

## ПОЛНАЯ СУПРЕССИЯ ПРОЯВЛЕНИЯ *lon* МУТАЦИЙ *ESCHERICHIA COLI K-12* ХРОМОСОМНЫМ ФРАГМЕНТОМ

Г.Г. ОГАНЕСЯН, С.С. ОГАНЕСЯН

*Институт микробиологии НАН Армении, 375810, г. Абовян*

У *lon* мутанта *Escherichia coli K-12 CA154 HfrH* был отобран *Lon*<sup>+</sup> неслизистый ревертант *NM144*, обладающий устойчивостью к УФ облучению. Причиной возникновения *Lon*<sup>+</sup> фенотипа является образование автономно реплицирующего фрагмента хромосомы *pHS44*, который содержит по крайней мере *his-tyrA* область хромосомы *E.coli*. Обратная интеграция *pHS44* в хромосому приводит к восстановлению мутантного *Lon* фенотипа. По данным конъюгационных экспериментов, интеграция *pHS44* происходит на свой прежний участок хромосомы. Один или несколько молчащих на хромосоме генов, переходя в автономное состояние, активизируются и супрессируют все проявления *lon* мутации, по-видимому, путем синтеза альтернативной *Lon* протеазы (*Alp*).

*Escherichia coli K-12 CA154 HfrH lon* մուտանտից անջատվել է *Lon*<sup>+</sup> ոչ լորձավոր *NM144* ռեվերտանտը, որը կայուն է ՌՍ-ճառագայթման նկատմամբ: *Lon*<sup>+</sup> ֆենոտիպի առաջացման պատճառը հանդիսանում է *pHS44* քրոմոսոմից անջատ ինքնուրույն ռեպլիկացվող մասնիկի ձևավորումն, որը ներառնում է *E. coli*-ի քրոմոսոմի առնվազն *his-tyrA* մասը: *pHS44*-ի հետադարձ ինտեգրացիան քրոմոսոմի մեջ բերում է մուտանտային *Lon* ֆենոտիպի վերականգնմանը: Կոնյուգացիոն փորձերի համաձայն *pHS44*-ի ինտեգրացիան կատարվում է քրոմոսոմի իր նախկին տեղում: Քրոմոսոմի վրա մեկ կամ մի քանի լռող գեներ անցնելով *pHS44*-ի վրա ակտիվանում և սուպրեսիայի են ենթարկում *lon* մուտացիայի բոլոր դրսևորումները, հավանաբար, պլոտեոնատիվ *Lon* պրոտեազի (*Alp*) սինթեզման ճանապարհով:

From *lon* mutant of *Escherichia coli K-12 CA154 HfrH* a *Lon*<sup>+</sup> nonmucoide revertant resistant to UV radiation has been selected. The cause of *Lon*<sup>+</sup> phenotype appearance is a autonomously replicating chromosomal fragment, designated as *pHS44*, which includes at least the *his-tyrA* region of *E. coli* chromosome. Reintegration of *pHS44* into the chromosome brings to recovery of mutant *Lon* phenotype. According to conjugation experiments data the integration of *pHS44* takes place on its own region in chromosome. One or more silent chromosome genes duration transference on autonom conditions are activated and suppress all *lon* mutations, probably by synthesizing of an alternative *Lon* protease (*Alp*).

*Lon* мутация - супрессия - АТФ-зависимые протеазы - УФ-чувствительность - биосинтез капсулы

*Lon* ген *Escherichia coli K-12*, детерминирующий биосинтез АТФ-зависимой протеазы, играет ключевую роль в регуляции биосинтеза капсулярных полисахаридов (КП), клеточного деления, наследования плазмид, лизогенизации умеренными бактериофагами и деградации дефектных белков [3-9]. *Lon* мутанты отличаются высокой чувствительностью к УФ лучам, нитрофурантоину (НФ), метил-метансульфонату и другим ингибиторам биосинтеза ДНК, после действия которых клеточное деление необратимо ингибируется и образуются филаменты, которые впоследствии лизируют [3-12]. В разное время были получены внегенные супрессорные мутации *non*, *rsc* и *cps*, подавляющие слизистый фенотип [9, 14], и *suf*, *sfiA*, *sulA*, *sulB*, подавляющие УФ-чувствительный

фенотип [5, 8, 12], но супрессоры, угнетающие одновременно все проявления *lon* мутаций, не были обнаружены. Недавно было показано существование слабой АТФ-зависимой протеазной активности у *lon* нуль мутанта, названной *Alp* (alternative *Lon* protease). Увеличение дозы *alp* гена методом клонирования в многокопийную плазмиду приводило к подавлению слизистого и MMS-чувствительного фенотипов *lon* мутантов. Однако клонированный ген непосредственно не отвечал за биосинтез *Alp*-протеазы, а оказался позитивным регулятором *slpA* гена, который в свою очередь служил негативным регулятором *ssrA* гена, кодирующего биосинтез небольшой стабильной 10Sa РНК, частично находящейся внутри генома криптического Р4 подобного профага CP4-57. При инактивации или утрате *ssrA* гена после индукции и элиминации профага появлялась слабая *Alp*-активность. Но только при наличии в клетке канамицинустойчивой плазмиды, роль которой не совсем понятна, активность *Alp* проявлялась полностью [11, 15, 16]. Сам ген, детерминирующий биосинтез *Alp*-протеазы, не удалось идентифицировать.

В нашей работе приводятся данные по обнаружению и изучению крупного фрагмента хромосомы *E. coli*, способного супрессировать все проявления *lon* мутаций.

**Материал и методика.** Использованы бактериальные штаммы *E. coli* K-12: J62 F pro trp his str-r, X121 F pyrD trp his tyrA str-r, CA154 HfrH lacZ thi (из лабораторной коллекции), MUC154-2 *lon* дериват штамма CA154 и NM144 неслизистый, УФ-резистентный мутант штамма MUC154-2 (получены Оганесяном Г.Г.), AB2463 F thr leu proA his argG recA str-r.

**Питательные среды:** полноценный бульон NB (Serva), триптоз-агар (Ferak), минимальная среда M9 (2), среда Эндо (Serva), фосфатный буфер pH 6,8.

**Реактивы:** стрептомицин-сульфат (РФ), нитрофурантоин (Calbiochem), акридиновый оранжевый и агароза (Serva).

УФ облучение культур проводили под спаренными лампами БУВ-15 на расстоянии 50 см, при постоянном перемешивании в условиях, исключающих фотореактивацию. Бактериальную культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, осаждали при 3000 об/мин, ресуспендировали в фосфатном буфере, по 2 мл заливали в чашки Петри диаметром 50 мм и облучали при постоянном перемешивании, затем из серийных разведений высевали на триптоз-агар.

Чувствительность культур к нитрофурантоину (НФ) проверяли спот-тестом с помощью игольчатых репликаторов на агаризованных средах.

Конъюгационные скрещивания производили по известным методикам [2]. Прерывание конъюгативных пар производили на встряхивателе 326m (Польша) в течение 40 сек.

Исцеление бактерий от плазмид производили акридиновым оранжевым по общепринятой методике [2]. Плазмидную ДНК определяли по известному методу [1]. Эти эксперименты проводились в Институте им. Пастера в Париже.

**Результаты и обсуждение.** Была изучена чувствительность к УФ облучению и действию НФ родительских штаммов CA154, MUC154-2 и неслизистого мутанта NM144 (табл. 1).

Как видно из табл. 1, по устойчивости к УФ лучам NM144 резко превосходит родительский штамм MUC154-2, однако, примерно в два раза уступает дикому штамму CA154. Повышение устойчивости к лучам УФ и НФ у неслизистого мутанта могло быть следствием внутригенной или внегенной супрессорной мутации. Для определения места супрессорной мутации был проведен генетический анализ.

Таблица 1. Чувствительность мутанта *NM144* и родительских *lon<sup>+</sup>* и *lon* штаммов к УФ и НФ

Штамм	Выживаемость штаммов, %, после УФ облучения, сек.				Чувствительность к НФ (2мкг/мл)
	5	10	20	30	
CA154 <i>lon<sup>+</sup></i>	66	35	10	18	-
MUC154-2 <i>lon</i>	3,4	0,48	0,031	0,0035	+
NM144	36	19	2,6	0,47	-

*NM144* мутант методом общей конъюгации был скрещен с реципиентным *F* штаммом *J62*. У отобранных *Pro<sup>+</sup>*, *His<sup>+</sup>* и *His<sup>+</sup>Pro<sup>+</sup>* рекомбинантов определяли долю слизистых рекомбинантов (табл. 2).

Таблица 2. Частота выхода слизистых рекомбинантов при конъюгационном скрещивании *HfrH* мутанта *NM144* и его родительских штаммов с *F J62* штаммом

Донорский штамм	Доля слизистых рекомбинантов (%) среди		
	<i>Pro<sup>+</sup></i>	<i>His<sup>+</sup></i>	<i>Pro<sup>+</sup>His<sup>+</sup></i>
NM144	48	2	12
MUC154-2	54	30	32
CA154	0	0	0

Как видно из табл. 2, среди эксконъюгантов очень высокий процент составляют слизистые рекомбинанты. Их доля особенно высока, около 48%, среди *Pro<sup>+</sup>* эксконъюгантов. За редким исключением, слизистые рекомбинанты оказались чувствительными, а неслизистые - устойчивыми к действию НФ.

Расщепление потомства на слизистых и неслизистых свидетельствует о сохранении исходной *lon* мутации и наличии в штамме *NM144* внегенной супрессорной мутации, способной полностью подавлять ее экспрессию. Судя по резкому снижению доли слизистых колоний среди *His<sup>+</sup>Pro<sup>+</sup>* рекомбинантов, этот супрессор тесно сцеплен с *his* локусом.

При конъюгационном скрещивании *Hfr* штаммов, как правило, выход рекомбинантов по проксимальным к *F* фактору маркерам намного выше по сравнению с дистальными. Но вопреки ожиданиям, рекомбинантов по *His* маркеру, находящемуся на 45 мин генетической карты, получалось значительно больше, чем по более ранним *Pro* и *Trp* маркерам, локализующимся соответственно на 5 и 28 мин.

Для выяснения механизма этого явления было решено провести конъюгационные скрещивания с прерываниями и проследить порядок и время передачи каждого маркера. В качестве контроля был использован исходный штамм *CA154*. Прерывания конъюгации производили с интервалом в 10 мин. Данные выхода рекомбинантов в процессе конъюгации приведены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, штамм *CA154* передает свои маркеры *F* штамму с частотами и очередностью *HfrH* штамма, а у *NM144* они сильно

нарушены. Так, выход  $\text{Pro}^+$  рекомбинантов у *CA154* намного выше, чем у *NM144*, в то же время как по выходу  $\text{His}^+$  рекомбинантов *NM144* превосходит родительский штамм более чем в 100 раз.

Таблица 3. Количество рекомбинантов, полученных при скрещивании донорских штаммов *NM144* и *CA154* с реципиентным штаммом *F J62* методом прерванной конъюгации

Донор	Время, мин	Селективный маркер					
		$\text{Pro}^+$		$\text{Tgr}^+$		$\text{His}^+$	
		всего	слизист.	всего	слизист.	всего	слизист.
NM144	10	1	0	0	0	0	0
	20	3	1	0	0	0	0
	30	4	2	0	0	3	0
	40	4	2	1	0	27	0
	50	6	3	2	0	568	22
	60	44	21	18	0	926	37
	70	42	24	222	2	1288	53
CA154	10	31	0	0	0	0	0
	20	133	0	0	0	0	0
	30	380	0	2	0	0	0
	40	520	0	10	0	0	0
	50	650	0	274	0	4	0
	60	634	0	235	0	9	0
	70	-	-	-	-	26	0

Чтобы исключить штаммоспецифичность, *NM144* был скрещен с реципиентным штаммом *F X'121* (табл. 4).

Таблица 4. Выход рекомбинантов при скрещивании *NM144* с *X'121* методом прерванной конъюгации

Время, мин	Селективный маркер				
	$\text{Pur}^+$	$\text{Tgr}^+$	$\text{His}^+$	$\text{Tyr}^+$	$\text{His}^+\text{Tyr}^+$
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
30	1	0	3	4	2
40	2	1	58	40	22
50	5	4	318	365	236
60	3	58	460	480	285
70	6	326	486	520	532
80	18	284	608	636	628

Исследования показали, что градиент переноса маркеров, свойственный *HfrH* штаммам при скрещивании с *F- X'121* реципиентным штаммом, тоже нарушен. Сначала передается  $\text{His}^+$  маркер, затем  $\text{Tyr}^+$ , потом  $\text{Tgr}^+$  (табл. 4). При этом частота передачи  $\text{Pur}^+$  маркера, несмотря на близкое расстояние на хромосоме, всего 6 мин, в 20-40 раз меньше, чем у  $\text{Tgr}^+$  маркера. Обнаруженные нарушения градиента переноса маркеров могли быть следствием возникновения самостоятельного репликона, который наподобие плазмид может мобилизоваться и передаваться в реципиентную клетку раньше основной хромосомы.

Образование самостоятельно реплицирующегося фрагмента хромосомы длиной примерно 40% интактной хромосомы с охватом генов от *trp* до *tyrA* произошло, по-видимому, путем выщепления из хромосомы очень крупной F'-эписомы. Если учесть, что *NM144* является лизогенным по фагу  $\lambda$ , а *X'121* нет, то из данных табл. 4 можно заметить отсутствие зиготной индукции, доказывающей, что *his*, *tyrA* и *trp* маркеры передаются реципиентной клетке раньше, чем профаг  $\lambda$ .

Для установления наличия плазмиды была проведена обработка бульонной культуры штамма *NM144* акридиновым оранжевым в ожидании высокого выхода слизистых ревертантов. Однако многократное повторение опытов с различными концентрациями акридинового оранжевого не дали положительных результатов. При посевах бульонных культур *NM144* на среде Эндо удалось обнаружить единичные мукоидные колонии. Изолированные мукоидные ревертанты не нуждались в дополнительных факторах роста и хорошо росли на минимальной среде с тиаминном. При конъюгационных скрещиваниях было обнаружено, что у мукоидных ревертантов восстановлены градиент передачи генетических маркеров и зиготная индукция профага  $\lambda$  свойственных *HfrHL<sup>+</sup>* штаммам.

Для удостоверения в отсутствии плазмид были поставлены также опыты по пульс - электрофорезу очищенных лизатов штамма *NM144*, показавшие, что мелкие и очень крупные до 350 Mg плазмиды в нем отсутствуют.

Обнаруженные нарушения градиента переноса генов и высокая частота выхода *His<sup>+</sup>*, *TyrA<sup>+</sup>* и *Trp<sup>+</sup>* эксконъюгантов в большей степени можно объяснить образованием меродиплоидов, чем рекомбинантов. Для проверки этого предположения конъюгационные скрещивания были повторены с *recA* реципиентным штаммом, у которого крайне низка вероятность рекомбинаций (табл. 5.).

Таблица 5. Выход прототрофных эксконъюгантов при скрещивании донорного штамма *NM144* с F реципиентом *AB2463 recA*

Время прерывания конъюгации	Выход прототрофов по селективным маркерам			
	T <sup>+</sup> L <sup>+</sup>	ProA <sup>+</sup>	His <sup>+</sup>	ArgG <sup>+</sup>
10	0	0	0	0
20	0	0	12	0
30	0	0	19	0
40	0	0	63	0
50	1	0	232	0
60	0	0	346	0
70	0	1	758	1
80	1	2	836	0

Данные табл. 5 подтверждают, что несмотря на отсутствие рекомбинаций, выход *His<sup>+</sup>* эксконъюгантов опять чрезмерно высок, а по остальным маркерам рекомбинанты вовсе отсутствуют. Единичные прототрофы, обнаруженные по этим маркерам, скорее всего являются ревертантами, а не рекомбинантами. Эти результаты свидетельствуют о том, что высокий выход эксконъюгантов по дистальным маркерам действительно связан с

переносом в реципиентную клетку. самостоятельно реплицирующегося фрагмента хромосомы и образованием мерозигот.

Полученные мерозиготы не приобретают чувствительности к мужским фагам MS2 и fd103 и при использовании в качестве доноров в конъюгационных опытах не передают приобретенные генетические маркеры реципиентным штаммам.

Мы предполагаем, что *NM144* мутант возник в результате выщепления очень крупной *F'*-эписомы, превосходящей по размеру оставшуюся часть хромосомы. Оставшийся сегмент хромосомы, названный нами *pHS44*, содержит *trp*, *his*, *tyrA* гены и охватывает участок хромосомы по крайней мере от 28-й до 59-й мин временной карты *E. coli*. *pHS44* замыкается в кольцо и реплицируется, по-видимому, от *oriJ* (30,5 мин). Невзирая на отсутствие полового фактора, из-за своего сравнительно малого размера *pHS44* мобилизуется и передается в реципиентную клетку раньше *F'*-эписомы. Согласно конъюгационным данным, порядок передачи маркеров таков: *oriJ-his-tyrA-trp*. Расстоянием около 25 мин между *oriJ* и *his* можно объяснить появление первых His<sup>+</sup> эксконъюгантов через 30 мин после начала скрещивания.

Согласно приведенным данным, супрессор *lon* мутаций локализован на *pHS44*. Так как он восстанавливает весь Lon<sup>+</sup> фенотип, то мы предполагаем, что он представляет собой АТФ-зависимую протеазу со специфичностью Lon-протеазы. Возможно, она идентична с найденной ранее Alp-протеазой [11, 15, 16]. Интересно, что для проявления и Alp-активности, и нашего супрессора необходим акт выщепления хромосомного сегмента в области *tyrA* гена. Однако, в отличие от искусственно созданного путем многоступенчатых манипуляций штамма, обладающего Alp-активностью, наш мутант *NM144* был получен в естественных условиях и обладал высокой супрессорной активностью. Возможно, при выщеплении *F'*-эписомы одним концом задевает *ssrA* ген и тем самым индуцирует Alp-активность. Ранее было обнаружено, что штаммы, содержащие инсерции типа *ssrA*: *cat* на полноценном агаре образуют мелкие колонии [13]. Штамм *NM144* на полноценной питательной среде тоже образовывал мелкие колонии, что подтверждает предположение о повреждении *ssrA* при образовании *pHS44*. Для полного проявления *alp* гена в нашем случае нет необходимости в присутствии *Tn903* канамицин резистентного элемента. По-видимому, само нахождение гена, кодирующего Alp-активность на *pHS44*, достаточно для обеспечения его полного проявления.

О появлении Alp-протеазной активности свидетельствует также более высокая чувствительность *NM144* к аналогам аминокислот D,L-норвалину и канаванину по сравнению с родительским *lon* штаммом *Muc154-2*. Это, очевидно, связано с более быстрой деградацией аналогосодержащих белков в Alp<sup>+</sup> штамме. Подобную разницу в скорости деградации аналогосодержащих белков у *lon*<sup>+</sup> и *lon* штаммов было показано также другими авторами [10].

Супрессия проявления *lon* мутаций детерминирования *pHS44* не является специфичным. Способность подавлять проявление любых *lon*

мутаций еще раз подтверждает наш вывод о том, что *pHS44* кодирует биосинтез новой Lon-протеазной активности. Иначе трудно представить, каким образом могут такие независимые процессы, как биосинтез ПС и нарушенное клеточное деление, восстанавливаться одновременно.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., Мир, 1976.
3. Оганесян Г. Г. Биолог. журн. Армении, 48, 2, 55-58, 1995.
4. Berg P. E., Gayda R., Avni H., Zehnbauser B., Markovitz. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1, 697-701, 1976.
5. Gayda R., Jamamoto L. T., Markovitz A. J. Bacteriol. 127, 3, 1208-1216, 1976.
6. Gayda R. C., Markovitz A. J. Bacteriol. 136, 1, 369-380, 1978.
7. Gayda R. C., Avni H., Berg P. E., Markovitz A. Molec. Gen. Genet., 175, 325-332, 1979.
8. George J., Castellazzi M., Buttin G. Mol. Gen. Genet., 127, 3, 1208-1216, 1976.
9. Gottesman S., Trisler P., Torres-Cabassa A. Mol. Gen. Genet., 140, 4, 309-332, 1975.
10. Gottesman S., Zipser D. J. Bacteriol., 133, 2, 844-851, 1978.
11. Kirby J. E., Trempe J. E., Gottesman S. J. Bacteriol., 176, 7, 2068-2081, 1994.
12. Ogannessian H. G., Ogannessian M. G. Genetics, 74, 2, 200, 1973.
13. Oh B.K., Apirion D. Mol. Gen. Genet., 221, 52-56, 1991.
14. Radke K., Siegel E. C. J. Bacteriol., 106, 2, 432-437, 1971.
15. Trempe J. E., Gottesman S. J. Bacteriol. 171, 5, 3348-3353, 1989.
16. Trempe J. E., Kirby J. E., Gottesman S. J. Bacteriol., 176, 7, 2061-2067, 1994.

Поступила 20.V.1999