-пептонный бульон и агар (МПБ, МПА), а также индикаторная среда Эндо для определения лактозосбраживающей способности культур и Т-среда [5] для осуществления трансдукции. В работе был использован кристаллический препарат рифампицина («Lowson», Англия).

Перенос риф-р аллелей мутантов в исходный штамм был осуществлен трансдукцией с помощью фага Р1. Трансдукционная смесь высевалась на чашки методом агаровых слоев [4]. Трансдукционные скрещивания проводились по следующей методике. Трансдуцирующий фаг выращивался в высоком титре на донорной культуре, полученным затем заражали реципиентную культуру. Трансдукционную смесь инкубировали 20 мин, затем центрифугированием освобождали от неадсорбированных фаговых частиц. Осадок ресуспендировали и высевали на соответствующие селективные среды для отбора трансдуктантов.

Таблица 1

Характеристика риф-р мутантов

Риф-р мутант	Морфология колоний	Время генерации, мин	Ауксотрофность		Развитие фагов, чувствительных к супрессорам	
			37°	42°	37°	42°
рго В401	крупные, разрезанные	43	лейцинзависимый	лейцин- и тирозинзависимый	Sup E** Sup B	Sup B
рго В402	мелкие	60	прототроф	прототроф	*	*
рго В403	мелкие	58	прототроф	ауксотроф	Sup E Sup B	Sup E** Sup B
рго В409	крупные	30	лейцин- или тирозинзависимый	лейцинзависимый	Sup E** Sup B	Sup E** Sup B
рго В423	крупные	25	лейцин- и тирозинзависимый	лейцин- и тирозинзависимый	не развиваются	
Исходный штамм WU36—10—11—12	крупные	25	прототроф	прототроф	Sup E Sup B	Sup E Sup B

*—свойство определить не удается, так как сам дикий фог Т4В развивается плохо.

**—фаги, чувствительные к SupE супрессору, развиваются слабо.

Результаты и обсуждение. Нами выделены спонтанные риф-р мутанты, отличающиеся друг от друга и от родительского штамма по рифампицинрезистентности и рядом других свойств (табл. 1).

Предполагалось, что причиной изменения ряда фенотипических признаков мутантов является плеiotропный эффект РНК-полимеразных мутаций. Правильность этого можно было проверить переносом аллелей рифампицинустойчивости в геном родительского штамма, а также замещением аллелей рифампицинустойчивости аллелем рифампицинчувствительности в геномах риф-р штаммов. Если при проверке первым способом оказалось бы, что родительский штамм приобрел характерные признаки мутанта, а при проверке вторым—произошел возврат к исходному фенотипу, предположение можно было бы считать правильным.

Анализ риф-р колоний, полученных в результате переноса риф-р аллелей мутантов в исходный штамм. Приводятся результаты анализа риф-р колоний, полученных после трансдукционных скрещиваний каждого мутанта с исходным штаммом.

гpоB401 × *WU36—10—11—12*. У 96% проверенных риф-р колоний, выросших из посева трансдукционной смеси, изменены следующие свойства. Способность сбраживать лактозу: при 27° лактоза сбраживается слабо или не сбраживается, а при 37° эта способность в некоторой степени восстанавливается, но остается ниже уровня родительского штамма. Способность поддерживать развитие нонсенс мутантов фага Т4В: амбер-мутанты фага при 37° образуют мутную зону лизиса, что свидетельствует об их плохом развитии, а при 42° вообще не образуют таковую. При 37° клетки нуждаются в лейцине, а при 42°—в лейцине и тирозине. Время генерации, как и у мутанта *гpоB401*, составляет 43 мин (у исходной культуры *WU36—10—11—12* — 25 мин). Колонии плоские, шероховатые, с разрезанными краями.

Сравнив описанные свойства риф-р колоний со свойствами мутанта *гpоB401* (табл. 1), можно заключить, что они являются рекомбинантными по риф-р аллелю, поскольку характерные свойства мутанта *гpоB401*, обусловленные данной риф-р мутацией, проявляются и у трансдуктантов.

гpоB402 × *WU36—10—11—12*. У подавляющего большинства риф-р колоний (92%) изменены некоторые свойства. Выход фагового потомства в расчете на каждую зараженную клетку равен 8, что в 30 раз меньше, чем у реципиента. Время генерации как и у мутанта *гpоB402*—60 мин. Колонии примерно вдвое меньше, чем у реципиента.

Как видим, характерные признаки мутанта *гpоB402* передаются вместе с риф-р аллелем, на основании этого можно заключить, что они являются результатом плеiotропного проявления риф-р мутаций.

гpоB403 × *WU36—10—11—12*. Свойства 95% риф-р колоний совпадают с характерными свойствами донора (мутанта *гpоB403*). Поддерживают развитие амбер-мутантов Н-78 и Н₂—36, которые не растут на газоне реципиента, развитие их как и других амберных мутан-

тов фага Т4В зависит от температуры. При 37° риф-р колонии являются прототрофами, а при 42° не растут ни на одной из синтетических сред, предложенных Холлидеем для идентификации ауксотрофности [6]. Время генерации—58 мин, как и у мутанта гроВ403. Колонии примерно вдвое меньше колоний реципиента.

гроВ409 × *WU36—10—11—12*. Мутант гроВ409 отличается от исходного штамма временем генерации (30 мин), а также зависящих от температуры ауксотрофностью и способностью поддерживать развитие амбер-мутантов фага Т4В. Анализ риф-р трансдуктантов, образовавшихся в результате данного скрещивания, показал, что они приобрели вместе с риф-р аллелем все свойства мутанта гроВ409. Такой результат является доказательством того, что характерные свойства этого мутанта обусловлены риф-р мутацией.

гроВ423 × *WU36—10—11—12*. Реципиентный штамм *WU36—10—11—12*, в отличие от вышеописанных скрещиваний, в данном случае не приобрел вместе с риф-р аллелем характерные свойства донора. По-видимому, фенотип мутанта гроВ423 и соответствующая потребность в лейцине и тирозине обусловлены не риф-р мутацией, а какой-то другой.

Таким образом, анализ риф-р рекомбинантов, полученных в результате переноса риф-р аллелей мутантов в исходный штамм, показал, что характерные свойства мутантов гроВ401, гроВ402, гроВ403 и гроВ409 обусловлены соответствующими мутациями рифампицину-стойчивости, поскольку при переносе риф-р аллелей этих мутантов в исходный штамм последний одновременно приобретает фенотипические свойства мутанта.

Зависимость плейотропного эффекта риф-р мутаций от генотипа организма. Было исследовано влияние риф-р мутаций на фенотип двух отличных по генотипу штаммов *E. coli* K12—*AUiga*⁺ и *CH327*. Скрещивания проводились с помощью фага P1. Риф-р рекомбинанты отбирались среди *arg*⁺ (в случае *AUiga*⁺) и *thi*⁺ (в случае *CH327*) трансдуктантов. При анализе их контролем служили *AUiga*⁺ *arg*⁺ *CH327 thi*⁺ рекомбинанты, не получившие риф-р аллель.

В табл. 2 приведены данные о влиянии риф-р мутаций на способность котрансдуктантов расти на полноценной и минимальной средах при различных температурах.

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что мутации гроВ401, гроВ402 и гроВ409 подавляют рост рекомбинантов штамма *AUiga*⁺ при 42° на минимальной среде. Соответствующие рекомбинанты штамма *CH327* (*CH/401*, *CH/402*, *CH/403* и *CH/409*) при тех же условиях частично утрачивают способность к росту.

Данные о способности рекомбинантов поддерживать рост амберных мутантов фага Т4В представлены в табл. 3.

По данным табл. 3, мутации гроВ401 и гроВ409 одинаково влияют на способность обоих штаммов поддерживать развитие амбер-мутантов фага Т4В. Влияние мутации гроВ403 на то же свойство штам-

Таблица 2

Рост риф-р рекомбинантов штаммов АУига⁺ и СН327 на полноценной (ПС) и минимальной (МС) средах при 37° и 42°

Штамм	ПС		МС	
	37°	42°	37°	42°
АУига ⁺	3	3	3	3
АУ/401*	3	3	3	0
АУ/402	3	3	3	0
АУ/403	3	3	3	0
АУ/409	3	3	3	0
АУ/423	3	3	3	3
СН327	3	3	3	3
СН/401	3	1	3	1
СН/402	3	2	3	2
СН/403	3	3	3	3
СН/409	3	3	3	2
СН/423	3	3	3	3

Оценка роста: 3—нормальный рост, 2—ослабленный, 1—очень слабый, 0—отсутствие. *—в знаменателе приведены номера мутантов, из которых переносился риф-р аллель.

мов зависит от генотипа: АУ/403 при 42° значительно хуже поддерживает развитие фагов, чем при 37°, однако в штамме СН327 эта же мутация не влияет на способность культуры обеспечивать рост мутантов фага Т4В.

Мутация groB402 в разных штаммах *E. coli* K12 примерно одинаково влияет (подавляет) на выход фага Т4В. У АУ/402 выход фага составляет 8 бляшкообразующих частиц, а у СН/402—6, т. е. примерно в 30 и 40 раз меньше, чем у исходных штаммов АУига⁺ и СН327 соответственно.

Влияние риф-р мутаций на морфологию колоний также зависит от генотипа. Так, если в штамме СН327 мутация groB403 не влияет на размер колоний, в случае штамма АУига⁺ она приводит примерно к двукратному уменьшению их.

У рифампицинчувствительных рекомбинантов, полученных в результате скрещивания независимых риф-р штаммов, исследовались следующие признаки: зависимость роста от температуры, способность поддерживать развитие фага Т4В и его амбер-мутантов (при 37 и 42°), а также морфология бактериальных колоний. При анализе не были обнаружены какие-либо различия между рифампицинчувствительными рекомбинантами и контрольным штаммом СН327. Таким образом, изменение ряда признаков у риф-р рекомбинантов СН/401, СН/402 и СН/409 обусловлено плейотропным эффектом РНК-полимеразных мутаций.

При включении риф-р аллелей в геном родительского штамма последний приобретает также характерные признаки мутанта. А при

Таблица 3

Развитие амбер-мутантов фага T4B на риф-р рекомбинантах штаммов ANuga⁺ и CH327

Штамм	Ф а г											
	H-78		H ₂ -16		H ₂ -36		H ₃ -44		H ₃ -54		T4B	
	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°	37°	42°
AY uga ⁺	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
AY/401	+	—	++	+	++	+	+	—	++	+	+++	+++
AY/403	+++	+	+++	+	+++	++	+++	—	+++	+	+++	+++
AY/409	+++	—	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++
AY/423	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CH327	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CH/401	++	—	+	—	+++	++	—	—	++	+	+++	+++
CH/403	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CH/409	+++	—	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+	+++	+++
CH/423	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Зоны лизиса: +++—прозрачная, ++—мутная, +—очень мутная, —отсутствует.

замещении риф-р аллелей диким аллелем рифампицинчувствительности, клетки одновременно утрачивают характерные свойства соответствующего мутанта. Указанное свидетельствует о том, что наблюдаемые нарушения свойств риф-р мутантов обусловлены изменениями РНК-полимеразы.

Очевидно, что разные риф-р мутации специфически влияют на определенные свойства клетки. Так, мутация гроВ401, нарушающая супрессию нонсенс мутаций, способность сбраживать лактозу и другие свойства клетки, не влияет на развитие дикого фага Т4В. В то же время мутация гроВ402, нарушающая рост дикого фага Т4В, не влияет на прототрофность клетки или ее способность сбраживать лактозу. Одной из особенностей мутанта гроВ403, в отличие от гроВ401 и гроВ409, является то, что он нормально поддерживает развитие нонсенс мутантов фага Т4В, более того на нем развиваются еще 2 фага с амбер-мутацией (Н-78 и Н₂-36), этого не наблюдается в случае родительского штамма.

Обнаружено, что специфическое влияние риф-р мутаций на какое-либо свойство клетки зависит от генотипа организма. Например, риф-р рекомбинанты АУ/403 и СН/403 по-разному поддерживают развитие амбер-мутантов фага Т4В при 42°.

Биохимическое изучение мутантов [2] показало, что некоторые их свойства (термочувствительность гроВ403, нарушенная способность гроВ402 поддерживать развитие фага Т4В и др.) не могут быть объяснены прямым выражением структурных изменений в РНК-полимеразе, а, возможно, связаны с нарушениями работы мутантной РНК-полимеразы.

Филиал ВНИИ генетики,
г. Чаренцаван

Поступило 10.III 1978 г.

ԳԵՆՈՏԵՊԻԿ ՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՌԻԲ-ՊՈԼԻՄԵՐԱԶԱՅԻՆ ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐԻ ՊԼԵՅՈՏՐՈՊ ԷՖԵԿՏԻ ՎՐԱ

Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Ա. Վ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

ՌԻԲ-պոլիմերազային մոլտացիաների պլեյոտրոպ արտահայտումը ապացուցելու համար տարբեր մոլտանտների ըիֆ-ր ալելները փոխադրվել են ծնողական կոլտուրայի մեջ տրանսդուկցիայի օգնությամբ: Ռեկոմբինանտների մեծամասնությունը կրկնել է ՌԻԲ-պոլիմերազային մոլտանտի հատկությունները: Այդ նույն ալելների փոխադրումը գենետիկորեն տարբերվող երկու այլ շտամների մեջ ցույց տվեց, որ կախված գենետիկական միջավայրից, ՌԻԲ-պոլիմերազային մոլտացիաների պլեյոտրոպ արտահայտությունը հանդես է գալիս տարբեր ձևով:

THE INFLUENCE OF GENETIC CONSTITUTION ON PLEYOTROPIC EFFECT OF RNA-POLYMERASE MUTATIONS

M. G. OGANESSIAN, A. V. ARUTYUNIAN

To prove the pleiotropic effect of RNA-polymerase mutations rifampicyne-resistant alleles from different mutants have been transduced to the initial culture. The majority of the recombinants demonstrated the properties of PNA-polymerase mutants. The transformation of the same alleles into the two other genetically different strains shows that pleiotropic effect of PNA-polymerase mutations appears in different ways depending on the genetic environment.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Оганесян М. Г. В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии и иммунологии. 30, Ереван, 1970.
2. Оганесян М. Г., Арутюнян А. В., Озолинь О. Н., Камзолова С. Г. ДАН СССР, 233, 487, 1977.
3. Оганесян М. Г., Барегимян И. Н., Биологический журнал Армении, 27, 7, 16, 1974.
4. Лдамс М. Бактериофаги, 394, М., 1961.
5. Оганесян М. Г., Чахалян А. Х. Биологический журнал Армении, 27, 8, 16, 1974.
6. Holliday R. Nature, 178, 1987, 1956.