

## ВЛИЯНИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗНЫХ МУТАЦИЙ НА ПОСТРАДИАЦИОННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРОЙ У *lon*-ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* K-12

Г.Г.ОГАНЕСЯН, А.А.БАРСЕГЯН

*Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян*

### *РНК-полимеразные мутации - радиочувствительность - температурный шок*

В последнее время интерес к *lon* гену *Escherichia coli* K-12 заметно возрос. Это связано с тем, что наряду с такими свойствами клетки, как радиочувствительность, клеточное деление, синтез капсулярных полисахаридов, он контролирует также специфическую протеазную активность, обуславливающую деградацию дефектных и чужеродных белков в клетке [4, 7]. Установлено также, что *lon* ген является одним из 17 генов теплового шока, активность которых индуцируется высокой температурой [9]. При этом показано, что детерминированный *lon* геном биосинтез АТФ-зависимой протеазы при температурном шоке резко повышается. Специфическим субстратом этой протеазы является ингибитор клеточного деления, синтез которого в ответ на облучение индуцируется с белками, входящими в состав SOS-регулона [6].

Способность повышать пострадиационную выживаемость после временной экспозиции при высокой температуре является характерной особенностью *lon* мутантов [3,8]. На основании достигнутых результатов последних лет было сделано предположение, что увеличение устойчивости этих мутантов к облучению при высокой температуре связано с повышением уровня остаточной *Lon*-протеазной активности, за счет *de novo* синтеза этого белка [9]. Если это так, то устойчивость *lon* культур будет зависеть от активности компонентов белоксинтезирующего аппарата клетки: РНК-полимеразы, рибосом и других.

С целью проверки этого предположения в настоящей работе изучалось влияние мутационных изменений  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы на пострадиационное восстановление *lon* культур, подвергнутых температурному шоку.

**Материал и методика.** В работе использовали следующие бактериальные штаммы *Escherichia coli* K-12: JC335 (F<sup>-</sup> *leu* *his* *arg* *metB* *supE*); A200 (F<sup>-</sup> *leu*<sup>-</sup> *lon* *his* *arg* *metB* *supE*<sup>+</sup>) и его рифампициностойчивые (Риф<sup>r</sup>) *groB* *metB*<sup>-</sup> рекомбинанты А-р1, А-р2, А-р3, А-р9 и А-р23, описанные нами ранее [5].

Применялись общепринятые среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), минимальная среда М9 [2], фосфатный буфер рН 6,8.

УФ облучение проводили по ранее описанной методике под лампой БУВ-30 [1]. Время генерации культур определяли по Миллеру [2].

**Результаты и обсуждение.** Были определены температурные максимумы

роста исследуемых культур (табл. 1).

Таблица 1. Рост исследуемых *lon proV* штаммов *E.coli* после высева спот-тестом на МПА при различных температурах

Штаммы	Температура инкубации, °С				
	37	40	42	44	46
JС335	+++	+++	+++	++	-
A200	+++	+++	+++	++	-
A-p1	++	++	++	+	-
A-p2	++	++	++	+	-
A-p3	+++	+++	+++	++	-
A-p9	+++	+++	+++	++	-
A-p23	+++	+++	+++	++	-

Примечание: (+++) - нормальный рост; (++) - слабый рост; (+) - очень слабый рост; (-) - отсутствие роста.

До 42° у всех культур скорость роста почти не изменялась. При 44° происходило заметное торможение роста, особенно у штаммов А-р23 и А-р3, а при 46° происходила резкая остановка его у всех культур, включая дикий штамм. На основании полученных результатов для термошока была выбрана температура 44°.

Все культуры были подвергнуты УФ облучению тремя дозами. Затем часть культуры была высеяна на чашки с МПА и инкубировалась при оптимальной температуре 37°, другая часть была высеяна на предварительно нагретые до 44° чашки и выдерживалась при этой температуре в течение 6 ч, после чего переносилась на оптимальную температуру. Усредненные результаты 5-7 опытов приведены на рис. 1.

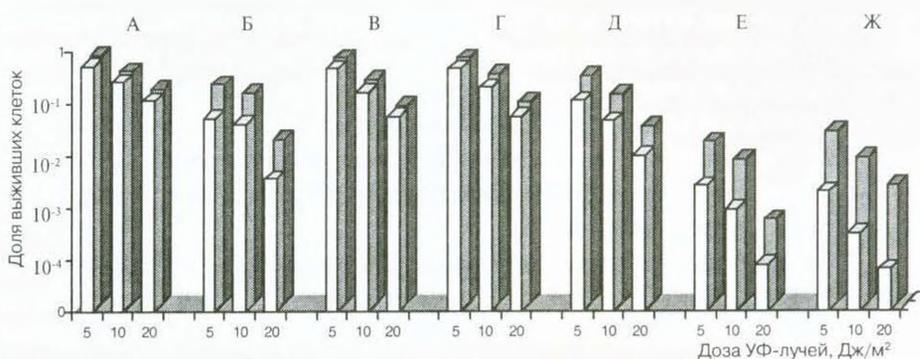


Рис. 1. Кинетика УФ-гибели и пострадикационное восстановление высокой температурой рифампицинустойчивых *lon* штаммов: А - JС335 (дикий штамм); Б - А200 (исходный штамм); В - А-р1; Г - А-р2; Д - А-р9; Е - А-р23; Ж - А-р3. Светлые колонны - выживаемость при оптимальной температуре (37°), темные колонны - выживаемость при повышенной температуре (44°).

Как видно из рисунка, риф-р *lon* культуры по своей чувствительности существенно отличаются друг от друга при всех дозах облучения. Выживаемость штаммов А-р1 и А-р2 под влиянием риф-р мутации повышалась до уровня этого показателя у дикого штамма JС335, а у культур А-р23 и А-р3 она оказалась намного ниже, чем у исходной *lon* культуры А200. Максимальная разница

в выживаемости между риф-р штаммами составляла более 200 раз при дозе 5 Дж/м<sup>2</sup> и почти 1500 раз при 20 Дж/м<sup>2</sup>.

После перенесенного термошока выживаемость чувствительных культур резко повышалась, тогда как у устойчивых культур она оставалась неизменной. Влияние высокой температуры особенно сильно сказалось на УФ-чувствительном штамме А-р3. У этой культуры при дозе УФ 5 Дж/м<sup>2</sup> выживаемость повышалась в 9 раз, а при 20 Дж/м<sup>2</sup> - в 35 раз, в то время как у исходного штамма А200 она повышалась всего в 3 и 5 раз соответственно. Аддитивное повышение выживаемости риф-р мутацией и действием высокой температуры происходило только у штамма А-р2 (хотя и в этом случае оно было незначительным). На штаммы А-р23 и А-р3 риф-р мутации и высокая температура оказывали противоположные действия. Мутации уменьшали, а температура повышала выживаемость этих культур.

Ранее нами была найдена корреляция между скоростью роста *lon* культур и их чувствительностью к УФ облучению [1,5]. Как видно из рис. 2, после перенесения термошока чувствительность культур оставалась зависимой от скорости роста. Обычно с повышением температуры биохимические реакции активизируются, но из-за ускорения деградации вновь синтезированных

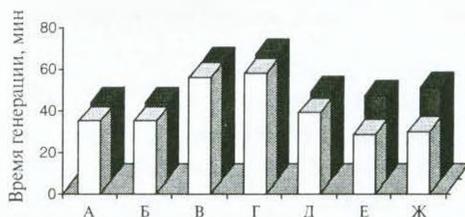


Рис. 2. Время генерации рифампициноустойчивых *lon* штаммов. Обозначения такие же как на рис. 1.

белков скорость роста увеличивается незначительно [6]. И в нашем случае высокая температура существенного влияния на скорость роста радиоустойчивых культур не оказывала. Обратная картина наблюдается у быстрорастущих при оптимальной температуре культур А-р23 и А-р3: при повышении температуры скорость роста уменьшается, почти доходя до уровня исходной *lon*<sup>-</sup> культуры.

Отношение риф-р культур к УФ облучению и восстановлению теплошоком в большей мере определяется взаимодействием глобальных регуляторных систем клетки - SOS- и НТР-регулонов. Индукция первого УФ облучением вызывает повышенный синтез ингибитора клеточного деления *SulA*, а второго теплошоком - повышение *Lon*-протеазной активности, расщепляющей *SulA* белок. Изменение соотношения количества этих двух белков риф-р мутациями может приводить либо к ингибированию, либо возобновлению клеточного деления.

Индукция SOS-регулона в сильной степени зависит от физиологического состояния клетки. У быстрорастущих риф-р культур из-за увеличения числа репликативных вилок повышается вероятность индукции и полной экспрессии SOS-регулона и входящего в его состав *sulA* гена [10]. Ускоренный синтез *SulA* белка в отсутствие или при малых количествах *Lon*-протеазы приводит к необратимому подавлению клеточного деления, образованию филаментов и лизису клеток [7]. Быстрорастущие мутанты более отзывчивы к высокой температуре, так как индуцируемая теплошоком мутантная *Lon*-протеаза

синтезируется в большем количестве [7], благодаря чему увеличивается ее суммарная активность, что и вызывает разрушение SulA белка, возобновляя деление большей части филаментов. У медленно растущих культур вероятность индукции SOS-регулона резко уменьшается, а в случае индукции белки, входящие в его состав, синтезируются с меньшей скоростью. В отсутствие (или при малом количестве) SulA-субстрата индукция Lon-протеазы повышенной температурой не будет давать ощутимого эффекта, что и наблюдается у штаммов А-р1 и А-р2.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Барсемян А.А., Оганесян Г.Г., Оганесян М.Г. Биолог. журн. Армении, 36, 6, 479-484, 1983.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной биологии. 436. М., Мир., 1976.
3. Мясник М.Н. Генетический контроль радиочувствительности. 152, М., Атомиздат, 1974.
4. Оганесян Г.Г., Барсемян А.А. Биолог. журн. Армении, 49, 1-2, 30-33, 1996.
5. Оганесян Г.Г., Барсемян А.А., Оганесян М.Г. Биолог. журн. Армении, 37, 5, 398-404, 1984.
6. Farewell A., Neidhardt F.C. J.Bacteriol., 180, 17, 4704-4710, 1998.
7. Gottesman S., Maurizi M.R. Microbiol. Rev., 56, 592-621, 1992.
8. Ogannessian H.G., Ogannessian M.G. Studia Biophysica, 53, 151-152, 1975.
9. Phillips T.A., Van Bogelen R.A., Neidhardt F.C. J.Bacteriol., 159, 1, 283-287, 1984.
10. Walker G.C. Microbiol. Rev., 48, 1, 60-93, 1984.

Поступила 9.XI.1998