

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Иванюв Г. М., Марченкова Т. В., Лихотникова Н. Н. Изв. Сибирск. отделения АН СССР, серия биол. наук, вып. 3, 15, 126—128, 1973.
2. Карабеков Б. П., Чахмичян А. Г., Оганесян М. Г. Генетика, 18, 1062—1067, 1982.
3. Кудлай Д. Г., Лиходей В. Г. Бактериоогенез. Л., 1966.
4. Лиходей В. Г. Антибиотики, 9, 771—780, 1963.
5. Рабченко Н. Ф., Алиханян С. Н. Генетика, 20, 1067—1071, 1981.
6. Du Barjac H. et Lajudie J. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 125, 521—537, 1974.
7. Goze A. C. R. Soc. Biol., 166, 200—204, 1972.
8. Frerdeteg P. Rev. Belge Path. Med. Exp., 19, 4—8, 1948.
9. Krieg A. J. Invert. Pathol., 11, 29, 1970.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 575.24 576.851.48

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА УРИДИНФОСФОРИЛАЗЫ У *ESCHERICHIA COLI*

А. С. МИРОНОВ

Изучена экспрессия гена *udr* в геноме бактерий *rho15* на фоне различных мутаций, затрагивающих структурный ген *metE*. Показано, что в отличие от точечной мутации *metE* инсерция *metE::Tn5* супрессирует эффект мутации *rho15* на экспрессию гена *udr*, восстанавливая его чувствительность к действию специфических эффекторов—белка-репрессора *cytR* и комплекса цАМФ—CRP. На основании полученных данных делается заключение о том, что в геноме бактерий *rho15* экспрессия гена *udr* осуществляется под контролем промотора *metE*.

Ключевые слова: ген уридинфосфорилазы; регуляция экспрессии гена.

Структурный ген *udr*, контролирующий синтез фермента уридинфосфорилазы (УДФ), расположен в районе 85 мин хромосомной карты *Escherichia coli*. Промоторная область гена *udr* локализуется в участке, примыкающем к гену *metE*, т. е. транскрипция гена *udr* осуществляется по часовой стрелке карты *E. coli* [1, 4]. Экспрессия гена *udr* находится под негативным контролем регуляторного локуса *cytR*, кодирующего синтез белка-репрессора [13].

Низкомолекулярными эффекторами белка *cytR* служат цитидин (CR) и аденозин [8, 13]. Выражение гена *udr* подвержено строгой каталитической репрессии, о чем свидетельствует практически полное подавление активности его промотора на фоне мутаций по аденилатциклазе (*cytA*) или белку-рецептору циклического АМФ (*crp*) [5, 9, 12].

Важную роль в регуляции экспрессии гена *udr* играет фактор терминации транскрипции *rho*. Показано, что присутствие в геноме бактерий мутации *rho15 ts* обуславливает полуконститутивный синтез УДФ, причем усиление экспрессии гена *udr* сопровождается нарушением регуляции с участием белка *cytR* и комплекса цАМФ—CRP. На основании этих данных было сделано заключение о том, что в геноме *rho15* экс-

прессия гена *uidr* осуществляется за счет сквозной транскрипции с внешнего, более сильного промотора [2, 6].

Кроме того показано, что активность УДФ, находящейся под контролем внешнего промотора, снижается в 2—3 раза при выращивании бактерий на минимальной среде в присутствии L-метионина [6]. Эти данные позволяют предположить, что усиление экспрессии гена *uidr* в геноме *rho15* обусловлено сквозной транскрипцией этого гена, инициируемой с промотора соседнего гена *metE*.

Для проверки этого предположения мы изучили влияние мутаций, затрагивающих структурный ген *metE*, включая мутации, обусловленные интеграцией в этот ген транспозонов Tn5 и Tn10, на экспрессию гена *uidr* в геноме бактерий *rho15*. Результаты, представленные в настоящей статье, показывают, что в отличие от точковой мутации *metE* инсерции *metE*:Tn5 или *metE*:Tn10 супрессируют действие мутации *rho15* на экспрессию гена *uidr*, восстанавливая чувствительность его промотора к специфическим эффекторам—белку *cutR* и комплексу цАМФ—CRP.

Материал и методика. Бактериальные штаммы, использованные в работе, и их генетическая характеристика представлены в табл. 1. Состав используемых в работе сред и концентрации необходимых добавок описаны в работе [6]. Трансдукционные скрещивания проводили с помощью фага P1 по Миллеру [3]. Для определения активности УДФ бактерии выращивали в жидкой минимальной среде Адамса с необходимыми добавками и глюкозой в качестве источника углерода при 33°. В логарифмической фазе роста клетки осаждали центрифугированием и разрушали ультразвуком для получения бесклеточных экстрактов. Индукторы—витамин (2 мМ) и цАМФ (3 мМ)—добавляли за 2 ч до прекращения роста бактерий. Активность УДФ определяли спектрофотометрически по изменению поглощения при 290 нм при распаде уридина до свободного урацила [14]. Активность УДФ выражена в ед/мг белка. За единицу активности принимали количество превращенного субстрата в мкМ за 1 мин при 37°; в таблицах представлены средние значения двух-трех определений. Белок определяли по Лоурн с соевт. [11].

Результаты и обсуждение. Интеграция транспозонов в бактериальные опероны вызывает строгий поляриный эффект на экспрессию генов, расположенных дистальнее от сайта интеграции, из-за присутствия в транспозонных структурах терминирующих транскрипцию сигналов [10]. Поэтому мы предположили, что если экспрессия гена *uidr* в геноме *rho15* действительно обусловлена сквозной транскрипцией с промотора гена *metE*, то интеграция транспозона в последовательность последнего гена должна прервать транскрипцию, восстанавливая чувствительность промотора *uidr* к действию белка *cutR* и комплекса цАМФ—CRP. В то же время присутствие в структурном гене *metE* обычной точковой мутации, вероятно, не должно существенно сказываться на характере экспрессии гена *uidr* в геноме *rho15* штамма.

Для изучения влияния мутаций по структурному гену *metE* на экспрессию гена *uidr* в геноме *rho15* мы сконструировали на основе штамма АМО56 с помощью трансдукции фагом P1 серию изогенных штаммов, содержащих различные комбинации мутаций по генам *rho*, *cutR*, *cutA*, *metE* (табл. 1).

Штаммы *E. coli* K-12, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
S30	<i>araD</i> (<i>ara</i> _{ΔBOIC} — <i>leu</i>) ^{Δ7679} <i>lac</i> ^{ΔX74} <i>galU galK ilv</i> : Tn10	С. Браун (США)
SBK040	<i>thy metE</i> : Tn5	К. Берг (США)
RK4349	<i>ilv metB proV entA his lac rpsL metE</i> : Tn10 <i>metE</i> : Tn10	Р. Каднер (США)
AM056	<i>thi upp</i>	[6]
AM058	<i>thi upp</i> Δ <i>cya Val-r</i>	[6]
AM059	<i>thi upp</i> Δ <i>cya rho15 Val-r</i>	[6]
AM357	<i>thi upp rho15 Val-r</i>	[6]
AM440	<i>thi upp metE</i>	[1]
AM441	<i>thi upp metE rho15 Val-r</i>	AM357 × AM440
AM1000	<i>thi upp cytR</i>	[6]
AM1001	<i>thi upp cytR rho15 Val-r</i>	AM357 × AM1000
AM1002	<i>thi upp cytR</i> Δ <i>cya Val-r</i>	AM058 × AM1000
AM1003	<i>thi upp cytR</i> Δ <i>cya rho15 Val-r</i>	AM059 × AM1000
AM1004	<i>thi upp metE</i> Δ <i>cya Val-r</i>	AM058 × AM440
AM1005	<i>thi upp metE</i> Δ <i>cya rho15 Val-r</i>	AM059 × AM440
AM1006	<i>thi upp metE</i> : Tn5	SBK040 × AM056
AM1007	<i>thi upp metE</i> : Tn5 <i>rho15 Val-r</i>	AM357 × AM1003
AM1008	<i>thi upp metE</i> : Tn5Δ <i>cya Val-r</i>	SBK040 × AM058
AM1009	<i>thi upp metE</i> : Tn5Δ <i>cya rho15 Val-r</i>	SBK040 × AM059
AM1010	<i>thi upp cytR metE</i> : Tn5	SBK040 × AM1000
AM1011	<i>thi upp cytR metE</i> : Tn5 <i>rho15 Val-r</i>	AM357 × AM1000
AM1012	<i>thi upp cytR metE</i> : Tn5Δ <i>cya Val-r</i>	SBK040 × AM1002
AM1013	<i>thi upp cytR metE</i> : Tn5Δ <i>cya rho15 Val-r</i>	SBK040 × AM1003

В табл. 2 приведены результаты определения активности УДФ в бесклеточных экстрактах этих штаммов при выращивании бактерий как в обычных условиях, так и в присутствии индукторов—CR и цАМФ. Из этих данных прежде всего следует, что в геноме бактерий *met*⁺ мутация *rho15* обуславливает полуконститутивный синтез УДФ независимо от аллельного состояния генов *cya* и *cytR*. Действительно, штаммы, содержащие мутацию *rho15*: AM357 *cytR*⁺ *cya*⁺, AM059 *cytR*⁺ *cya*, AM1001 *cytR* *cya*⁺ и AM1003 *cytR* *cya*, обнаруживают очень близкие значения активности УДФ (от 814 до 1211 ед/мг), в то время как у контрольных штаммов *rho*⁺ мутация *cytR* вызывает 15-кратную депрессию синтеза УДФ (штамм AM1000), а мутация *cya*, напротив, подавляет экспрессию гена *uidp* в штамме AM1002. В соответствии с этим добавление индукторов—CR и цАМФ практически не влияет на актив-

Таблица 2

Активность УДФ у штаммов *rho15* и *rho+*, несущих регуляторные мутации *суа* и *суtR*, а также мутации *metE* (точковая) и *metE*:Tn5

Сравниваемые штаммы	Генотип по локусам <i>суа</i> , <i>суtR</i> , <i>metE</i>	Индуктор	Активность УДФ, ед/мг, в геноме	
			<i>rho15</i>	<i>rho+</i>
AM357	дикий тип	—	1112	116
и AM056		CR+цАМФ	1236	1268
AM059	Δ суа	—	1104	139
и AM058		CR+цАМФ	958	762
AM1001	<i>суtR</i>	—	1211	1556
и AM1000		цАМФ	1363	1610
AM1003	<i>суtR</i> Δ суа	—	314	121
и AM1002		цАМФ	1087	862
AM441	<i>metE</i>	—	574	132
и AM440		CR+цАМФ	617	896
AM1005	<i>metE</i> Δ суа	—	538	128
и AM1004		CR+цАМФ	614	1078
AM1007	<i>metE</i> :Tn5	—	190	134
и AM1006		CR+цАМФ	489	968
AM1009	<i>metE</i> :Tn5 Δ суа	—	140	154
и AM1008		CR+цАМФ	469	965
AM1011	<i>metE</i> :Tn5 <i>суtR</i>	—	603	830
и AM1010		цАМФ	862	1372
AM1013	<i>metE</i> :Tn5 <i>суtR</i> Δ суа	—	147	115
и AM1012		цАМФ	591	1214

ность УДФ у всех четырех исследуемых штаммов *rho* (табл. 2). Таким образом, в геноме бактерий *metE*⁻ мутация *rho15* практически полностью подавляет чувствительность промотора гена *идр* к действию белка *суtR* и комплекса цАМФ—CRP.

Характер экспрессии гена *идр* в геноме *rho15* существенно не меняется при внесении точковой мутации *metE* (табл. 2). Несмотря на то, что на фоне точковой мутации *metE* активность УДФ у штамма AM441 *rho15* снижена примерно в 2 раза по сравнению с соответствующим штаммом *metE*⁺ (AM357), экспрессия гена *идр* в геноме *metE*⁻ *rho15*, очевидно, осуществляется не с собственного промотора. Об этом свидетельствует, во-первых, сохранение довольно высокого базального уровня активности УДФ у штамма AM441 *rho15* (574 ед/мг) по сравнению с контрольным штаммом AM440 *rho+* (132 ед/мг) и, во-вторых, отсутствие снижения активности фермента у штамма AM1005 (538 ед/мг) при внесении мутации *суа*. Кроме того, у штаммов AM441 и AM1005, как и у соответствующих штаммов *metE*⁺ AM357 и AM059, не наблюдается существенного увеличения активности УДФ при выращивании бактерий в присутствии индукторов CR и цАМФ. В этих же условиях у контрольных штаммов *rho+* (AM440 и AM1004) обнаруживается 7—10-

кратная индукция синтеза УДФ (табл. 2). Таким образом, присутствие точковой мутации *metE* в геноме бактерий *gho15* не восстанавливает чувствительность промотора *hdr* к действию белка *cytR* и комплекса цАМФ—CRP.

В отличие от точковой мутации *metE*, инсерция *metE::Tn5* (а также инсерция *metE::Tn10*—данные не представлены) практически полностью супрессирует действие мутации *gho15* на экспрессию гена *hdr*. Так, у штаммов AM1007, AM1009 и AM1013, содержащих мутацию *gho15*, на фоне инсерции *metE::Tn5* активность УДФ снижается почти до базального уровня, характерного для соответствующих штаммов *gho+* AM1006, AM1008 и AM1012 (табл. 2). Важно подчеркнуть, что присутствие в геноме *gho15* инсерции *metE::Tn5*, кроме того, восстанавливает чувствительность промотора *hdr* к действию CR и цАМФ. Как следует из данных табл. 2, у штаммов AM1007, AM1009 и AM1013 наблюдается достаточно четко выраженная индукция синтеза УДФ при добавлении CR и цАМФ, хотя она у этих штаммов примерно в два раза ниже, чем у соответствующих контрольных штаммов *metE::Tn5 gho+*. В связи с этим следует отметить, что уровень dereпрессии УДФ у штамма AM1011 *metE::Tn5 cytR gho15* также несколько снижен по сравнению с таковым у контрольного штамма AM1010 *cytR gho+*. Полученные данные указывают на то, что интеграция транспозона Tn5 в ген *metE* прерывает сквозную транскрипцию гена *hdr* с промотора *metE* в геноме *gho15*, восстанавливая чувствительность промотора *hdr* к действию белка *cytR* и комплекса цАМФ—CRP. Частичное подавление функций промотора *hdr* в отношении способности к *cytR*-dereпрессии может быть объяснено активностью промоторов интегрированного транспозона Tn5, которые могут инициировать в геноме *gho* сквозную транскрипцию примыкающих бактериальных генов, подавляя активность их собственных промоторов [7].

Итак, полученные данные в целом позволяют заключить, что экспрессия гена *hdr* в геноме бактерий *gho15* осуществляется за счет сквозной транскрипции, инициируемой на промоторе соседнего гена *metE*. В соответствии с этим заключением отмеченное выше снижение экспрессии гена *hdr* на фоне точковой мутации *metE*, очевидно, связано с подавлением активности промотора *metE* экзогенным L-метионином (при наличии которого в случае метионофильных ауксотрофов необходимо для поддержания роста бактерий). Примерно такое же снижение активности УДФ под влиянием L-метионина наблюдалось и у прототрофных по метионину бактерий, содержащих мутацию *gho15* [6].

Автор выражает благодарность профессору В. В. Суходольцу за полезные дискуссии по ходу выполнения данной работы, а также Г. И. Сергеевой за квалифицированную техническую помощь.

ВНИИгенетика, Москва

Поступило 5.IX 1985 г.

ՈՒՐԻԳԻՆՑՈՍՖՈՐԻԼԱԶԱՅԻ ԳԵՆԻ ԷՔՍՊՐԵՍԻԱՅԻ ԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒՄԸ
ESCHERICHIA COLI-Ի ՄՈՏ

Ա. Ս. ՄԻՐՈՆՈՎ

Rho տրանսկրիպցիայի տերմինացիայի ֆակտորով թերի բակտերիաների գենոմում ճնշվում է ուրիդինֆոսֆորիլազային գենի (udp) պրոմոտորի ակտիվությունը և udp գենի էքսպրեսիան իրադրծվում է միջանցիկ տրանսկրիպցիայի ճաշվին, որը հավանաբար նախաձևնոնվում է metE հարեան գենի պրոմոտորից: Ուսումնասիրված է udp գենի էքսպրեսիան rho 15 մուտանտում՝ metE կաուտցվածքային գենը շոշափող տարրեր մուտացիաների ֆունկցիա: Ցույց է տրված, որ ի տարրերություն metE կետային մուտացիայի, metE::Tn5 ինսերցիան ճնշում է rho 15 մուտացիայի էֆեկար udp գենի էքսպրեսիայի վրա, վերականգնելով նրա զգալունությունը սպեցիֆիկ էֆեկտորների՝ cytR ռեպրեսորի սպիտակուցի և π -AMΦ-CRP կոմպլեքսի նկատմամբ: Ստացված տվյալների հիման վրա հետևություն է արված, որ rho 15 բակտերիաների գենոմում սմր գենի էքսպրեսիան իրականացվում է metE պրոմոտորի հսկողության տակ:

REGULATION OF THE URIDINE PHOSPHORYLASE GENE
EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*

A. S. MIRONOV

In bacterial cells deficient for the active transcription termination factor Rho the uridine phosphorylase promoter activity is inhibited and the udp gene expression is due to read-through transcription initiated, possibly, from the promoter of the neighbouring metE gene. The udp gene expression in rho15 background is studied in the presence of various metE mutations. It is found that in contrast to the point metE mutations, metE::Tn5 insertion suppresses the effect of rho15 mutation on the udp gene expression, restoring udp promoter response to the action of specific effectors cytR protein and cAMP-CRP complex. Based on these data, it is concluded that in rho15 background the udp gene expression is under the control of metE promoter.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алхимова Р. А., Миронов А. С., Суходолец В. В. Генетика, 17, 1730, 1981.
2. Гольцмайер Т. А., Миронов А. С., Суходолец В. В. Генетика, 16, 597, 1980.
3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1979.
4. Миронов А. С., Смирнов Ю. В., Суходолец В. В. Генетика, 9, 82, 1973.
5. Миронов А. С., Суходолец В. В., Алхимова Р. А. Генетика, 11, 103, 1978.
6. Миронов А. С. Генетика, 18, 939, 1982.
7. Ciampi M. S., Schmid M. B., Roth J. R. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 79, 5016, 1982.
8. Hammer-Jespersen K., Munch-Petersen A. Mol. Gen. Genet., 137, 327, 1975.
9. Hammer-Jespersen K., Nygaard P. Mol. Gen. Genet., 145, 49, 1976.
10. Kleckner N., Barker D. F., Ross D. G., Botstein D. Genetics, 99, 127, 1978.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr S. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.

12. Mironov A. S., Sukhodolets V. V. J. Bacteriol., 137, 802, 1979.
 13. Munch—Petersen A., Nygaard P., Hammer—Jespersen K., Fill N. Europ. J. Biochem., 27, 208, 1972.
 14. Razzel W. F., Khorana G. H. Biochem. and Biophys. Acta, 28, 562, 1958.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 11, 1985

УДК 575.24:576.851.48

ГЕНЕТИКА И БИОХИМИЯ ВТОРОЙ ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* K-12

Ш. М. КОЧАРЯН, Х. О. БЕЗИРДЖЯН, М. А. МЕЛКУМЯН, Н. А. ОГАНЕСЯН,
 А. М. КОЧАРЯН, Ж. И. АКОПЯН

Структурный ген *prnA*, ответственный за синтез второй пуриинуклеозидфосфорил-лазы *E. coli* K-12, расположен на 51 мин генетической карты и тесно сцеплен с геном-регулятором синтеза ПНФазы 2—*prnR*. Порядок генов на хромосоме, установленный с помощью многофакторных трансдукционных скрещиваний: *purC—prgR—prnA—ptsII*. Осуществлено молекулярное клонирование гена *prnA* в составе векторной плазмиды *pBR322*. Мутации *prnA* рецессивны по отношению к дикому аллелю *prnA* на хромосоме F' или в составе плазмиды *pBR322*.

Установлено наличие двух форм фермента, различающихся между собой четвертичной структурой, молекулярной массой нативного фермента и субъединицы, а также субстратной специфичностью. Это, по-видимому, обусловлено посттрансляционной модификацией продукта гена *prnA*, поскольку единичные мутации по гену *prnA* полностью элиминируют активность ПНФазы 2 у бактерий.

Ключевые слова: регуляция генной активности, структура и функция фермента, пуриинуклеозидфосфоорилаза.

Исследование метаболизма тимина у *E. coli* K-12 способствовало обнаружению *deo*-оперона, который состоит из четырех сцепленных генов катаболизма нуклеозидов и расположен на 99 мин генетической карты [1, 8, 9]. В состав *deo*-оперона входит структурный ген *deoD*, который кодирует пуриинуклеозидфосфоорилазу (КФ2.4.2.1; ПНФазу1) и подвержен весьма сложному регуляторному контролю с участием двух белков-репрессоров—продуктов генов-регуляторов *deoR* и *cyiR* [16]. ПНФазу1 катализирует обратимую реакцию фосфоролитического расщепления нуклеозидов аденина, гипоксантина и гуанина и не расщепляет ксантозин [12].

Изучение фенотипических ревертантов, полученных у мутантов *deoD*, показало существование у *E. coli* второй пуриинуклеозидфосфо-риказы (ПНФазы2) [2, 4, 6, 10, 13]. ПНФазу2, в отличие от ПНФазы1, обладает субстратной специфичностью к ксантозину [2, 4, 13]. Синтез ПНФазы2 находится под контролем гена-регулятора *prnR*, продуктом которого является белок-активатор [3, 5, 10]. Индуктором синтеза ПНФазы2 у штаммов дикого типа служит ксантозин, а у некоторых мутантов с измененным продуктом гена-регулятора *prnR* синтез фермен-