

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

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

Структурный ген *pnfA*, ответственный за синтез второй пуриинуклеозидфосфорил-лазы *E. coli* K-12, расположен на 51 мин генетической карты и тесно сцеплен с ге-ном-регулятором синтеза ПНФазы 2—*pnfR*. Порядок генов на хромосоме, установлен-ный с помощью многофакторных трансдукционных скрещиваний: *purC—proR—pnfA—ptsII*. Осуществлено молекулярное клонирование гена *pnfA* в составе вектор-ной плазмиды pBR322. Мутации *pnfA* рецессивны по отношению к дикому аллелю *pnfA* на энзиме F' или в составе плазмиды pBR322.

Установлено наличие двух форм фермента, различающихся между собой четвер-тичной структурой, молекулярной массой нативного фермента и субъединицы, а также субстратной специфичностью. Это, по-видимому, обусловлено посттрансляционной мо-дификацией продукта гена *pnfA*, поскольку единичные мутации по гену *pnfA* пол-ностью 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 ге-нов 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 *cytR* [16]. ПНФаза1 катализирует обратимую реакцию фосфоролитического расщепления нуклеозидов аденина, гипоксантина и гуанина и не рас-щепляет ксантозин [12].

Изучение фенотипических ревертантов, полученных у мутантов *deoD*, показало существование у *E. coli* второй пуриинуклеозидфосфо-риказы (ПНФазы2) [2, 4, 6, 10, 13]. ПНФаза2, в отличие от ПНФазы1, обладает субстратной специфичностью к ксантозину [2, 4, 13]. Синтез ПНФазы2 находится под контролем гена-регулятора *pnfR*, продуктом которого является белок-активатор [3, 5, 10]. Индуктором синтеза ПНФазы2 у штаммов дикого типа служит ксантозин, а у некоторых му-тантов с измененным продуктом гена-регулятора *pnfR* синтез фермен-

та является конститутивным или индуцируемым, наряду с ксантозином, и другими пуриновыми нуклеозидами [5, 6, 10]. Ген *pnfR* локализуется на 51 мин генетической карты [3, 10].

В настоящей работе осуществлено генетическое картирование и молекулярное клонирование структурного гена ПНФазы2—*pnfA*, а также установлено наличие двух форм фермента, различающихся и которыми физико-химическими и каталитическими свойствами.

Материал и методика. Генетическая характеристика и происхождение штаммов *E. coli* K-12, использованных в работе, приведены в табл. 1. Составы сред, используемых для культивирования бактерий, и концентрации необходимых добавок рекомендованы ранее [5, 7].

Комбинационные и трансдукционные (фиг P1) скрещивания, введение в геном бактерий мутантного аллеля *gcsA* с помощью транспозона Tn10 (донор—штамм NK6659) и элиминацию эписомы F' осуществляли по ранее описанным методикам [3, 7].

Выделение, рестрикцию, лигирование и электрофорез ДНК в агарозном геле, а также трансформацию бактерий плазмидной ДНК проводили по Маннатиусу с соизм. [15].

Фосфорилиз нуклеозидов и синтез нуклеозидов из соответствующих оснований и рибозо-1-фосфата ПНФазой 2 определяли с помощью методов, описанных ранее [2]. Выделение обеих форм ПНФазы 2 осуществляли из экстрактов штамма SK460, обладающего в результате мутации *pnfR1* конститутивным синтезом фермента и несущего в геноме делецию по гену *deoD*, по ранее использованной схеме [2]. Чистоту фермента определяли аналитическим электрофорезом при pH 8.9 в 6,2%-ном полиакриламидном геле ПААГ [11]. Молекулярную массу фермента определяли гельфильтрацией на калиброванной колонке с сефадексом G-150 (1,6×89 см), а молекулярную массу субъединиц—электрофорезом в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [17]. В качестве маркерных белков использовали интиокром С (12400), химотрипсиноген А (25700), яичный альбумин (15000), бычий сывороточный альбумин (мономер—67000, димер—134000), альдолазу (148000, субъединицы—37000) и каталазу (субъединицы—60000). Изоэлектрическую точку фосфорилазы определяли методом вертикального изофокусирования в столбиках ПААГ (3,8×110 мм), содержащих 1,6% акридоина с pH 5—7 и 0,4% с pH 3,5—10, а также 9 М мочевины.

Результаты и обсуждение. *Отбор и идентификация мутантов по структурному гену pnfA.* Известно, что мутанты *E. coli*, дефективные по уранилфосфорибозилтрансферазе (*urp*), могут приобретать устойчивость к 5-фторурацилу в комбинации с пуриновым дезоксирибонуклеозидами за счет мутаций по ПНФазе 1 [16]. Для отбора мутантов, дефективных по ПНФазе 2, использовали среды с 2,5 мкг/мл 5-фторурацила и 400 мкг/мл дезоксиадепозина, а в качестве родительского штамма—мутант SK737, лишенный активности ПНФазы 1 (мутация *deoD*), но обладающий за счет мутации *pnfR10* конститутивным синтезом ПНФазы 2 и несущий в геноме мутацию *urp* (табл. 1). В результате были получены мутанты, утратившие способность к росту на средах со всеми пуриновыми нуклеозидами, включая ксантозин, как источниками углерода и энергии.

У таких мутантов могут быть затронуты как структурный, так и регуляторный гены ПНФазы 2. Ранее было показано, что мутация *pnfR10* доминантна по отношению к дикому аллелю *pnfR*⁺ на эписоме F' 198-1 [3]. Поэтому следовало ожидать, что введение в клетки бактерий, дефективных по структурному гену ПНФазы 2 и несущих в геноме мутацию *pnfR10*, эписомы F' 198-1 должно сопровождаться восстановлением спо-

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

Штамм	Генотип ¹	Источник ²
SK460	F ⁻ , val ⁺ , his, pndR1, rpsL, metB, purD, Δ (deoB—deoD) 25	[2]
LBG1158	F ⁻ , pihH, cysA, trp, ilv, rpsL	В. Н. Гершанович (Москва)
NK6659	HirKL16, srl : Tn10, recA56	Д. А. Складнев (Москва)
AK607	F ⁻ , pihH, cysA, ilv, rpsL, deoD8	[3]
AK626	F ⁻ , pndR10, pihH, cysA, ilv, rpsL, deoD8	[3]
F'198—1/FF	F ⁺ , pndR ⁺ , pihH ⁻ , pihL ⁻ , cysA ⁺ , F ⁻ , proC43, pihL40, bglB6, recA1, rpsL150	А. Мунч—Петерсен (Копенгаген, Дания)
SK737	как AK626, но upp	AK626, спонтанно
SK757	как SK737, но pndA8	SK737, спонтанно
SK815	как SK757, но recA56, srl : Tn10	NK6659 × SK757
SK856	как SK815, но F'198—1	F'198—1 FF × SK815
SK888	как SK856, но без F'198—1	SK856, элиминация
SK815 (pND1)	как SK815, но pND1 (pBR322 : pndA)	SK815, трансформация
S21024	Hfr11, hupC : Tn10, metC69, thiL, rel1	Б. Мигинд (Копенгаген, Дания)

¹—Обозначения генетических маркеров, кроме pndR и pndA, введенных нами, соответствуют номенклатуре Бахман [9].

²—Дана литературная ссылка или указано, от кого получен штамм, либо указаны родительские штаммы, из которых в результате спонтанных мутаций, конъюгационных скрещиваний, трансформации или элиминации эписомы получен данный штамм.

способности к катаболизму всех пуриновых нуклеозидов и одновременным появлением в экстрактах бактерий активности ПНФазы² при условии, что эписома содержит в своем составе структурный ген pndA. Этому критерию соответствует мутация в штамме SK757, которая обозначена как pndA8 (табл. 2).

Таблица 2

Фенотипическое проявление мутации pndA8

Штамм	Генотип	Способность к катаболизму		Ксантинфосфоридазная активность, нано-молей в мин на мг
		аденозина, инозина и гуанозина	ксантозина	
LBG1158		+	+	0 (62) ²
AK607	deoD	—	—	0 (71) ²
SK737	deoD, pndR10	+	—	82
SK757	deoD, pndR10, pndA8	—	—	0
SK856	deoD, pndR10, pndA8 F'198—1	+	+	34
SK888	deoD, pndR10, pndA8, recA	—	—	0

²—Определена по появлению роста через 96 ч инкубации на среде с соответствующим нуклеозидом (0,1%) как источником углерода.

²—В скобках указано значение активности в условиях индукции ксантином (выращивания в среде с 0,1% ксантином).

Следовательно, эписома F' 198-1 действительно содержит дикий аллель структурного гена *pndA*, а мутация *pndA8* рецессивна по отношению к дикому аллелю и нарушает активность ПНФазы2. С таким выводом согласуются данные генетического картирования мутации *pndA8*, представленные ниже.

Картирование гена *pndA*. В трансдукционных скрещиваниях с использованием штамма SØ1024 в качестве донора и штамма SK757 в качестве реципиента отбирали трансдуктанты Tet^R (*pnpC*:Tn10), *CysA*⁻ и *PndA*⁺, которые анализировали на наследование неселектируемых маркеров *pnpC*, *pndR*, *pndA*, *ptsI*⁺ и *cysA*. Во всех случаях соотношение рекомбинантных классов по неселектируемым маркерам соответствовало порядку генов на хромосоме: *pnpC*—*pndR*—*pndA*—*ptsI*⁺—*cysA*. С таким порядком генов согласуются также частоты интеграции неселектируемых маркеров в этих скрещиваниях (табл. 3). Следует отметить достаточно высокое (~90%) совместное наследование при трансдукции маркеров *pndA* и *pndR*.

Таблица 3

Интеграция неселектируемых маркеров (%) в потомстве трансдуктантов от скрещиваний донора SØ1024 с реципиентом SK757

Селектируемый маркер	Неселектируемые маркеры				
	<i>pnpC</i> ⁻	<i>pndR</i> ⁻	<i>pndA</i> ⁺	<i>ptsI</i> ⁺	<i>cysA</i> ⁻
Tet ^R (<i>pnpC</i> :Tn10)	100	н. о.*	81.9	67.4	58.1
<i>CysA</i> ⁻	32.7	н. о.*	53.2	79.7	100
<i>PndA</i>	72.5	87.7	100	72.8	56.6

*—н. о.—не определяли, так как рекомбинантные классы *pndR*⁻ *pndA*⁺ и *pndR*⁺ *pndA*⁻ фенотипически не различаются.

Молекулярное клонирование гена *pndA*. Хромосомную ДНК, выделенную из штамма *E. coli* K-12 дикого типа, и ДНК плазмиды pBR322 обрабатывали рестриктазой BamHI, лигировали полученные фрагменты и трансформировали клетки штамма SK815. В результате были отобраны клоны трансформантов, восстанавливающие способность к росту на средах с ксантозином и другими пуриновыми нуклеозидами как источниками углерода и энергии и одновременно унаследовавшие признак устойчивости к ампициллину (100 мкг/мл).

Один из трансформантов был использован для выделения плазмиды, обозначенной pND1. Плазмида pND1, по данным рестрикции эндонуклеазой BamHI и последующего электрофореза в агарозном геле, состоит из вектора pBR322 и встроившегося фрагмента ДНК размером 2,1 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.). Повторная трансформация клеток штамма SK815 плазмидой pND1 восстанавливала способность бактерий к катаболизму пуриновых нуклеозидов. Следовательно, встроившийся в плазмиду pBR322 BamHI фрагмент размером 2,1 т. п. н. содержит структурный ген *pndA*.

Выделение и сравнительная характеристика двух форм ПНФазы2. В ходе очистки ПНФазы2 были обнаружены и очищены до практически электрофоретически гомогенного состояния две формы фермента. Выявленные свойства двух форм ПНФазы2 в сравнении с известными свойствами ПНФазы1 даны в табл. 4. Обе формы фермента обладают оди-

Таблица 4

Некоторые свойства ПНФазы1 и двух форм ПНФазы2 *E. coli*

Характеристика	ПНФаза2		ПНФаза1**
	тримерная	гексамерная	
Молекулярная масса голофермента	85000	150000	140000
субъединиц	28000	25000	23700
Изоэлектрическая точка	pH 5.5	pH 5.5	н. о.
pH стабильность	н. о.	5.9—6.3	7.2—7.6
Относительная скорость фосфороллиза в %			
дезоксининозина	100 (91)*	100 (60)*	100
дезоксигуанозина	62	78	74
инозина	50	58	46
гуанозина	33	37	48
ксантозина	23	53	0
дезоксадеозина	32	0	61
аденозина	14	0	61
Относительная скорость синтеза нуклеозидов в % из рибозо-1-фосфата и			
ксантина	100 (72)*	100 (42)*	н. о.
гуанина	65	81	н. о.
гипоксантина	46	47	н. о.
аденина	21	0	н. о.
Оптимум pH фосфороллиза	6.5—7.0	6.5—7.0	7.0—7.5

*—В скобках указана абсолютное значение активности в микромилах и мин на мг белка, принятое за 100%.

**—По данным работ [12, 14].

наковой изоэлектрической точкой и оптимумом pH для реакции фосфороллиза, однако различаются между собой четвертичной структурой, молекулярной массой субъединиц и субстратной специфичностью.

В результате единичной мутации *pnfA8*, которая ревертирует с частотой $\sim 10^{-6}$, бактерии полностью теряют активность ПНФазы2 (табл. 2). Поэтому можно предположить, что появление гексамерной формы фермента с относительно меньшей молекулярной массой субъединиц вызвано посттрансляционной модификацией субъединиц тримерной формы. В то же время остается неясным физиологический смысл такой модификации для клетки, тем более что она сопровождается изменением субстратной специфичности.

Не менее интригующим является вопрос о возможном эволюционном родстве ПНФазы1 и ПНФазы2. По гипотезе Зинкаса и Рили [18],

геном современной кишечной палочки появился в результате двух последовательных дупликаций меньшего по размеру предкового генома. Следствием этой гипотезы является допущение о расположении эволюционно родственных генов на кольцевой хромосоме бактерий на расстояниях 90 и 180° по отношению друг к другу. Расположение структурных генов *pndA* (51 мин) и *deoD* (99 мин) на 100-минутной генетической карте [9] удовлетворяет этому критерию (~180°). Однако более прямой проверкой существования эволюционного родства между ПНФазой1 и ПНФазой2 явилось бы сравнение степеней гомологии нуклеотидных последовательностей их структурных генов. Для этой цели предполагается использовать плазмиду *pND1* с встроенным геном *pndA*.

Авторы считают своим долгом отметить неоцененную поддержку Соса Исааковича Алиханяна в исследованиях по генетике и биохимии ПНФазы2.

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван,

Институт экспериментальной биологии

АН Армянской ССР, Ереван

Поступило 11 IX 1985 г.

ESCHERICHIA COLI K-12-ի երկրորդ

ՊՈՐՐԵՆՈՒԼԵՆՈՋԻԴՈՍՖՈՐԻԼՔԱՅԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱՆ ԵՎ ԲԻՈԲԻՄԻԱՆ

Շ. Մ. ՔՈՉԱՐԱՆ, Խ. Ն. ԲԵԶԻՐՋՅԱՆ, Մ. Ա. ՄԵԼԿՈՒՄԻԱՆ, Ն. Ի. ՇՈՎՀԱՆՆՈՅԱՆ,
Ա. Մ. ՔՈՉԱՐԱՆ, Ճ. Ի. ԱԿՈՊԻԱՆ

*E. coli K-12-ի երկրորդ պուրինուկլեոզիդֆոսֆորիլազայի (ՊՆՖ-2) սինթեզի համար պատասխանատու pndA կառուցվածքային գենը տեղադրված է այս օրգանիզմների գենետիկական քարտեզի 51-րդ րոպեի վրա և խիստ շղթայակցված է ՊՆՖ-2-ի սինթեզի կարգավորիչ գենի (pndR) հետ: Քրոմոսոմի վրա գեների դասավորման հաջորդականությունը հաստատված է *purC-pnd R-pndA-ptsH* բազմաֆակտոր տրանսդուկցիոն խաչասերումների օգնությամբ: Իրականացված է *pndA* գենի մոլեկուլյար կոնսոլորումը *pBR 322* վեկտորային պլազմիդի կազմում: *pndA* մուտացիան F^+ էպիսոմի կամ *pBR 322* պլազմիդի կազմում գտնվող *pndA^+* վայրի ալելի նկատմամբ սեղեսիվ է:*

ՊՆՖ-2-ի անջատման ընթացքում հաստատված է ֆերմենտի Երկու տեսակների առկայությունը, որոնք իրարից տարբերվում են չորրորդային կատուցվածքով (տրիմեր և հեքսամեր), նախիվ ֆերմենտի և նրա ենթամիավորների մոլեկուլյար կշիռներով (տրիմերի համար՝ 85000 և 28000, հեքսամերի համար՝ 150000 և 25000), ինչպես նաև սուպերատային սպեցիֆիկությամբ՝ հեքսամերը, ի տարբերություն տրիմերի, չի ճեղքում ադենին նուկլեոտիդները:

GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF THE SECOND PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE OF *ESCHERICHIA COLI K-12*

Sh. M. KOCHARIAN, Kh. O. BEZIRDJIAN, M. A. MELKUMIAN,

N. I. OGANESIAN, A. M. KOCHARIAN, J. I. AKOPIAN

The *pndA* structural gene, encoding the second purine nucleoside phosphorylase (PNPase 2) of *E. coli K-12*, is located on 51 min. of the genetic map and tightly linked to the PNPase2—*pndR* regulatory

gene. The *nupC* — *pndR* — *pndA* — *plsH* gene order has been established by means of transductional crosses. The *pndA* mutations are recessive to the *pndA*⁺ allele both on the F' episome and cloned on pBR322 plasmid.

During enzyme purification study two forms of PNPase2 have been established. They differ by quaternary structure (trimeric and hexameric), molecular weights of the native enzyme and its subunits, as much as substrate specificity (trimer is specific for all major purine nucleosides while hexamer does not cleave nucleosides of adenine).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиханян С. И., Ильина Т. С., Калмаш Э. С., Камечева С. В., Суходолов В. В. Микробиология, 34, 666—674, 1965.
2. Безирджян А. О., Кочарян Ш. М., Акопян Ж. И. Докл. АН СССР, 258, 1236—1238, 1981.
3. Кочарян А. М., Мелкумян М. А., Кочарян Ш. М. Генетика, 21, 220—228, 1985.
4. Кочарян Ш. М., Кочарян А. М. Генетика, 17, 246—257, 1981.
5. Кочарян Ш. М., Кочарян А. М., Мелкумян М. А., Безирджян А. О., Акопян Ж. И. Генетика, 20, 1463—1471, 1984.
6. Кочарян Ш. М., Смирнов Ю. В. Генетика, 13, 1425—1433, 1977.
7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике М., 1976.
8. Alkhanatyan S. I., Hovh T. S., Kaljaneva E. S., Kameneva S. V., Sukhodolov V. V. Gen. Res., 8, 83—100, 1966.
9. Bachman B. J. Microbiol. Rev., 47, 180—230, 1983.
10. Buxton R. S., Hammer—Jespersen K., Valentin—Hansen P. Mol. Gen. Genet., 179, 331—340, 1980.
11. Duvits B. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404—427, 1964.
12. Jensen K. P., Nygaard P. Eur. J. Biochem., 51, 253—265, 1975.
13. Hammer—Jespersen K., Buxton R. S., Hansen T. U. Mol. Gen. Genet., 179, 341—348, 1980.
14. Krenitzky T. A., Kuzatka G. W., Tuttle J. V. Biochemistry, 20, 3615—3621, 1980.
15. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Labor., Cold Spring Harbor, New York, 1982.
16. Munch—Petersen A., Melbye—sen M. of nucleotides, nucleosides and nucleobasis microorganisms. London—New—York, Acad. Press, 1983.
17. Weber K. M., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4405—4412, 1969.
18. Ziffas D., Riley M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1354—1359, 1975.

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

УДК 576.851.132.095:547.963.3

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ПЛАЗМИДНЫХ ДНК SALMONELLA DERBY ШТАММА К-89

А. Ф. КАЗАНЧЯН

Показана структурно-функциональная вариабельность ДНК плазмид *Salmonella derby* К-89; в исследуемом штамме выявлены инвертированные повторющиеся последовательности ДНК, ответственные за рекомбинационные процессы в клетках бактерий и, во всей вероятности, обуславливающие структурно-функциональную вариабельность изученных плазмидных ДНК.

Ключевые слова: *сальмонелла*, плазмида.