

МУТАЦИИ УСТОЙЧИВОСТИ К 2,6-ДИАМИНОПУРИНУ У *ESCHERICHIA COLI* K-12, ЗАТРАГИВАЮЩИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗУ

Ш. М. КОЧАРЯН

Показано, что некоторые из мутаций устойчивости к 2,6-диаминопурину у *Escherichia coli* K-12 затрагивают структурный ген *groV*, ответственный за синтез β -субъединицы РНК-полимеразы. Такие мутации характеризуются плеiotропным проявлением, активируют усвоение 6-метиламинопурина, инозина и гуанозина в качестве единственных источников пуринов. РНК-полимераза одного из мутантов в опытах *in vivo* и *in vitro* сохранила чувствительность к антибиотику рифампицину.

Канцеростатическое действие аналога аденина—2,6-диаминопурина (ДАП) основано на его способности ингибировать после превращения в нуклеотид рост клеток [1]. Изученные к настоящему времени мутации устойчивости к ДАП у клеток высших организмов [2, 3] и бактерий [4, 5] затрагивают аденинфосфорибозилтрансферазу (КФ 2.4.2.7)—фермент, катализирующий реакцию превращения аденина, а также его аналогов в соответствующие нуклеозидмонофосфаты.

Конкретный механизм ингибирующего действия ДАП, а также метаболическое производное аналога, являющееся непосредственным ингибитором, пока не выявлены. В этой связи представляет интерес получение мутантов бактерий, устойчивых к ДАП, но сохраняющих способность к превращению аналога в его нуклеотиды. В настоящей работе нами показано, что некоторые из мутаций устойчивости к ДАП у *Escherichia coli* K-12 затрагивают ген *groV**, ответственный за синтез β -субъединицы РНК-полимеразы (КФ 2.7.7.6) [7].

Материал и методика. Условия культивирования бактерий, среды и концентрации необходимых добавок, методики конъюгационных и трансдукционных (фаг Р1) скрещиваний, а также селективный метод отбора мутантов, устойчивых к ДАП, описаны нами ранее [8]. Активность РНК-полимеразы определяли в бесклеточных экстрактах бактерий, освобожденных от хромосомальной ДНК с помощью стрептомицинсульфата, по включению ^{14}C -УТФ в кислотонерастворимую фракцию [9]: реакционная смесь имела конечный объем 0,5 мл и содержала (в микромолях): MgCl_2 —7,0; MnCl_2 —1,9; KCl —57,5; трис pH 8,0—25,0; АТФ, ГТФ, ЦТФ и ^{14}C -УТФ—по 0,4; 30 мкг ДНК фага T2 и 0,1 мл экстракта бактерий. Содержание белка определяли по Лоури с соавт. [13].

Результаты и обсуждение. Отобранные в настоящей работе мутанты, устойчивые к ДАП, в отличие от описанных нами ранее мутан-

* Обозначения генетических маркеров соответствуют номенклатуре [6].

тов арт, у которых нарушена активность аденинфосфорибозилтрансферазы [5, 8], появлялись в расसेве штамма HfrH purD pur на селективных чашках с аналогом спустя 72 час. с начала инкубации. Эти мутанты, обозначенные SK 431, SK 432, SK 433 и SK 434, образовывали мелкие колонии на агаризованных средах, а в полноценном бульоне время генерации у них было в среднем в 3 раза больше, чем у родительского штамма. Соответствующие мутации предварительно обозначили как min.

Мутанты min сохранили способность к усвоению аденина в качестве источника пуринов и не приобрели устойчивости к еще одному аналогу аденина—6-метилпурину. Они более эффективно, чем родительский штамм, усваивали 6-метиламинопурин, инозин и гуанозин в качестве единственных источников пуринов. В конъюгационных скрещиваниях было обнаружено, что мутации min в отличие от мутации арт наследуются с большой частотой только с маркерами, расположенными в дистальном районе хромосомы HfrH.

В связи с тем, что некоторые мутации по РНК-полимеразе активируют у бактерий генотипа pur pur усвоение инозина и гуанозина [10], возникло предположение о том, что мутации min также могут затрагивать РНК-полимеразу. Известно [11, 12], что все изученные мутации устойчивости к антибиотику рифампицину у бактерий затрагивают ген groV, ответственный за синтез β -субъединицы РНК-полимеразы. Опыты показали, что мутанты min, за исключением одного—SK 432, устойчивы к рифампицину.

Активность РНК-полимеразы в экстрактах мутантов min была в 6—30 раз ниже, чем в экстрактах родительского штамма, кроме того, в случае с мутантами SK 431, SK 433 и SK 434 она значительно более устойчива к присутствию в реакционной смеси рифампицина (табл. 1).

Т а б л и ц а 1
Активность РНК-полимеразы в экстрактах штамма
HfrH purD pur и его производных мутантов min

Экстракты штамма	Включение ^{14}C —УТФ, имп./100сек/мг белка		
	р и ф а м п и ц и н		
	—	0,25 мкг/мл	0,50 мкг/мл
HfrH purD pur	1025793	83084 (92%)	89637 (91%)
SK 431	71315	56670 (21%)	49735 (30%)
SK 432	177110	30255 (83%)	29730 (83%)
SK 433	102092	61435 (40%)	45217 (55%)
SK 434	34550	31505 (9%)	24779 (28%)

* В скобках дан % ингибирования активности рифампицином.

Из рассева мутантов min отбирались колонии ревертантов, которые опережали по росту бактериальный газон. Такие ревертанты теряли устойчивость к ДАП и рифампицину, а также способность к эф-

фективному усвоению 6-метиламинопурина, инозина и гуанозина в качестве источников пуринов. Следовательно, мутации *min*, несмотря на плейотропность проявления, являются единичными мутациями.

В трансдукционных скрещиваниях мутантов SK 432 и SK 434 с реципиентом GHAT (*argH*, *purD*⁺) определялась частота наследования неселектируемых маркеров *min* и *purD* трансдуктантами *ArgH*⁺. Наследование мутаций *min* выявлялось по мелкому размеру колоний, а также—в случае использования в качестве донора SK 434—по устойчивости к рифампицину. В обоих скрещиваниях (табл. 2) рекомбинантный класс *min*[−] *purD*⁺ численно превосходит класс *min*⁺ *purD*[−], т. е. последний, по-видимому, является четырехкроссовым. Следовательно, порядок генов на хромосоме следующий: *argH* — *min* — *purD*.

Таким образом, мутации *min* картируются в районе локализации РНК-полимеразного оперона *groV*—*groC* [6, 14], что вместе с данными фенотипического и биохимического (табл. 1) анализа мутантов свидетельствует о том, что мутации *min* затрагивают ген *groV*, ответственный за синтез β -субъединицы РНК-полимеразы.

Таблица 2

Генетическая структура рекомбинантов *ArgH*⁺ по неселектируемым маркерам *min* и *purD* в трансдукционных скрещиваниях со штаммом-реципиентом GHAT (*argH*, *min*⁺, *purD*⁺)

Донор, (<i>argH</i> ⁺ , <i>min</i> , <i>purD</i>)	Проверено всего	Число рекомбинантов по классам			
		<i>min</i> ⁺ <i>purD</i> ⁺	<i>min</i> [−] <i>purD</i> [−]	<i>min</i> [−] <i>purD</i> ⁺	<i>min</i> ⁺ <i>purD</i> [−]
SK 432	144	72	53	17	2
SK 434	144	74	51	18	1

В отдельном опыте было показано, что 16 из 33-х мутантов *groV* штамма *HisH purD pur*, полученных прямой селекцией на устойчивость к рифампицину, являются устойчивыми к ДАП. Однако следует отметить, что устойчивость к ДАП у них не всегда коррелировала с мелким размером колоний и способностью к эффективному усвоению инозина и гуанозина.

Имеются работы, в которых показано, что какой-то, пока неидентифицированный, нуклеотид (нуклеотиды) аденина регулирует транскрипцию генов, ответственных за синтез *de novo* [15], взаимопревращения [16, 17] и усвоение [18] пуриновых соединений. Возможно, ингибирующий эффект нуклеотида ДАП обусловлен его способностью замещать нуклеотид аденина, выполняющий регуляторную функцию на уровне транскрипции. Для подтверждения такого предположения необходимы дальнейшие эксперименты. С другой стороны, использование ДАП для отбора мутантов по РНК-полимеразе могло бы расширить спектр мутационных повреждений структуры этого фермента. В этой связи обнадеживает тот факт, что один из обнаруженных с по-

мощью ДАП мутантов по РНК-полимеразе, SK 432, сохранил чувствительность к рифампицину.

Автор выражает глубокую признательность В. В. Суходольцу (ВНИИгенетика, Москва) за обсуждение результатов, А. В. Арутюняну и С. Г. Камзоловой (Институт биофизики, Пущино-на-Оке) за консультации и помощь в экспериментах по определению активности РНК-полимеразы.

Институт экспериментальной биологии
АН АССР

Поступило 19.VI 1978 :

ESCHERICHIA COLI K-12 ՇՏԱՄԻ ՄՈՏ ՍՏԱՑՎԱԾ
2,6-ԴԻԱՄԻՆՈՊՈՒՐԻՆԻ ՀԱՆԴԵՊ ԴԻՄԱՑԿՈՒՆՈՒԹՅԱՆ
ՄՈՒՏԱՑԻԱՆԵՐԸ, ՈՐՈՆՔ ՎՆԱՍՈՒՄ ԵՆ ԲՆԹ-ՊՈԼԻՄԵՐԱԶԱՅԻ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆԸ

Շ. Մ. ԳՈՉԱՐՅԱՆ

Ստացված են 2,6-դիամինոպուրինի հանդեպ դիմացկունության մոտացիաներ *E. coli* K-12 շտամի մոտ, որոնք չեն վնասում ադենինֆոսֆորիբոզիլ-տրանսֆերազայի apt գենը, Հայտնաբերվել է, որ մոտանյութերի ԲՆԹ-կախյալ ԲՆԹ-պոլիմերազայի ակտիվությունը *in vitro* փորձերում նորմալից ցածր է և դիմացկուն է ԲՆԹ-պոլիմերազային ռեակցիայի ինհիբիտոր րիֆամպիցինի ազդեցության հանդեպ: Տրանսդուկցիոն խաչասերումներում (P1 ֆագ) ցույց է տրվել, որ այդ մոտացիաները տեղադրվում են *E. coli* K-12 գենետիկական քարտեզի վրա *argH* և *purD* գենների միջև: Այսպիսով, ստացված մոտացիաները վնասում են ԲՆԹ-կախյալ ԲՆԹ-պոլիմերազայի մասնիկի *rpoB* գենը:

MUTATIONS OF RESISTANCE TO 2,6-DIAMINOPURINE
IN ESCHERICHIA COLI K-12 AFFECTING RNA-POLYMERASE

Sh. M. KOCHARIAN

It has been shown that some mutations of resistance to 2,6-diaminopurine in *E. coli* affect the β -subunit of RNA-polymerase (*rpoB* gene). About 50% of RNA-polymerase mutants selected by using rifampicin has been characterized as cross-resistant ones to 2,6-diaminopurine.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Brockman R. W. Adv. Cancer Res., 7, 129, 1963.
2. Lieberman I., Ove P. J. Biol. Chem., 235, 1765, 1960.
3. Blair D. G. R., Hall A. D. Can. J. Biochem., 43, 1857, 1965.
4. Kalle G. P., Gots J. S. Biochem. Biophys. Acta. 51, 130, 1961.
5. Կոչարյան Շ. Մ. Կուկանովա Կ. Մ., Սуходольց Բ. Վ. Генетика, 13, 10, 1821, 1977.
6. Bachmann B. J., Low K. B., Taylor A. L. Bacteriol Rev., 40, 116, 1976.
7. Никифоров В. Г., Зограф Ю. Н. Молекулярная биология, 13 (Итоги науки и техники, ВИНТИ АН СССР), М., 1977.

8. Кочарян Ш. М., Лившиц В. А., Суходолец В. В. Генетика, 11, 11, 79, 1975.
9. Chamberlin M. J., Berg P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 81, 1962.
10. Лившиц В. А., Суходолец В. В. Генетика, 9, 12, 102, 1973.
11. Mindlin S. Z., Ilyina T. S., Voejkova T. A., Velkov V. V. Mol. Gen. Genet., 115, 115, 1972.
12. Iwakura J., Ishihama A., Yura T. Mol. Gen. Genet., 121, 181, 1973.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall B. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
14. Errington L., Glass R. E., Hayward R. S., Scalfe J. G. Nature, 249, 519, 1974.
15. Benson C. E., Gots J. S. Mol. Gen. Genet., 145, 31, 1976.
16. Nijkamp H. J. J. Bacteriol., 100, 585, 1969.
17. Wilkins A. S. J. Bacteriol., 110, 616, 1972.
18. Кочарян Ш. М. Генетика, 12, 10, 108, 1976.