ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Издается с 1946 года

Айастани кенсабанакан андес

выходит 12 раз в год

на армянском и русском языках

Խմբագրական կոլեգիա՝ *Ծ. Մ. Ավագյան, Վ. Ն. Ավետիսյան, Է. Կ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Հ. Գ. Բակլավաջյան, Ա. Շ. Գալստյան (գլխ. խմբագրի տեղակալ), Ժ. Ի. Հակոբյան, Ե. Ս. Հարությունյան (պատ. քարտուղար), Ռ. Մ. Հարությունյան, Կ. Գ. Ղարագյոզյան, Վ. Հ. Ղազարյան, Ս. Հ. Մովսեսյան*

Խմբագրական խորհուրդ՝ *Ա. Ս. Ավետյան, Վ. Շ. Աղաբաբյան, Ն. Ն. Ակրամովսկի, Է. Կ. Աֆրիկյան (խորհրդի նախագահ), Դ. Ն. Բաբայան, Է. Ց. Գաբրիելյան, Ա. Ա. Գալոյան, Ա. Լ. Թախտաջյան, Պ. Ա. Խուրշուդյան, Ս. Կ. Կարապետյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Լ. Լ. Հովսեփյան, Վ. Ս. Ղամբարյան, Ա. Ա. Մաթևոսյան, Մ. Խ. Չայլախյան, Կ. Ս. Պողոսյան*

Редакционная коллегия: Ц. М. Авакян, В. Н. Аветисян, Ж. И. Акопян, Е. С. Арутюнян (ответ. секретарь), Р. М. Арутюнян, Э. К. Африкян, (главный редактор), О. Г. Баклаваджян, А. Ш. Галстян (зам. главного редактора), В. О. Казарян, К. Г. Карагезян, С. О. Мовсесян.

Редакционный совет: А. С. Аветян, В. Ш. Агабабян, Н. Н. Акрамовский, Э. К. Африкян (пред. совета), Д. Н. Бабаян, Э. Ц. Габриелян, А. А. Галоян, В. С. Гамбарян, С. К. Карапетян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осипян, К. С. Погосян, А. Л. Тахтаджян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чайлахян.

ՀՍՍՀ ԳԱ Հրատարակչություն, Հայաստանի կենսաբանական հանդես,
© Издательство АН Армянской ССР, Биологический журнал Армении 1985

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ

Հիմնադրվել է 1946 թ. Հրատարակվում է տարեկան 12 անգամ

Հատոր XXXVIII, № 11 Երևան Նոյեմբեր, 1985 թ.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Փորձարարական

Ալիխանյան Ս. Ի. *Միկրոօրգանիզմների գենետիկայի դերը կենսաբանության ակտուալ պրոբլեմների զարգացման մեջ* 935
Սահակյան Վ. Ա. *Բակտերիալ գեների հետերոլոգիական էքսպրեսիան պրոկարիոտներում* 944
Լոմովսկայա Ն. Դ., Մկրտումյան Ն. Մ., Վոեյկովա Տ. Ա., Մատվեևիչ Գ. Լ., Պևզովա Ն. Վ. *Ակտինոֆագերի գենետիկան և նրանց փոխհարաբերությունները ակտինոմիցետների հետ* 966
Մինդլին Ս. Զ., Գորլենկո Ժ. Մ. Hg^r-*պլազմիդների կոնյուգացիոն փոխանցման սիստեմը* Acinetobacter-*ի մոտ* 975
Կամենևա Ս. Վ., Տուբենկովսկի Ա. Ն., Պոյնովսկա Տ. Գ. *Գեների փոխանցման սիստեմի մշակումը* pAS 8—121 *պլազմիդի հիման վրա* Rhodopseudomonas sphaeroides-*ի մոտ* 979
Ֆիրուզյան Է. Ս. *Գեների տրանսպոզիցիան բակտերիաների և բույսերի բջիջներում* . 988
Բուկանով Ն. Օ., Յանչուկին Մ. Յու., Կարասին Ա. Ի., Տոլմաչև Օ. Ա., Ալիխանյան Ս. Ի., Յանկովսկի Ն. Կ. Erwinia chrysanthemi *պեկտատլիազայի գեների մոլեկուլյար կլոնավորումը* Escherichia coli *բջիջներում* 993
Հովսեփյան Ա. Ս., Կարապետով Ե. Գ. Bacillus thuringiensis-*ի շտամներով սինթեզված տոքսինների բնութագիրը* 998
Միրոնով Ա. Ս. *Ուրիդինֆոսֆորիլազայի գենի էքսպրեսիայի կարգավորումը* Escherichia coli-*ի մոտ* 1004
Քոչարյան Շ. Մ., Բեգլարյան Խ. Հ., Մելքումյան Մ. Ա., Հովհաննիսյան Ն. Ի., Քոչարյան Ա. Մ., Հակոբյան Ժ. Ի. Escherichia coli K-12-*ի երկրորդ պուրիննուկլեոզիդ-ֆոսֆորիլազայի գենետիկան և քիմիզմը* 1010
Կազանչյան Ս. Ջ. K-89 *շտամի* Salmonella derby *պլազմիդային ԴՆԹ-ների կառուցվածքա-ֆունկցիոնալ վարիաբիլությունը* 1015

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

Основан в 1946 году — Выходит 12 раз в год

Том XXXVIII, № 11 — ЕРЕВАН — Ноябрь, 1985 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные

Алиханян С. И. Роль генетики микроорганизмов в развитии актуальных проблем биологии 935

Сиканян В. А. Гетерологичная экспрессия бактериальных генов в прокариотах 944

Ломовская Н. Д., Мкртумян Н. М., Воейкова Т. А., Муравник Г. Л., Перова Е. В. Генетика актинофагов и их взаимоотношения с актиномицетами 966

Миндлин С. З., Горленко Ж. М. Система конъюгационного переноса Hg^r плазмид у Acinetobacter 975

Каменева С. В., Дубейковский А. Н., Поливцева Т. П. Разработка системы переноса генов на основе плазмиды pAS 8-121 у Rhodopseudomonas sphaeroides 979

Пирузян Э. С. Транспозиция генов в бактериальных и растительных клетках 988

Буканов Н. О., Фонштейн М. Ю., Карасин А. Н., Толмачев О. А., Алиханян С. И., Янковский Н. К. Молекулярное клонирование генов пектатлиазы Erwinia chrysanthemi в клетках Escherichia coli 993

Овсепян А. С., Карабеков Б. П. Характеристика тюрипинов, продуцируемых штаммами Bacillus thuringiensis 998

Миронов А. С. Регуляция экспрессии гена уридинфосфорилазы у Escherichia coli 1004

Кочарян Ш. М., Безирджян Х. О., Мелкумян М. А., Оганесян Н. А., Кочарян А. М., Акопян Ж. П. Генетика и биохимия второй пуриннуклеозидфосфорилазы Escherichia coli K-12 1010

Казанчян Л. Ф. Структурно-функциональная вариабельность плазмидных ДНК Salmonella derby штамма К-89 1016

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Founded in 1946 — 12 issues per year

Volume XXXVIII, № 11 — YEREVAN — November, 1985

CONTENTS

Experimental

Alikhanian S. I. Role of Genetics of Microorganisms in the Development of Actual Problems of Biology 935

Sakanyan V. A. Heterologous Expression of Bacterial Genes in Procaryotes . . 944

Lomovskaya N. D., Mkrtumian N. M., Vorykova T. A., Muravnik G. L., Perova E. V. Genetics of Actinophages and Their Relationships with Actinomycetes 965

Mindlin S. Z., Gorlenko G. M. System of Conjugation Transfer of the IncP Plasmids in *Acinetobacter sp.* 975

Kameneva S. V., Dubelkovski A. N., Politseva G. P. Gene Transfer System on the Base of Plasmid *pAS 8–121* in *Rhodopseudomonas Sphaeroides.* 979

Piruzian E. S. Transposition of Genes in Bacterial and Plant Cells. 988

Bukanov N. O., Fonshtein M. Yu., Karasin A. I., Tolmachov O. A., Alikhanian S. I., Yankovsky N. K. Molecular Cloning of Genes of Pectat Lyase *Erwinia chrysanthemi* in the Cells *Escherichia coli.* 993

Hovsepian A. S., Karabekov B. P. Characterization of Thuricins Produced by *Bacillus Thuringiensis* Strains. 998

Mironov A. S. Regulation of the Uridine Phosphorylase Gene Expression in *Escherichia coli* 1004

Kocharian Sh. M., Bezirdjian Kh. O., Melkumian M. A., Oganesian N. E., Kocharian A. M., Akopian J. I. Genetics and Biochemistry of the Second Purine Nucleoside Phosphorylase of *Escherichia coli K–12* 1010

Kazanchian A. F. Structural–Functional Variability of Plasmid DNA-s of *Salmonella derby* K–89 Strain. 1016

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

УДК 579.25

РОЛЬ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИИ

С. И. АЛИХАНЯН

Обобщены наиболее значительные результаты исследований в области генетики микроорганизмов, сыгравшие важную роль в развитии генной инженерии, молекулярной биологии эукариотов.

Ключевые слова: генная инженерия, генетика микроорганизмов.

С самого начала своего рождения генетика как наука, изучающая законы наследственности и изменчивости, т. е. закономерности всей живой материи, оказывала очень большое влияние на развитие многих, если не всех, биологических дисциплин. Можно согласиться с Бидлом, что «В известном смысле генетика выросла сиротой. Вначале ботаники и зоологи были к ней равнодушны, а иногда и враждебны. Нередко говорили: «Генетика имеет дело лишь с внешними признаками». В ее детстве ей мало внимания уделяли также и биохимики... Надо сказать, что и генетики стремились в основном заниматься механизмами передачи генетического материала от поколения к поколению... К счастью, сейчас ситуация сильно изменилась. Генетика занимает прочное место в современной биологии». Дальнейшее развитие ее все более непосредственно влияло на судьбы биологии, а последние 30 лет мы являемся свидетелями буквально революции в биологии, в значительной мере вызванной успехами генетики и главным образом генетики микроорганизмов. Использование микроорганизмов в качестве объектов генетического исследования не только обеспечило поднятие «классической» генетики на новую высшую ступень, но и послужило основой для создания молекулярной генетики. В настоящее время эти две дисциплины—генетика микроорганизмов и молекулярная генетика—развиваются в тесной связи друг с другом, взаимопроникновении и взаимодействии между собой. Именно их успехам мы обязаны выявлению молекулярных, физико-химических основ наследственности и изменчивости и использованию принципиально новых подходов при решении целого ряда фундаментальных проблем биологии, в особенности молекулярной биологии.

Целый ряд важных вопросов, открытых и разработанных генетикой микроорганизмов, стали кардинальными для биологии и эволюционного учения. Выяснение химической природы наследственного субстрата в опытах по трансформации микроорганизмов легло в основу расшифровки природы ядра клетки животных и растений; стал понятным основной скелет хромосомы, механизм ее дубликации. Познание молеку-

лярного механизма мутагенеза вскрыло интимные процессы влияния внешней среды на наследственный аппарат организмов и подтвердило автогенетические процессы, протекающие в живой клетке. Установление тонкой структуры гена на модели фага Т4 легло в основу понимания элементарной единицы жизни. Расшифровка генетического кода привела к универсальному закону определения первичной структуры живой материи. Открытие молекулярного механизма рекомбинации вскрыло целый ряд сложных процессов, протекающих в клетке. Частный метод составления генетических карт перерос в кардинальный вопрос изменчивости генома и ее роли в эволюционном процессе. Наконец, выявление физико-химической структуры ДНК, носителя генетической информации, ставшее возможным на основе учета основных генетических закономерностей, дало в руки всей биологии мощное орудие для познания буквально всех сторон деятельности живых структур, таких как нервная деятельность, гормональные процессы, работа мозга и памяти, канцерогенез и др.

Не меньшую роль сыграла современная генетика, и в особенности генетика микроорганизмов, в развитии сельскохозяйственной биологии. Так, мутагенное действие физических и химических факторов очень долго считалось «внутренним» делом генетики, признанным решать ее чисто теоретические вопросы. Генетика микроорганизмов перевернула эти представления. До этого никто не верил, что мутагены могут быть использованы для практических целей. Считалось, что они способны породить только уродов, и возможность их использования в селекции растений и животных отрицалась. Правда, наши крупные генетики растений А. А. Сапегин и Л. Л. Делоне были единственными из растениеводов, пытавшихся использовать рентгеновские лучи для селекции растений. Однако каких-либо заметных успехов они не достигли, и поэтому их пример не привлек внимания широких кругов селекционеров.

Впервые в селекционной практике индуцированный мутагенез сыграл решающую роль у микроорганизмов, главным образом у продуцентов антибиотиков, ферментов, витаминов и других продуктов микробиологического синтеза. Результаты, полученные при этом, были слишком впечатляющими и не могли остаться незамеченными.

Практически полученные с помощью мутагенов штаммы микроорганизмов в 100—200, а у некоторых продуцентов и в 300 раз превышают продуктивность исходных штаммов, выделенных из природы. Этот пример сыграл решающую роль в широком применении мутагенов в селекции растений.

Влияние фундаментальных исследований в области генетики микроорганизмов на решение больших биологических проблем наглядно видно на примере исследований биохимических мутаций у хлебной плесени N. crassa. Как известно, именно на этом объекте удалось обнаружить и сформулировать один из самых кардинальных принципов современной молекулярной генетики и молекулярной биологии «один ген—один фермент», уточненный в наши дни как «один ген—один полипептид». Исходя из этого принципа, были разработаны способы получения

штаммов микроорганизмов, продуцирующих большие количества нужных метаболитов путем нарушения биосинтеза на определенных этапах. Именно таким способом был получен штамм, синтезирующий L-лизин, как результат одной мутации, блокирующей синтез гомосерина в цепи превращений аспарагиновой кислоты. В результате дальнейших усовершенствований удалось вывести штамм, синтезирующий в 350—400 раз больше лизина, чем исходный штамм. Благодаря этому было создано крупнотоннажное производство лизина, широко применяемого в животноводстве.

В последнее время внимание как научной, так и широкой печати привлекла генная инженерия, в развитии которой решающую роль сыграла генетика микроорганизмов.

Трудно ответить на вопрос, с чего именно начиналась генная инженерия, зародившаяся в недрах молекулярной генетики и молекулярной биологии. По существу, это закономерный результат целого ряда достижений этих наук. Прежде всего следует подчеркнуть, что сама идея возможности клонирования генов зародилась под влиянием исследований, выполненных в 50-е годы, когда при изучении генетической трансдукции был продемонстрирован перенос фагами бактериальных генов. В те же 50-е годы было открыто явление ограничения (рестрикции) и модификации фаговой ДНК, контролируемое бактериальным хозяином. Впоследствии были обнаружены ферменты рестрикции, так называемые рестриктазы, использование которых легло в основу конструирования рекомбинантных молекул ДНК. Решающее значение имели также исследования, касающиеся ферментативных основ процесса генетической рекомбинации, разработка методов трансформации бактерий, изучение механизмов и регуляции экспрессии генов.

При изучении взаимодействия бактерий и фагов давно было замечено, что фаги, очень плохо размножающиеся на некоторых бактериальных штаммах, начинают размножаться с высокой эффективностью после одного пересева на новом хозяине. С развитием генетики бактериофагов представление об адаптационном механизме этого явления было отвергнуто и заменено принципом селективного отбора спонтанно возникших «более приспособленных» мутантов. Однако тщательное изучение такого «приспособления» фагов показало, что мутационная теория не подтверждается экспериментальными данными. Наблюдаемое явление, получившее наименование «ограничение и модификация», вначале удалось расшифровать чисто генетическими методами и подходами, после чего с помощью биохимических методов были выделены ферменты, рестриктазы и метилазы, ответственные за этот процесс. Суть явления ограничения и модификации заключается в том, что когда ДНК фага проникает в клетку невосприимчивого хозяина, она подвергается атаке рестрикционными ферментами нового штамма, и соответственно образование жизнеспособного потомства блокируется. Особенностью рестриктаз является их способность различать собственную и «чужую» ДНК, т. е. «узнавать» постороннюю ДНК и разрезать ее на фрагменты. С другой стороны, потомки редких фаговых частиц, избежавших действия рестриктазы вследствие метилирования своей

ДНК, в дальнейшем дают начало фагам, хорошо размножающимся на новом бактериальном хозяине. Но это свойство не наследуется в последующих поколениях, так как после одного цикла размножения в клетках первоначального хозяина приобретенный признак утрачивается.

В дальнейшем было обнаружено большое количество ферментов рестрикции различных типов, кодируемых как генами бактерий различных видов, так и геномом различных плазмид и фагов. По существу, в клетках каждого вида бактерий имеются гены, контролирующие образование «собственных» рестриктаз. Каждая из рестриктаз «узнает» специфическую последовательность из нескольких нуклеотидов, причем таких сайтов в одной молекуле ДНК может быть много. Так, например, по приблизительным подсчетам, в хромосоме E. coli содержится более 500 сайтов узнавания для рестриктазы EcoR1.

Значение рестриктаз в развитии генной инженерии создало те необходимые предпосылки для выделения отдельных генов из бактериальной хромосомы путем ее «нарезания» на небольшие фрагменты ДНК, которые легли в основу экспериментов по генной инженерии. Таким образом, генетическая расшифровка явления рестрикции в конечном итоге сыграла решающую роль в разработке не только технологии генной инженерии, но и в самом возникновении идеи молекулярного клонирования отдельных генов различных организмов.

Последующие задачи генноинженерного эксперимента—встраивание выделенного гена в самостоятельно реплицирующуюся молекулу ДНК и обеспечение экспрессии встроенных генов—также были решены на основе результатов фундаментальных исследований в области генетики микроорганизмов и молекулярной генетики. Решающее значение здесь имели достижения в изучении генетики плазмид—небольших ковалентно-замкнутых кольцевых молекул ДНК, обнаруженных в клетках бактерий различных систематических групп, где они выполняют самые разнообразные функции.

В природе встречаются различные плазмиды. Это и так называемые половые, колициногенные факторы, а также R-факторы, обнаруженные в годы наиболее активного применения в медицинской практике антибиотиков. R-факторы во многом сходны с F-фактором плодовитости, открытым у E. coli. Наиболее характерным для R-плазмид является наличие у них генов устойчивости к антибиотикам и сульфамидным препаратам, tra-оперона, контролирующего способность плазмид к переносу в другие бактериальные клетки с помощью конъюгации. Существенной особенностью плазмид является их способность к самостоятельной репликации. Описанные свойства плазмид были использованы при конструировании векторов для генноинженерных экспериментов. Зная местоположение сайтов узнавания для различных рестриктаз в ДНК плазмиды, можно в опытах in vitro «разрезать» плазмидную ДНК в определенном участке с тем, чтобы вставить в это место выделенный ген. Далее можно «закольцевать» полученную ДНК и тем или иным методом ввести ее в бактериальную клетку. Таким образом чужеродный ген вводится в избранную клетку и, если плазмида

многокопийная, размножается в ней, резко увеличивая дозу гена и соответственно количество кодируемого им продукта.

Своеобразным «клеем», с помощью которого сшивают концы фрагментов ДНК, служит специальный фермент полинуклеотид-лигаза.

Каким образом был открыт этот фермент?

Генетическая рекомбинация — важнейший биологический процесс, на основе которого разработан метод генетического картирования и разработана теория гена. Рекомбинация играет большую роль в определении генетических механизмов эволюционного процесса. Она тесно связана с мутационным процессом. Рядом исследований выявлены и те потенциальные возможности, которые заложены в рекомбинации для реализации таких явлений, как хромосомные перестройки (дупликации, делеции, транслокации и инверсии), регуляция выражения гена, неконтролируемый злокачественный рост и т. д. Иными словами, стала очевидной фундаментальная роль рекомбинации в эволюции.

Обширные исследования механизмов рекомбинации привели к обнаружению в 1967 году в клетках E. coli фермента, названного ДНК лигазой, способной сшивать одноцепочечные разрывы в ДНК. Лигаза, кодируемая геномом бактериофага Т4, синтезируется при его вегетативном внутриклеточном росте. Фермент фага Т4 отвечает за превращение составных молекул в ковалентно-связанные рекомбинантные молекулы в клетках, зараженных фагом. Образование рекомбинантных молекул под действием лигазы характерно и для широкого круга рекомбинационных явлений вообще. Так, рядом генетических экспериментов было показано, что синтез ДНК у мутантов E. coli, не имеющих лигазной активности, хотя и происходит, но приводит к накоплению фрагментов Оказаки, а заполнения пробелов и соединения фрагментов не происходит.

Таким образом, лигаза обеспечивает ряд процессов: сшивание рекомбинантных молекул, процесс репликации ДНК и репарации, при которой вслед за вырезанием поврежденных нуклеотидов и вставкой новых остатков должно происходить сшивание цепей ДНК. Функции лигазы в живой клетке, судя по поведению мутантов, совпадают с наблюдениями in vitro. Другими словами, лигаза необходима для нормальной репликации хромосом и поддержания жизнеспособности клеток.

Эти три элемента — рестриктазы, плазмиды и лигаза — определяют положение, что генная инженерия «покоится на трех китах»: нарезание ДНК на фрагменты с помощью рестриктаз, использование плазмидной ДНК в качестве вектора и процесс «сшивания» ДНК в целую молекулу посредством лигазы.

Каким образом в генной инженерии происходит селекция продуктов «склеивания»? Обнаружить плазмиду, в которую встроен чужеродный ген, можно генетическими методами, например, на основе хорошо разработанного принципа генетической комплементации, суть которого сводится к тому, что в реципиентный штамм, мутантный по определенному гену, вводится гетерологичный ген, и если он комплементирует мутацию, то рекомбинантный клон отбирается по восстановлению фенотипа.

В настоящее время разработаны и другие генетические и биохимические приемы, позволяющие легко отбирать нужный рекомбинантный клон.

Большую роль в развитии генетики микроорганизмов сыграло открытие так называемых подвижных генов.

Еще в 40-е годы в опытах на кукурузе Барбара Мак Клинток обнаружила, что некоторые гены, вернее генетические элементы, перемещаются с одного места хромосомы на другое. Природа этих подвижных элементов почти 30 лет оставалась загадочной, и исследования в этом направлении практически не развивались. Затем подвижные генетические элементы были открыты у микроорганизмов и было не только показано их широкое распространение у различных групп бактерий, в частности в составе плазмид, но и доказана их причастность к явлению множественной лекарственной устойчивости, вызванной применением антибиотикотерапии. Когда же были разработаны методы клонирования генов и стало возможным изучение их тонкой структуры, природу «подвижных» генов удалось расшифровать. Как теперь известно, их особенностью является наличие на концах сегмента ДНК, в котором расположен «подвижный» ген, коротких повторяющихся последовательностей. В составе подвижных элементов бактерий, так называемых транспозонов, и IS-элементов обнаружены детерминанты, контролирующие синтез специфических белков—транспозаз, ответственных за перемещение. История «подвижных» генов не закончилась их открытием у бактерий. Несколько лет назад они были повторно обнаружены у высших организмов, на этот раз у дрозофилы. В хромосомах дрозофилы «подвижные» гены представлены большим количеством копий, причем местоположение их строго не фиксировано, так как они обнаруживаются в самых разных местах хромосомы. При изучении локализации этих генов у разных особей одного и того же вида дрозофилы неожиданно оказалось, что у каждой линии дрозофилы их расположение не одинаково. Такая нестабильная, варьирующая локализация принципиально отличалась от локализации других генов, положение которых строго фиксировано в хромосомах. Эти гены были названы мобильными диспергированными генетическими элементами—мдг.

Находясь в разных участках хромосомы, мдг окружены разными генами. По своей структуре они напоминают транспозоны бактерий и имеют на своих концах небольшие повторы порядка 250—350 нуклеотидных последовательностей. Перемещение мдг наблюдать очень трудно. Однако удалось обнаружить, что они влияют на работу генов, рядом с которыми располагаются. Исчезновение мдг, вызывающее фенотипический эффект, встречается у одной из 10000 мух. В некоторых случаях удается обнаружить мдг на новом месте или даже в другой хромосоме.

Каковы природа и значение подвижных генов? Считают, что мдг очень сходны по своему поведению с эндогенными ретровирусами, копии которых в определенных условиях стабильно внедряются в ДНК животных.

Как известно, ретровирусы содержат РНК. После их проникновения в клетку по схеме обратной транскрипции сначала синтезируется ДНК, которая встраивается в генетический аппарат клетки, а затем, как на обычном гене, синтезируется вирусная РНК и образуются вирусы, которые не убивают клетку. Многие из ретровирусов в ходе эволюции утратили способность к синтезу зрелых вирусных частиц. Такие стабильно внедренные в ДНК животных копии и называются эндогенными ретровирусами. При перемещении ретровирус может захватить отдельные гены клетки, которые в результате этого выходят из-под контроля регуляторного механизма клетки. Если оказывается захваченным ген, имеющий отношение к регуляции роста и размножения, то такие клетки превращаются в опухолевые. Следовательно, ретровирус, захвативший подобный ген, становится онкогенным. Геном ретровируса можно рассматривать как частный случай мдг, так как при своих перемещениях он может оказаться поблизости от генов, контролирующих важные клеточные процессы. Считают, что мдг, беря под контроль самые разнообразные гены, могут тем самым контролировать многие индивидуальные различия между особями одного вида. Трудно сказать, каково происхождение мдг. Может быть, первоначально они произошли от вирусов, возможно, наоборот, ретровирусы возникли из мдг. Как бы то ни было эти элементы обладают определенной автономией и, не выполняя какой-либо полезной функции, могут влиять на работу генома. Подвижные генетические элементы в настоящее обнаружены в клетках дрожжей, в геноме мышей. Можно допустить, что подобные нестабильные гены имеются у всех живых существ. Стало быть, исследования по генетике микроорганизмов не только привели к открытию нового класса генов, но и произвели значительные изменения в традиционных представлениях о стабильности генов и организации генома.

В последнее время благодаря использованию методов генной инженерии вскрыты и другие, не менее важные закономерности структурной организации генома высших организмов. Наиболее принципиальными следует считать открытие семейства множественных генов, выполняющих жизненно важные функции, и установление сложного строения генетических локусов. Помимо генов дрозофилы и мыши, и эти исследования в последние годы активно вовлечены и гены человека, причем показано принципиальное сходство в структуре генома животных, находящихся на различных уровнях организации. Теперь уже описано около сотни семейств множественных генов, каждое из которых включает от нескольких копий до нескольких десятков и сотен сходных генов. Среди них—гены, синтезирующие рибосомные белки, гены гистонов, глобинов, гены, синтезирующие интерферон, гены иммуноглобулинов. Некоторые из них собраны кластерами, другие—разбросаны по геному. Блестящие исследования выполнены, в частности, на генах иммуноглобулинов. Показано, что образованию как легких, так и тяжелых цепей иммуноглобулинов предшествует перемещение и последующее соединение посредством рекомбинации генов, кодирующих различные части цепи иммуноглобулина. В результате этих исследований стало ясно,

каким образом на основе ограниченного числа генов обеспечивается безграничное разнообразие антител, синтезирующихся в организме.

Принципиально новые представления о структуре генетических локусов у эукариот, объясняющие причины избыточности их ДНК, также могли быть сформулированы только благодаря применению генно-инженерных методов.

В течение многих лет существовала концепция коллинеарности ДНК и белка у прокариот. Этот принцип был продемонстрирован при исследовании гена триптофансинтетазы у E. coli. Было показано, что расположение ряда мутаций на карте гена триптофансинтетазы полностью сопряжено с местоположением в белке замещенных аминокислот, вызванных этими мутациями. На этом основании был установлен закон коллинеарности, т. е. соответствия расположения нуклеотидов в молекуле ДНК с расположением аминокислот в белке. Следовательно, число и расстояние между аминокислотами в белке полностью соответствовали числу нуклеотидных пар в молекуле ДНК. Открытие этого принципа в значительной степени способствовало обоснованию идеи генетического кода. С другой стороны, давно уже было установлено, что характерной особенностью хромосомы эукариот является избыточное количество ДНК. Если в ДНК записана генетическая информация клетки, то, казалось бы, ее должно быть ровно столько, сколько нужно для этой цели. Так и оказалось у бактерий и фагов. У эукариот же ДНК оказалось намного больше, чем это необходимо для кодирования всех образующихся продуктов. И только в последние годы удалось обнаружить, что очень многие гены эукариот мозаичны и состоят из интронов и экзонов. Интроны обычно представляют собой внутренние, нетранслируемые участки гена, а экзоны соответствуют значащим транслируемым участкам, кодирующим синтез полипептидов.

Так, например, у мыши ген гидрофолат-редуктазы, насчитывающий около 32000 нуклеотидных пар, содержит пять интронов и только 568 кодирующих пар нуклеотидов. У курицы ген, кодирующий белок овальбумин длиной в 386 аминокислот, имеет размер в 7000 нуклеотидных пар и включает 7 разных интронов длиной более 5000 нуклеотидных пар. Механизм и причинные связи этого явления до сих пор не вскрыты, хотя и высказываются предположения о регуляторной функции интронов.

Большое место в работах по экспериментальному мутагенезу занимали и продолжают занимать попытки решить проблему специфического мутагенеза. Эти работы выполняются в двух направлениях. С одной стороны, подыскиваются мутагены, дающие специфические спектры мутаций, с другой — исследуется влияние стадии развития или физиологического состояния организма на спектр возникающих мутаций. Некоторые результаты создавали видимость приближения к положительному решению этой проблемы. Так, например, было показано, что частота возникновения мутаций в некоторых генах дрожжей резко варьирует. Тщательное изучение этих результатов показало, что разница в частоте мутаций зависит от относительных размеров генов. С другой стороны, было показано, что у актиномицетов частота плюс- и минус-

мутаций по антибиотикообразованию зависит от дозы применяемого мутагена. Однако подробные исследования показали, что на самом деле специфический эффект в этом случае не имеет места. Просто при высоких дозах возникает большее число мутаций, нарушающих нормальные физиологические корреляции и тем самым влияющих на процесс антибиотикообразования, тогда как умеренные дозы обеспечивают нормальную жизнеспособность клетки и тем самым не препятствуют биосинтезу антибиотика. Таким образом, видимый специфизм не имел никакого отношения к направленному изменению генетического материала.

Даже использование специфических соединений в виде различных аналогов азотистых оснований, как, например, 5-бромурацил или этаминопурин, или азотистой кислоты не приблизило нас к решению проблемы специфичности мутагенеза, хотя эти мутагены и вызывают определенные замены пар оснований.

Наиболее близким к решению проблемы специфичности мутагенеза явилось использование нитрозогуанидина. Было показано, что этот мутаген вызывает мутации преимущественно в зоне репликативной вилки. В силу этого, зная продолжительность репликации всей молекулы ДНК у бактерий и обрабатывая нитрозогуанидином синхронизированные клетки в определенный момент репликации в соответствии с местом локализации гена для какого-либо селектируемого признака, можно преимущественно получать мутации в заданных генах, расположенных поблизости от селектируемого.

Однако и этот метод не позволял подвергать обработке мутагеном определенный ген. Все больше и больше становилось ясным, что монотонный характер структуры ДНК, состоящей всего из четырех нуклеотидов, исключает возможность направленной химической модификации нужной последовательности в нужном гене, ибо если для данного вида характерно определенное соотношение АТ и ГЦ пар, то оно большей частью характерно и для большинства генов этого вида. Поэтому один и тот же мутаген более или менее с одинаковой частотой должен вызывать мутации во всех генах данной хромосомы.

Только после разработки методов клонирования генов решение проблемы специфичности мутагенеза, т. е. получения направленных мутаций или, иначе говоря, получения мутаций по определенному гену, стало реальным. Возникло новое направление в индуцированном мутагенезе—локализованный мутагенез.

Среди методов локализованного мутагенеза большое место занимает конструирование специализированных трансдуцирующих лямбдоидных фагов, в которые вводятся любые участки хромосомы бактерии, содержащие от одного до десятка генов. Такие фаги, несущие нужные гены, после обработки мутагеном вводятся в бактериальные клетки и обеспечивают появление до 50% мутантов в результате включения измененного гена в гомологичный участок хромосомы.

Другой, еще более тонкий метод предполагает использование рестрикционных фрагментов ДНК, что позволяет получать индивидуальные гены и даже их фрагменты и затем обрабатывать их мутагеном.

Измененные фрагменты гена, введенные в клетку в составе плазмид, как и в случае с трансдуцирующими фагами, способны рекомбинировать с гомологичными участками бактериальной хромосомы, благодаря чему достигается включение измененного фрагмента в бактериальный геном.

Приведенные примеры свидетельствуют о том, что многие важные направления в современной биологии не могли возникнуть, если бы не генетические исследования микроорганизмов.

ВНИИГенетика, Москва

Поступила 11.XI 1984 г.

ՄԻԿՐՈՕՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱՅԻ ԴԵՐԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏՈՒԱԼ ՊՐՈԲԼԵՄՆԵՐԻ ՉԱՐԳԱՑՄԱՆ ՄԵՋ

Ս. Ի. ԱԼԻԽԱՆՅԱՆ

Հոդվածում ամփոփված են միկրոօրգանիզմների գենետիկայի բնագավառում կատարված ուսումնասիրությունների առավել նշանակալից արդյունքները, որոնք կարևոր դեր են խաղում գենային ինժեներիայի, էուկարիոտների մոլեկուլյար կենսաբանության մեջ։

ROLE GENETICS OF MICROORGANISMS IN THE DEVELOPMENT OF ACTUAL PROBLEMS OF BICLOGY

S. I. ALIKHANIAN

The significant results of investigations in the sphere of genetics of microorganims playing an important role in the development of gene engineering, molecular biology of eucaryotes are summed up.

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

УДК 575.1:576.851.48

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ В ПРОКАРИОТАХ

В. А. САКАНЯН

Рассматриваются факторы, препятствующие экспрессии гетерологичных генов бактерий в прокариотных системах на стадиях транскрипции и трансляции. Особое внимание уделено сравнительной организации транскрипционных и трансляционных сигналов различных бактерий. Обсуждаются также пути преодоления биологических барьеров для достижения экспрессии гетерологичных генов.

Ключевые слова: генная инженерия, экспрессия генов, транскрипция, трансляция.

Проблема гетерологичной экспрессии бактериальных генов остро стоит при генноинженерном конструировании штаммов-продуцентов биологически активных веществ. Интерес к ней особенно возрос в связи с привлечением в сферу биотехнологии представителей рода Bacillus, имеющих ряд преимуществ перед другими микроорганизмами. Показано, что экспрессия генов грамотрицательной природы невозможна в клетках бацилл [16, 34, 47, 76, 96]. В то же время хорошо документирована возможность экспрессии генов грамположительной природы в клетках грамотрицательных бактерий [25, 33, 35, 95, 105]. Асимметричный характер экспрессии генов в разных микроорганизмах предполагает фундаментальные различия в каких-то внутриклеточных процессах, выступающих в роли биологических барьеров экспрессии генов. Априори можно допустить, что эти барьеры обусловлены разными уровнями реализации генетической информации: транскрипцией, трансляцией, посттрансляционной модификацией синтезируемых продуктов, стабильностью промежуточных (мРНК и преполипептидов) и конечных продуктов (РНК и белков). Очевидно, для функциональной экспрессии гена наиболее важно соответствие транскрипционных сигналов гетерологичной ДНК и/или трансляционных сигналов гетерологичной мРНК с компонентами транскрипционного и трансляционного аппаратов нового хозяина, обеспечивающих узнавание этих сигналов.

Настоящий обзор посвящен освещению факторов, определяющих или потенциально могущих влиять на экспрессию гетерологичных генов бактерий в прокариотных системах на стадиях транскрипции и трансляции. Литературные данные преимущественно касаются двух неродственных родов— Enterobacteria и Bacillus, представляющих два разных типа бактерий, окрашиваемых по Граму. Известно, что разделение бактерий на грамотрицательные и грамположительные отражает фундаментальные различия клеток в отношении архитектуры и химии их клеточной стенки [13]. Как будет показано в дальнейшем, этот таксономический критерий в какой-то степени может отражать различия и в таких важных процессах, как транскрипция и трансляция. Вопросам гетерологичной экспрессии генов посвящены и другие обзоры [1, 2, 34].

РНК-полимеразы. ДНК-зависимая РНК-полимераза представляет собой многосубъединичный фермент, который может состоять из двух активных форм—холофермента $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ и корфермента $\alpha_2\beta\beta'$, которые в дальнейшем будут обозначаться как $E\sigma$ и E соответственно. Наиболее подробно фермент изучен у E. coli. Функциональная активность между субъединицами РНК-полимеразы распределяется следующим образом. Субъединица β содержит каталитический сайт синтеза РНК и связующие сайты для субстратов и образующихся продуктов; β′ обеспечивает связывание матрицы; α собирает эти большие субъединицы в корфермент, а σ позволяет образующемуся холоферменту узнавать промоторные участки ДНК и инициировать правильный и эффективный синтез РНК. Однако следует иметь в виду, что такое распределение функций между субъединицами в определенной степени условно и между ними имеется более интимная взаимосвязь [79, 106, 110].

Сборка РНК-полимеразы идет по стадиям $2\alpha \rightarrow \alpha_2$; $\alpha_2 + \beta \rightarrow \alpha_2\beta$; $\alpha_2\beta + \beta' \rightarrow \alpha_2\beta\beta'$; $\alpha_2\beta\beta' + \sigma \rightarrow \alpha_2\beta\beta'\sigma$. Присоединение σ-субъединицы к корферменту существенно не меняет его общей пространственной структуры, которая имеет важное значение в узнавании промотора [66]. При высокой ионной силе $E\sigma$, представленный в виде мономера, эффективно транскрибирует многие матричные ДНК. При низкой ионной силе молекулы полимеразы агрегируют в димеры, которые способствуют инициации транскрипции с промоторов, направляющих синтез стабильных РНК [140]. Следовательно, эффективность экспрессии конкретных генов по крайней мере в условиях in vitro может зависеть от кратности молекулы РНК-полимеразы, считывающей матрицу.

РНК-полимеразы филогенетически далеких от E. coli бактерий имеют идентичную структурную организацию [3]. Однако РНК-полимераза бактерий рода Bacillus характеризуется рядом отличий, основным из которых с позиций настоящего обзора является наличие множества σ-подобных факторов, обозначаемых σ^x, где «x» означает молекулярный вес полипептида или соответствующий ему ген. Основным σ-фактором у B. subtilis является σ^{55} [123]. Кроме него обнаружены еще четыре минорных σ-подобных фактора— σ^{28} [148], σ^{29} [51], σ^{32} [68], σ^{37} [50], кодируемые хромосомой B. subtilis, два σ-подобных фактора— $\sigma^{29,28}$ [137], $\sigma^{29,33-34}$ [38], кодируемые фагом SP01, а также другие ассоциированные с корферментом факторы —δ [111], ω [32] и P [39].

Анализ пептидных карт минорных σ-подобных факторов σ^{37}, σ^{29} и полипептидов P^{23}, P^{34} и δ показал, что они не являются продуктами протеолитической деградации основного σ^{55}-фактора [152]. Более того, все эти факторы не имеют иммунологического сродства с σ^{55}. В противоположность этому между основными σ-субъединицами РНК-полимераз B. subtilis и E. coli имеется значительная структурная гомология, что свидетельствует о консервативности определенных доменов этих субъединиц у эволюционно далеко отстоящих бактерий.

Ген, кодирующий $\sigma^{29,28}$, удалось отклонировать и изучить детально [26]. Оказалось, что в кодирующей последовательности гена не имеется какой-либо гомологии с геном rpoD, кодирующим σ-субъединицу РНК-полимеразы E. coli.

Соотношение холоферментов, содержащих какой-либо из σ-факторов, определяется физиологическим состоянием клетки. В спорулирующих клетках минорные формы могут составлять до 20% общей ферментативной активности, тогда как в вегетативных клетках только 1—5% [30]. В вегетативных клетках присутствуют холоферменты, содержащие σ^{55}, σ^{29}, σ^{32} и σ^{37}, на ранних стадиях споруляции клеток—σ^{55} и σ^{37}, а на более поздних стадиях—σ^{29} и σ^{32} [92]. При ухудшении условий питания (недостатке углерода, азота и пр.) клетки B. subtilis вступают на путь развития эндоспоры (спорогенез представляет собой простую форму клеточной дифференциации). Этот процесс состоит из пяти этапов с вовлечением соответствующих им классов генов. Начинается споруляция с функций регуляторных spoO генов. При инициации спорогенеза совместно с продуктами spoO генов участвуют σ^{37} и

σ^{32}-факторы [156]. Возможно, продукты генов spoO, связываясь с промоторами гена spoVG, которые узнаются σ^{37} и σ^{32}-факторами, способствуют синтезу спорулляционно-специфичной РНК [12]. По прошествии ~1 часа σ^{55} и σ^{37} заменяются в холоферменте на σ^{29} [51], индукция которого является специфичным для споруляции актом, так как эта замена находится под контролем spoO генов. Таким образом, при споруляции наблюдается каскадный характер проявления ферментативной активности РНК-полимеразы [92].

Другой аналогичный пример связан с развитием фага SPO1 в клетках B. subtilis. Показано, что ранние гены фага транскрибируются с помощью σ^{55}, средние гены включаются под действием $\sigma^{gp\,28}$, а в середине литического цикла $\sigma^{gp\,33-34}$ запускает поздние гены [92].

Возможно, гетерогенность РНК-полимераз является общим свойством бактерий рода Bacillus. Во всяком случае, в спорулирующих клетках B. thuringiensis обнаружены две новые формы Eσ, отличающиеся по субъединичному составу и некоторым каталитическим свойствам от фермента, выделенного из вегетативных клеток [72].

Так как σ-подобные белки ассоциированы с одним и тем же коферментом, то при каскадной регуляции экспрессии генов разными РНК-полимеразами должен существовать механизм, обеспечивающий замену σ-факторов. Этот до конца невыясненный механизм может осуществляться либо путем конкурентных взаимодействий самих σ-подобных полипептидов, либо благодаря функционированию дополнительного фактора.

При анализе образцов транскриптов, промотированных с ранних и средних генов фага SPO1, установлено, что связывание σ^{55} и $\sigma^{gp\,28}$ с E взаимоисключаемо [22]. Скорость связывания σ^{55} и $\sigma^{gp\,28}$-субъединиц с соответствующими промоторами зависит от температуры и ионной силы. Изменение ионной силы влияет и на конкурентное связывание этих субъединиц со своими промоторами. При общей ионной силе <0.2 М кинетика связывания σ^{55} преобладает над таковой для $\sigma^{gp\,28}$, при ионной силе>0,2 М—наоборот. Хотя и с невысокой скоростью, $\sigma^{gp\,28}$ способен переводить $E\sigma^{55}$ в форму $E\sigma^{gp\,28}$, и такая направленность реакции превалирует над переходом $E\sigma^{gp\,28}$ в форму $E\sigma^{55}$. В условиях формирования «открытых» комплексов с ранними промоторами фаговой ДНК переход $E\sigma^{55}$ в форму $E\sigma^{gp\,28}$ ингибируется [22].

В спорулирующих клетках B. subtilis к тому же обнаружен некий фактор, способствующий диссоциации σ^{55} и σ^{37} от холофермента [50]. При этом не происходит необратимой инактивации σ^{55}-фактора, так как он может быть восстановлен в активную форму экстрактом из спорулирующих бактерий. Диссоциация σ^{55} от холофермента предотвращается мутациями в некоторых spoO регуляторных генах, что говорит о контроле синтеза этого фактора со стороны спорулляционного аппарата клетки [92].

Из клеток, инфицированных фагом SPO1 [111] или SP82 [83], выделен так называемый δ-фактор, представляющий собой полипептид с молекулярным весом 21.000 [111]. Этот полипептид при очистке ин-

когда не находится в ассоциации с каким-либо из σ-факторов [30]. Влияние δ-фактора на транскрипцию зависит от соотношения фермента и ДНК и использованной матрицы. Фактор δ уменьшает неспецифическую транскрипцию с концов рестрикционных фрагментов [30], присутствие его в реакционной смеси приводит к синтезу специфических транскриптов фаговой ДНК [8] и повышает скорость диссоциации полимеразы от неспецифических комплексов с фаговой ДНК [127]. Несмотря на то, что δ-фактор не связывается с ДНК [80], он может вытеснять σ^{70} из холофермента и образовывать комплекс Eδ, который не обладает ферментативной активностью [151]. Эти данные указывают на то, что δ-фактор функционирует до стадии инициации транскрипции. Наиболее реальным представляется, что δ фактор уменьшает неспецифическое связывание РНК-полимеразы путем диссоциации фермента от непромоторных сайтов (эту функцию у E. coli выполняет преимущественно σ-субъединица). Предположение, что δ-фактор может способствовать физиологическому переходу одного типа холофермента в другой при каскадной регуляции экспрессии генов, не подтвердилось [22].

Корреляция между появлением σ-подобных регуляторных полипептидов и стадией споруляции или развития вириона хорошо согласуется с данными о различной промоторной специфичности этих полипептидов.

Промоторы. На рис. показана последовательность усредненного промотора E. coli. В этой структуре можно выделить следующие особенности: асимметрия последовательности, что отражает первичную

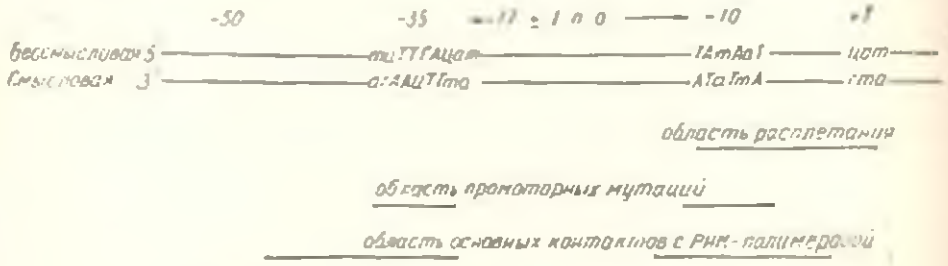


Рис. Структура усредненного промотора, узнаваемого РНК-полимеразой E. coli.

функцию промотора — инициацию мРНК в правильном направлении и со смысловой нити матричной ДНК [143]; наличие двух консервативных участков —10 и —35 [112, 115]; наличие спейсерной последовательности между участками длиной 17 ± 1 пар оснований (п. о.) [55, 113].

Из результатов генетических, биохимических и физических исследований следует, что в функциональном отношении наиболее важными в промоторе являются —10 и —35 участки [55, 113, 143]. Сила промотора определяется как скоростью формирования и стабильностью «открытого» комплекса полимеразы с промотором, так и скоростью инициации транскрипции. Поскольку эти характеристики во многом зависят от структуры промотора, то по крайней мере три его параметра — после-

довательности —10 и —35 участков [29, 113, 133] и длина спейсера между ними [113, 114]—могут влиять на силу промотора.

Мутации, уменьшающие гомологию консервативных участков относительно усредненных последовательностей, снижают силу промотора [55, 113]. При этом взаимные замены Г-Ц на А-Т в различных позициях консервативных участков существенным образом не отражаются на силе промотора [145]. Однако близость структур —10 и —35 участков к последовательностям усредненного промотора еще не гарантирует высокой активности промотора [70]. Возможно, отклонения от усредненных консервативных участков у «нетипичных» промоторов компенсируются какими-то особенностями последовательности неконсервативных участков промотора.

У природных промоторов длина спейсера колеблется от 15 до 20 п. о. Но в 100 из 112-ти исследованных случаев она равна 16—18 п. о. [55]. Изменение длины спейсера в любую сторону уменьшает активность промотора [9, 114].

РНК-полимераза E. coli более или менее плотно покрывает участок ДНК длиной ~70 п. о. (от —50 до +20 позиций), и фермент больше контактирует с —10 и —35 участками смысловой нити [6, 109, 117, 124, 125]. Связывание полимеразы с более протяженным участком, чем длина —10, —35 и спейсера вместе взятых, свидетельствует о существовании дополнительных последовательностей, функционально важных при взаимодействии с ферментом. Одним из таких участков может быть район стартовой точки транскрипции, который также характеризуется относительной консервативностью [116]. Кроме того, в сильных промоторах фагов E. coli обнаружены еще три консервативных участка: —43 с последовательностью ААА, +1 с последовательностью ЦАТА и +7 с последовательностью ТТГА. Район ДНК, расположенный между —50 и —25 позициями, характеризуется к тому же высоким содержанием АТ пар [18].

Хотя число секвенированных промоторов грамположительных бактерий невелико, общая картина их организации вырисовывается довольно четко. В табл. 1 представлены последовательности промоторных районов ДНК различных грамположительных бактерий, анализ которых позволяет сделать ряд заключений.

Промоторы грамположительных бактерий также имеют консервативные —10 и —35 участки. Функциональная важность этих участков подтверждена экспериментально [100, 101, 138].

Последовательности консервативных участков, специфичные для четырех исследованных σ-субъединиц РНК-полимеразы B. subtilis, гомологичны внутри своей группы, но отличаются друг от друга. Если в —10 участке промоторов, специфичных для σ^{55}, σ^{37} (возможно и σ^{29}) и $\sigma^{gp\ 28}$, еще есть намек на консервативность некоторых нуклеотидов (например, «инвариантный» Т в шестой позиции при совмещении последовательностей), то в —35 участке вообще не наблюдается какого-либо консерватизма. Из этого правила условно можно выделить два исключения: отсутствие типичного —35 участка в промоторе гена spoVC,

Таблица 1

Последовательности промоторов грамположительных бактерий

Источник	Последовательности	Экспрессия в системе E. coli		Ссылки
		in vitro	in vivo	
1	2	3	4	5
Ранние гены фагов B. s.	специфичные для σ^{55} фактора			
SP01—26	АААГТТГТТГАЦТТТАТЦТАЦААГГТГТГГЦАТААТААТЦТТААЦ	+		[85]
SP01—15	АААГГТАТТГАЦТТТЦЦЦТАЦАГГГТГТГТААТААТТТААТТАЦА			[84]
φ29—G3b	ААААГТГТТГААААТТГТЦГААЦАГГГТГАТАТААТААААГАГТА	+		[104, 28]
φ29—G2	ААААГГГТАГАЦАААЦТАТЦГТТТААЦАТГТТАТАЦТАТААТАГА	+		[104, 28]
φ29—A1	ГТААТГТТТГАЦААЦТАТТАЦАГАГТАТГЦТАТААТГГТАГТАТЦ	+		[104, 28]
SP82—32	АТАТТГАТТГАЦТГЦТГЦЦАЦЦААГТГТГЦААТААТГАТАГТААЦ			[149]
Хромосомные гены				
B. s. veg	АТТТТАТТТГАЦАААААТГГГЦТЦГТГТТГТАЦААТАААТГТАГТ	+		[102]
B. s. tms	АГТЦТЦЦГТТГАААТЦАГААГАТАТТТАГГАТАТАТТТТТЦТАТГГ	+		[102]
B. s. spoOH	ГАТТАГГТТГАЦГЦЦТТТТТТГТЦЦАТТАЦТГТАТААТАТТТЦАТЦ			[102]
B. s. spoOF	АТТЦТГГТТТГАГТТТТЦЦТАГГГЦЦТТГААТТАТААТАГТЦТАЦТГ			[121]
B. s. β-глюканаза	ЦАТТАТТТТГАЦЦГАТГГТЦЦЦГТГГАААГААТЦАТГТААГАТЦ		+	[103, 20]
B. l. pen	ААААЦГГТТГЦАТТТАААТЦГГАЦАГАТГТААТАЦТТТЦАААГАЦ		+	[78, 81]
B. t. ? (pBT10)	АТТААГТТТГААЦААТТГГГАААААГАТТАТАТТГАТГЦАЦГТТТ	+	+	[5]
S. a. spa	АТАГАТТТТТАГТАТТГЦААТАЦАТААТТЦГТТАТАТТАТГАТГАЦ		+	[91]

1	2	3	4	5
Плазмидные гены				
S. a. ermC	ЦАТЦАТГТТЦАГАТТТАТЦАГАГЦГЦГТГЦТАТААТТАТАЦТААТ		+	[49, 53]
S. a. cat	АГТААТАТТГАЦТТТТАААААААГГАТТГАТТЦТААТГААГАААГЦ		+	[61, 46]
S. s. mls	ГТГТТГАТАГТГЦАТТАТЦТТАААТГТТГТАГААТАГГААТТГА		+	[62, 94]
Ген tox фага C. d.	ААГГТЦАТГГАГТТЦАГАГЦАЦЦЦТТАТААТТАГГАТАГЦТГТАТ	+	+	[69, 87, 88, 141]
	усредненный σ^{55} специфичный промотор			
	Aa^{a}_{t}—TTГАц$^{aa}_{tt}$tt—т ——— татггТАТААТа$^{aa}_{tt}$а—$^{a}_{t}$а—			
	специфичные для σ^{37} фактора			
spoVG	ААЦГАГЦАГГАТТТЦАГААААААТЦГТГТААТТГАТАЦАЦТААТ			[101]
spoVG	ТТЦЦАГААААААТЦГТГТААТТГАТАЦАЦТААТГЦТТТТАТАТАТ			[101]
spoVC	ТТЦЦАГГТТТАААТЦЦТТАТЦГТТАТГТТАГТГТТТГТААТАЦТ			[100]
	специфичные для σ^{28} фактора			
? (pMG102)	ЦАГААГЦТАААЦГАТЦЦГГТГТТТАТГЦЦГАТАТААТЦАЦТАГАА			[40]
? (pMG201)	АТГТЦЦЦТАААГТТЦЦГТГЦАЦЦАААААЦЦЦАТАТТААЦЦАТАГАЦ			[40]
	специфичные для gp^{28} фактора			
Средние гены фага SP01	ЦЦАТЦАГГАГАТТАГТТЦААГГАЦЦЦЦГТТТАТТТЦТТЦЦААТТ			[138]
	ТАГГАГГАГААААЦТТТТГАГГГТТАГТТТТТТТЦТТЦЦААЦА			[84]
	ТТАТААГГТГААГАГТТЦТЦЦАЦГЦАГАЦТТТТЦТТТТГГТАААГ			[84]
	ГЦЦГТАТГАГАААГАЦТААААААТГГТГАТГТТТТТТТТТАТ			[84]
	ТАЦТТАГГАГАЦААТТТТТГГЦТЦТГАГАТТТТАТТТАЦААТГАА			[138]
	АГТАЦАГГАГААААААЦАТАААЦАГАГААТТТГТТТТАТТТГАГА			[120]

Условные сокращения: B. s.— Bacillus subtilis, B. l.— Bacillus licheniformis, B. t.— Bacillus thuringiensis, S. a.— Staphylococcus aureus, S. s.— Streptococcus sanguis, C. d.— Corynebacterium diphteriae. Подчеркнуты консервативные −35 и −10 участки и нуклеотиды, с которых начинается транскрипция. В усредненном для σ^{55} — фактора промоторе учитывалась вариабельность длины спейсера между −35 и −10 участками; прописными буквами обозначены основания, частота встречаемости которых более 70%, строчными — более 40%.

узнаваемого σ^{37}-фактором [101], и отсутствие типичного —10 участка в структуре σ^{32}-специфичных промоторов [68].

Только —10 и —35 участки, узнаваемые σ^{55}-фактором B. subtilis, гомологичны консервативным участкам промоторов E. coli. Более того, матричная ДНК из B. subtilis, содержащая σ^{55}-специфичный промотор, эффективно транскрибируется РНК-полимеразой E. coli [85]. И наоборот, промоторы E. coli могут утилизироваться σ^{55}-фактором B. subtilis [28, 67]. Основные σ-субъединицы E. coli и B. subtilis при замене своих коферментов сохраняют специфичность узнавания промоторов [7, 123]. Гены, транскрибируемые с σ^{55}-специфичных промоторов, функционально экспрессируются в клетках E. coli (табл. 1). В отношении промоторов, специфичных для минорных σ-субъединиц, слабая экспрессия в E. coli недавно показана только для σ^{3}-специфичного промотора [153]. Эти данные и факт большого сродства σ^{55} B. subtilis и σ-субъединицы E. coli позволяют констатировать, что эти компоненты РНК-полимеразы неродственных бактерий по своей структуре, функциям и промоторной специфичности во многом идентичны.

В исследованных случаях инициирующий транскрипцию нуклеотид, как и у E. coli, располагается на расстоянии 6—9 п. о. от —10 участка. Наиболее часто инициирующим нуклеотидом является пурин [102]. Непосредственно +1 позиции (безотносительно от того, что она является сайтом инициации транскрипции, так как в половине случаев истинный сайт не определялся) предшествует А или Т. Район между —12 и +1 позициями также богат АТ-основаниями, что может иметь значение с точки зрения локального расплетания ДНК вблизи сайта инициации транскрипции.

Длина спейсера между —10 и —35 участками промоторов B. subtilis равна 17±1 п. о., что сравнимо с таковой E. coli. Однако в промоторе гена, кодирующего дифтерийный токсин, длина спейсера равна всего 12 п. о. [69]. Еще в двух промоторах B. thuringiensis длина спейсера равна 15 п. о. [5, 74], а в трех промоторах средних генов фага SPO1 —19 п. о. [84, 138]. Спейсер между —10 и —35 участками промоторов B. subtilis характеризуется еще одной особенностью—наличием консервативной последовательности ТТуТГ от —17 до —14 позиций [102].

У многих промоторов грамположительных бактерий район, предшествующий —40 позиции, богат олиго- (дА) и (или) олиго- (дТ) основаниями [102]. Это наиболее ярко выражено у промоторов, узнаваемых σ^{56}-фактором, и в особенности у сильных промоторов ранних фаговых генов. В участке ДНК от —29 до —27 также чаще встречаются А и Т.

Несмотря на жесткую специфичность узнавания промоторов, σ-факторы B. subtilis характеризуются определенной функциональной пластичностью. Холофермент $E\sigma^{37}$ с низкой эффективностью транскрибирует гены, имеющие σ^{55}—специфичные промоторы [100]. В свою очередь холофермент $E\sigma^{29}$ транскрибирует гены, имеющие σ^{37}-специфичный промотор. Кроме того, σ^{29} может осуществить транскрипцию с энтеробактериальной ДНК плазмиды pMB9, промоторы которой не

узнаются ни σ^{55}, ни σ^{37} [51]. Возможно, он характеризуется менее строгой специфичностью узнавания промоторов по сравнению с другими σ-факторами B. subtilis.

На специфичность узнавания промотора могут влиять такие условия in vitro анализируемой системы, как концентрация солей, присутствие глицерина и т. д. [21]. Поэтому для однозначной интерпретации данных о структурной и функциональной организации транскрипционных сигналов грамположительных бактерий необходимы не только анализ большего числа промоторов, но и использование сравнимых условий реакции.

Терминаторы. У E. coli различают два типа терминаторов — независимые и фактор-зависимые [60]. Независимые терминаторы имеют ГЦ-богатый участок длиной 20 п. о., который имеет внутреннюю зеркальную симметрию и поэтому способен образовывать структуру типа петли. Транскрипция обычно завершается в пределах участка из остатков тимидилата в нематричной нити ДНК, который расположен сразу же за структурой потенциальной петли [113]. Решающее значение в терминации больше имеет формирующаяся петля транскрибируемой РНК, чем ДНК.

У фактор-зависимых терминаторов синтез РНК завершается при участии дополнительных факторов — Rho и Nus [60]. Эксперименты in vitro с использованием в качестве матриц синтетических молекул ДНК не выявили строгой селективности взаимодействия Rho с последовательностью РНК при терминирующей реакции [120]. Несмотря на то, что между отдельными фактор-зависимыми терминаторами прослеживается гомология, четкой закономерности в организации их структуры пока не выявлено.

У грамположительных бактерий анализ участков ДНК, представляющих собой терминаторы или сайты торможения продвижения РНК-полимеразы, не выявил каких-либо отличий от структуры независимых терминаторов E. coli [17, 49, 103, 121, 126]. Кроме того, РНК-полимеразы B. subtilis и E. coli терминируют транскрипцию в одних и тех же сайтах бациллярных матричных ДНК, и в обоих случаях эффективность терминации увеличивается с повышением ионной силы [28]. У B. subtilis также обнаружен Rho-фактор [61].

Таким образом, в терминирующих сигналах транскрипции грамположительных и грамотрицательных бактерий пока не обнаружено принципиальных различий.

Факторы, ограничивающие транскрипцию гетерологичных генов бактерий. Эффективность инициации транскрипции РНК-полимеразой B. subtilis ниже и сильно варьирует в зависимости от использованных гетерологичных промоторов грамотрицательной природы по сравнению с транскрипцией с гетерологичных матриц грамположительной природы РНК-полимеразой E. coli [85, 102, 147]. В лимитированных количествах фермент из B. subtilis в 30 раз эффективнее промотирует синтез РНК с гомологичного промотора раннего гена фага SPO1, чем с lacUV 5 промотора E. coli, тогда как полимераза из E. coli синтезирует РНК на этих же матрицах примерно с одинаковой эффективностью

[85]. Аналогично РНК-полимераза B. subtilis слабо утилизирует гибридный промотор tac [102], состоящий из —35 участка гена trp и —10 участка гена lacI V5 [29], не транскрибирует энтеробактериальные гены bla и cat [77], но холофермент E. coli с одинаковой для фермента из B. subtilis эффективностью промотирует синтез РНК с бациллярных генов veg и tms [102]. Слабое взаимодействие РНК-полимераз из грамположительных бактерий B. subtilis и L. curvatus показано и в отношении промоторов фага T7 [147].

Транскрипция РНК-полимеразой из B. subtilis на гетерологичных матрицах ДНК фагов T4, T7 и с lacI V5 промотора, в отличие от гомологичных матриц фаговой ДНК, очень чувствительна к ионной силе [27, 85, 123]. На матрице ДНК фагов Ø29 и SPO1 фермент из B. subtilis в присутствии рифампицина и нуклеозидтрифосфатов эффективно инициирует синтез специфических РНК [31], тогда как транскрипция с матрицы ДНК фага T7 этим же ферментом очень чувствительна к рифампицину. В противоположность этому холофермент из E. coli в этих же условиях на тех же матрицах образует быстрорастущие комплексы [147].

РНК-полимераза B. subtilis в оптимальных условиях in vitro с ранних генов фага Ø29 промотирует синтез 5-ти видов РНК [28]. Фермент из E. coli дополнительно синтезирует еще три вида транскриптов, которые встречаются и в инфицированных фагом клетках B. subtilis. Однако при соотношении фермента к ДНК более чем 10 к 1 и в отсутствие конкурирующих промоторов полимераза из B. subtilis способна инициировать транскрипцию еще с двух промоторов, используемых ферментом E. coli. При этом транскрипция с них чувствительна к рифампицину. Следовательно, эти промоторы в отношении полимеразы B. subtilis ведут себя так же, как промоторы фага T7. Если учесть, что промоторы ранних генов фага Ø29 в общем идентичны таковым грамотрицательных бактерий, то можно допустить, что различия во взаимодействии с промоторами между ферментами E. coli и B. subtilis связаны не со специфичностью связывания с промотором, а со способностью взаимодействовать с промоторами разной силы [28].

Существенную роль в эффективности взаимодействия с гетерологичным промотором играет кофермент РНК-полимеразы. Во всяком случае, кофермент E. coli в присутствии σ-субъединицы B. subtilis эффективно транскрибирует ДНК фагов Ø29 и T7 с образованием тех же видов РНК, которые образуются с помощью холофермента E. coli [28]. В противоположность этому гетероспецифическая комбинация кофермента B. subtilis и σ-субъединицы E. coli на матрице фаговых ДНК E. coli характеризуется слабой активностью [28, 123]. Следовательно, кофермент содержит элементы, важные в детерминации относительной силы промотора. Отражают ли эти элементы какие-то конформационные изменения кофермента в результате взаимодействия с σ-субъединицей, что может влиять на скорость формирования «открытого» комплекса, или другие изменения, лимитирующие расплетание ДНК, пока остается неясным.

Различие в специфичности взаимодействия с гетерологичным промотором может быть связано и с σ-фактором [7, 36, 155]. Возможно, бациллярные промоторы имеют какие-то структурные особенности, существенные при взаимодействии с РНК-полимеразой. Очевидно, что холофермент из B. subtilis, содержащий минорную σ-субъединицу, не будет утилизировать энтеробактериальный промотор из-за разницы в последовательности консервативных участков, узнаваемых σ-субъединицей E. coli и минорными σ-субъединицами B subtilis [148]. Вероятно, это утверждение верно и в отношении возможности транскрипции РНК-полимеразой E. coli с промоторов, специфичных для большинства, если не всех минорных σ-факторов B. subtilis.

Высказано предположение, что для экспрессии гена в клетках B. subtilis в отличие от E. coli необходимо более жесткое соответствие транскрипционных сигналов ДНК с РНК-полимеразой [102]. Это предположение подтверждается рядом экспериментальных данных. Промотор lacUV5, имеющий нетипичный для σ^{55}-специфичных промоторов —35 участок ТТТАЦА слабо используется РНК-полимеразой B. subtilis [85]. Аналогично энтеробактериальные промоторы генов bla и cat, имеющие последовательности ТТЦААА и ГГЦАЦГ в —35 участках и ГАЦААТ и ЦАТААТ в —10 участках соответственно, не транскрибируются в клетках B. subtilis [77]. Кроме того, хромосомный ген кристаллического токсина B. thuringiensis, имеющий промотор с атипичным —35 участком ЦЦТАЦГ, не транскрибируется полимеразой вегетативных клеток B. subtilis [71] и даже полимеразой E. coli [71, 74], характеризующейся меньшей избирательностью в отношении консервативных участков.

Важность степени гомологии консервативных участков гетерологичного промотора с консервативными участками σ^{55}-специфического промотора для экспрессии гетерологичного гена в бациллах вытекает и из следующего факта. Ген tet плазмиды pBR 325, имеющий последовательность ТТГАЦА и ТТТАЛТ в —35 и —10 участках промотора соответственно, транскрибируется в B. subtilis и, более того, придает клеткам высокий уровень устойчивости к тетрациклину [77]. Однако это наблюдение противоречит данным других авторов [37, 45] и требует дальнейшего подтверждения.

Одним из критических факторов в экспрессии гена может быть длина спейсера в промоторе. По крайней мере гибридный промотор lac, имеющий типичные —10 и —35 участки, не утилизируется полимеразой B. subtilis, возможно, из-за относительно короткой длины спейсера — всего 16 п. о. [102], а ген cat — из-за длинного спейсера — 20 п. о. [77]. Не исключено также, что кроме длины спейсера при гетерологичной экспрессии важен и его нуклеотидный состав и, в частности, наличие относительно консервативного участка от —17 до —14 позиции. Кстати, в гене tet плазмиды pBR 325, который может выражаться в B. subtilis, эта последовательность соответствует ГААГ, т. е. с одним отличием в —15 позиции от бациллярной последовательности ТПуТГ.

Важность присутствия других потенциально консервативных последовательностей в гетерологичном промоторе для его утилизации в клет-

ках B. subtilis пока неопределенна. Во всяком случае, блоки из олиго-(дА) и олиго-(дТ), предшествующие —35 участку бациллярного промотора [104], отсутствуют как в энтеробактериальном гене tet плазмиды pBR 325 [77], так и в промоторах стафилококковых генов cat [61] и erm [49], которые эффективно экспрессируются в B. subtilis.

Ограниченная экспрессия гетерологичных генов бактерий в B. subtilis может быть обусловлена δ-фактором. Это предположение подтверждается только косвенными данными, исходя из которых добавление δ-фактора к холоферменту B. subtilis вызывает ингибирование транскрипции с матрицы ДНК фага T7 [8] и плазмиды pBR 322 [30]. Однако нельзя исключить, что наблюдаемый эффект связан с прямой функцией δ-фактора—уменьшением неспецифического связывания РНК-полимеразы с ДНК, тем более что понижение транскрипционной активности при добавлении δ-фактора отмечается и на гомологичных матрицах ДНК.

Показано, что в системе анализа Streptomyces и Enterobacteria ситуация с утилизацией транскрипционных сигналов прямо противоположна описанной для B. subtilis и E. coli [14, 63]. Эффективность использования промоторов грамположительной мицелиальной бактерии S. lividans в клетках E. coli значительно ниже по сравнению с промоторами B. subtilis [14]. В то же время РНК-полимераза S. lividans узнает и эффективно инициирует синтез мРНК с транскрипционных сигналов не только грамположительной бактерии B. licheniformis, но и грамотрицательных бактерий E. coli и S. marcescens. Эти данные говорят скорее в пользу существования у прокариот родовой или видовой специфичности во взаимоотношениях гетерологичных промоторов с РНК-полимеразой, чем о существовании общих биологических факторов, ограничивающих экспрессию генов грамотрицательных бактерий в грамположительных микроорганизмах.

Трансляционные сигналы бактерий. Рибосома бактерий, состоящая из 30 S и 50 S субъединиц, функционально состоит из «трансляционного домена», который обеспечивает чтение мРНК и «выводящего домена», обусловливающею выход синтезированной цепи полипептида и связывание рибосомы с мембраной [82]. Структура рибосомы образована из трех видов рРНК и 52-х разных белков. Рибосомы неродственных бактерий по содержанию этих компонентов практически не отличаются, за исключением, возможно, белка S1, не входящего в состав рибосом грамположительных бактерий [58].

Нетранслируемые рРНК—5S (~110 п. о.), 16S (~1500 п. о.) и 23S (~2900 п.о.), входящие в состав рибосом, представлены в геноме прокариот в виде 16S—23S—5S транскрипционных единиц [107]. Между кодирующими 16S и 23S последовательностями E. coli имеется участок, кодирующий тРНК [75]. Такой участок не обнаружен у B. thuringiensis и, возможно, отсутствует у B. subtilis [73]. В хромосоме E. coli имеется 7 копий транскрипционных единиц рРНК, а в хромосоме B. subtilis—9 или 10 копий [93]. Конкретная роль рРНК в трансляции (за исключением 16S рРНК) пока неясна, однако высокий

уровень гомологии рРНК неродственных бактерий предполагает их важность в детерминации какой-то определенной функции.

В инициации трансляции участвуют растворимые белки IF-1, IF-2 и IF-3, которые играют роль факторов, способствующих образованию комплекса с мРНК и инициирующей тРНК. Факторы инициации освобождаются от 30S субъединицы до или во время ее соединения с 50S субъединицей, и последующая элонгация полипептида осуществляется с участием других факторов [75].

В большинстве случаев инициация трансляции определяется кодоном АУГ. Но известны случаи, когда инициирующими кодонами являются также ГУГ, УУГ и ЦУУ [75]. АУГ кодону в полипептиде соответствует метионин, который в начале цепи поставляется формилированной метионин-тРНК. Возможно, формилирование является необходимым событием для узнавания тРНК фактором IF-2, так как он взаимодействует только с инициирующей тРНК с N-блокированной аминокислотой [136]. Метионин во внутреннюю часть синтезируемого полипептида поставляется другой—неформилированной метионин-тРНК. Инициирующие тРНК, которые гомологичны в пределах 81—97% своей последовательности [144], обладают структурными особенностями, которые отсутствуют у неинициирующих тРНК: наличие ГЦ пары в 4-х идентичных позициях [19], неспаренного нуклеотида на 5′ конце и немодифицированного А на 3′ конце антикодона, который может обеспечить ответ инициирующей тРНК не только на АУГ, но и другие триплеты [75].

Узнавание инициационных сайтов в мРНК является свойством самих рибосом [89]. В частности, отмытые от факторов инициации рибосомы все еще связываются с истинными сайтами инициации соответствующей мРНК [135], хотя следует иметь в виду, что фактор IF-3 может влиять на степень утилизации сайтов инициации, дифференциально стабилизируя связывание 30S субъединицы с мРНК.

В узнавании сайта инициации трансляции мРНК участвует только 30S субъединица [90]. Узнавание осуществляется непосредственно с помощью 16S рРНК и рибосомных белков [12, 57]. 16S рРНК «узнает» мРНК благодаря комплементарности своего 3′ конца с определенным сайтом, названным сайтом Шайн-Дальгарно (или SD-сайтом), который предшествует инициирующему кодону трансляции [122, 134]. Анализ последовательностей более чем 150 бактериальных и фаговых мРНК указывает на присутствие этого сайта, который гомологичен ЦУЦЦ последовательности 16S рРНК E. coli, в пуринбогатой области из ~10 нуклеотидов [41]. Известно лишь несколько случаев отсутствия типичного SD-сайта и два случая, когда АУГ кодон столь близок к 5′ концу мРНК, что нет места для SD-сайта. Роль SD-сайта в инициации трансляции доказана многими экспериментами [75].

Очевидно, на уровне трансляции экспрессия гена определяется не только степенью соответствия SD-сайта 3′ концу хозяйской 16S рРНК, но и эффективностью связывания мРНК с рибосомой вообще. Какие же параметры могут влиять на эффективность этого связывания?

Во-первых, длина комплементарной последовательности SD-сайта с соответствующим участком 16S рРНК, которая в оптимальных случаях колеблется от 3 до 9 нуклеотидов. Нет доказательств того, что более протяженная комплементарная последовательность позволяет инициировать трансляцию с более высокой эффективностью. В то же время комплементарная последовательность всего из двух нуклеотидов не обеспечивает трансляцию [75]. Во-вторых, оптимальное расстояние между SD-сайтом и инициирующим кодоном (спейсерный участок) должно быть не менее 5 и не более 9 нуклеотидов. Если даже в спейсерном участке имеется потенциальный инициирующий кодон, инициация трансляции происходит с кодона, расположенного дальше—на оптимальном расстоянии от SD-сайта [23, 132]. В-третьих, вторичная структура мРНК может маскировать SD-сайт и инициирующий кодон таким образом, что затрудняется взаимодействие мРНК с рибосомой и соответственно ухудшается экспрессия гена [52, 65]. В-четвертых, вторичная структура самой 16S рРНК также может влиять на связывание с мРНК. Кроме того, гомология между определенными участками 5S и 16S рРНК предполагает, что их взаимодействие также важно при трансляции [11, 139]. По-видимому, 16S рРНК принимает альтернативные конфигурации в зависимости от ее участия в данный момент в инициации или элонгации трансляции. Однако следует отметить, что прямых доказательств функциональной значимости вторичной структуры рРНК и мРНК в экспрессии генов не имеется.

Есть косвенные сведения о том, что кроме SD-сайта в связывании с рибосомой участвуют и другие трансляционные сигналы мРНК. Например, в —1 позиции от первого нуклеотида инициирующего кодона чаще встречается пиримидин, а +4 позиции—пурин [75]. Кроме того, в бесклеточном экстракте в присутствии ингибитора элонгации спарсомицина рибосома связывается с мРНК и протектирует от действия нуклеаз участок длиной около 30 нуклеотидов, срединное расположение в котором имеют SD-сайт и инициирующий кодон [90]. Протектированный участок мРНК повторно плохо связывается с рибосомой, но при незначительном его удлинении эффективность связывания с ней восстанавливается [15].

Описаны также мутации, расположенные в спейсерном участке, до SD-сайта и сразу же после инициирующего кодона, которые снижают эффективность экспрессии генов [75]. Однако эти данные не исключают того, что нарушение связывания мутантной мРНК с рибосомой вызвано не изменением возможных дополнительных сигналов, а просто изменением вторичной структуры мРНК.

Факторы, ограничивающие трансляцию гетерологичных генов бактерий. Взаимозаменяемость компонентов аппарата трансляции у Bacillus и Escherichia говорит об их одинаковой структурной и функциональной организации [42, 57, 75]. Однако в противоположность рибосомам E. coli, которые эффективно транслируют мРНК грамположительных бактерий [10, 130], рибосомы представителей рода Bacillus неэффективны в трансляции мРНК грамотрицательных бактерий [44, 90, 129]. Это ограничение детерминировано 30S субъединицей [86].

Кроме того, трансляция мРНК грамположительной природы как в системе B. subtilis, так и E. coli меньше зависит от факторов инициации [97], чем трансляция мРНК грамотрицательной природы в E. coli [135]. Эти данные позволили предположить, что специфичность трансляции определяется особенностями структур мРНК грамположительных и грамотрицательных бактерий, ответственных за первичное связывание с рибосомой.

Секвенсный анализ показывает, что 3′ конец 16S рРНК E. coli по сравнению с таковым в 16S рРНК грамположительных бактерий короче на 2 или 3 нуклеотида (табл. 2). Для SD-сайтов мРНК из грам-

Таблица 2

Последовательность 3′ концов 16S рРНК прокариот

Источник	Последовательность	Ссылка
E. coli	···ААЦЦУГЦГГУУГГАУЦАЦЦУЦЦУУА 3′	[122]
B. stearothermophilus	···ААГГУГЦГГЦУГГАУЦАЦЦУЦЦУУУЦУА	[128]
B. subtilis	···ААГГУГЦГГЦУГГАУЦАЦЦУЦЦУУУЦУ	цит. по [98]
S. lividans, S. griseus	···ААГГУГЦГГЦУГГАУЦАЦЦУЦЦУУУЦУ	цит. по [14]

положительных бактерий характерна более протяженная и менее вариабельная комплементарность с 3′ концом 16S рРНК по сравнению с аналогичными сайтами E. coli [98, 102, 104]. Свободная энергия взаимодействия SD-сайта с 16S рРНК B. subtilis выше (Δ от −14 до—23 ккал/моль при среднем ΔG—17 ккал/моль), чем тот же параметр у E. coli (Δ от —4 до —22 ккал/моль при среднем ΔG —11,6 ккал/моль). Возможно, такая жесткость делает инициацию трансляции менее зависимой от факторов инициации и тем самым снижает эффективность связывания мРНК грамотрицательного источника с рибосомой B. subtilis [98]. В пользу такого предположения говорят также данные, согласно которым в мРНК грамотрицательной природы, трансляционные сигналы которых могут утилизироваться в in vitro и in vivo системе B. subtilis, SD-сайты имеют высокое значение ΔG [97, 128, 157]. Однако в случае использования в клетках B. subtilis трансляционных сигналов энтеробактериального гена tet жесткое соответствие SD-сайта 3′ концу 16S рРНК может быть необязательным, если инициация трансляции осуществляется с участием той же короткой SD-последовательности АГГ, отстоящей на расстоянии 7 нуклеотидов от инициирующего кодона АТГ, как в клетках E. coli [146]. К сожалению, истинный SD-сайт гена tet, который используется в клетках B. subtilis, не определялся.

Важность стадии инициации трансляции для успешной экспрессии генов E. coli в клетках B. subtilis следует еще из двух фактов. У B. subtilis отсутствует белок S1, возможно, стабилизирующий взаимодействие мРНК с рибосомой у E. coli [142]. В образовании специфического инициаторного комплекса мРНК с рибосомой участвует белок S12, соответствующая функция которого отсутствует у B. subtilis [57].

Спейсерный участок между SD-сайтом и инициирующим кодоном у исследованных грамположительных бактерий колеблется от 6 до 17 нуклеотидов, составляя в среднем 7—8 нуклеотидов [98, 102], что сравнимо с его значением у E. coli. Каких-либо данных о роли этого спейсера в экспрессии гетерологичных генов не имеется.

Несмотря на скудность данных, замечено, что инициирующий УУГ кодон встречается у грамположительных бактерий чаще, чем у E. coli [91, 98]. В случае с геном β-лактамазы S. aureus инициирующему кодону УУГ соответствует инициирующая мет-тРНК [98].

Уместно также отметить, что у сильно- и слабоэкспрессируемых генов E. coli кодоны используются с различной частотой [18]. Следовательно, эффективность экспрессии чужеродного гена в новом хозяине будет зависеть и от частоты использования представленных в нем кодонов. В частности, в слабоэкспрессируемом в клетках E. coli гене дифтерийного токсина 36 из 39-ти кодонов лейцина являются редкими, 41% кодонов для изолейцина представлен в виде АТА по сравнению с встречаемостью этого кодона в генах E. coli в 1% случаев [69].

Таким образом, степень утилизации кодонов, определяемая ГЦ составом ДНК, может являться одним из общих факторов ограниченной экспрессии бактериальных генов в гетерологичных системах. Такой биологический барьер должен носить неспецифический характер, так как он будет зависеть от того, какие объекты использованы в конкретном случае для анализа гетерологичной экспрессии гена.

Биологический барьер экспрессии чужеродных генов на уровне трансляции может скорее носить родовой или видовой характер, чем отражать общее явление при гетерологичной экспрессии генов в системе грамположительных и грамотрицательных бактерий. Известно, что 3' конец 16S рРНК S. lividans полностью идентичен таковому B. subtilis (табл. 2). Тем не менее при отсутствии жесткой комплементарности SD-сайта мРНК E. coli с 3' концом 16S рРНК S. lividans в стрептомицесах эффективно утилизируются трансляционные сигналы грамотрицательных бактерий [119] и образуется функциональный полипептид [14]. В то же время ограниченная экспрессия генов стрептомицесов E. coli [14, 63] может быть связана с несоответствием их трансляционных сигналов с рибосомами E. coli.

Пути преодоления биологических барьеров экспрессии гетерологичных генов в бациллах. В генетике микроорганизмов метод слияния генов и оперонов с тест-регуляторным генетическим элементом и, наоборот, слияния неисследованных регуляторных элементов с тест-структурным геном применяется давно. Особенно удобен метод для достижения или усиления экспрессии клонированных генов в клетках про- и эукариот путем подстраивания структурной части гена под контроль гомологичных для хозяйской клетки транскрипционных и трансляционных сигналов. Этот подход независимо использован разными авторами и для достижения экспрессии генов энтеробактериальной природы в клетках B. subtilis путем подстройки регуляции гена под контроль либо гомологичных сигналов хромосомы B. subtilis и фага SP01 [43, 150], либо гетерологичных сигналов B. thuringiensis [4].

Использованный подход целесообразен в отношении бацилл по крайней мере по двум причинам. Во-первых, для упрощения изучения генетической регуляции. Для B. subtilis до недавнего времени не был известен механизм регуляции по принципу репрессор-операторного взаимодействия. Возможность существования такого механизма у бацилл показана в опытах по экспрессии lac репрессора E. coli в B. subtilis и его участии в контроле транскрипции с гибридных промоторов, содержащих lac-операторный участок E. coli [154]. Гибридная система, состоящая из структурной части гена lacZ E. coli и регуляторного участка гена spoVG, использовалась для изучения тонких сторон регуляции спорогенеза в B. subtilis [156]. Соединением структурной части гена β-лактамазы E. coli с промоторной и сигнальной последовательностями гена α-амилазы B. subtilis показана возможность секреции функционального продукта грамотрицательной природы в B. subtilis [108]. Во-вторых, для получения биологически активных веществ. В клетках B. subtilis удалось уже осуществить экспрессию не только прокариотных, но и эукариотных генов [54, 150, 154].

Необходима ли для достижения экспрессии гетерологичного гена в бациллах его подстройка одновременно под контроль гомологичных транскрипционных и трансляционных сигналов? Представленные выше данные показывают, что некоторые гены грамотрицательных бактерий в клетках B. subtilis нуждаются только в транскрипционных сигналах гомологичной системы. Такая возможность показана даже для гена дигидрофолат редуктазы мыши [118]. Не исключается также, что гетерологичные гены, обладающие трансляционными и транскрипционными сигналами, соответствующими жестким требованиям трансляционного и транскрипционного аппаратов B. subtilis, будут функционально экспрессироваться в клетках бацилл.

Ограниченная экспрессия гетерологичных генов может носить родовой характер и в пределах грамотрицательных бактерий. В частности, гены Pseudomonas плохо экспрессируются в E. coli [24, 56, 131], тогда как гены E. coli экспрессируются в Pseudomonas на уровне исходного хозяина [59, 99]. Недавно появились сообщения о существовании семейства σ-факторов у E. coli и S. coelicolor. В случае с E. coli при тепловом шоке клеток появляется новый σ-фактор с мол. весом 32000—продукт гена htrR (или rpoH), который узнает ряд промоторов, не функционирующих в присутствии основного σ-фактора. Новый σ^{32} может транскрибировать ген rpoD с промотора, не узнаваемого основным σ-фактором. Минорные σ^{32} и σ^{28} факторы E. coli и B. subtilis соответственно могут проявлять перекрывающуюся промоторную специфичность. Таким образом, гетерогенность РНК-полимераз у бактерий является более распространенным явлением, чем предполагалось, и наличие в бактериальной клетке σ-факторов с различной промоторной специфичностью может играть более существенную роль в реализации чужеродной генетической информации.

Появились также данные о новых факторах, влияющих на экспрессию гетерологичных бактериальных генов. В частности, ограничение экспрессии гена hisG E. coli в B. subtilis связано с преждевременной

терминацией транскрипции—суператтенуацией. Кроме того, у спонтанных мутантов B. subtilis с повышенной экспрессией энтеробактериального гена cat, предварительно подстроенного под контроль бациллярного промотора, в районе расположения SD-сайта и инициирующего кодона обнаружены дупликации и триплликации. Предполагается, что в B. subtilis для эффективной экспрессии чужеродного гена важна не столько позиция SD-сайта, сколько присутствие и размер вторичных структур мРНК внутри трансляционных сигналов.

Вопрос о том, насколько уникальны описанные здесь факторы, играющие роль биологических барьеров гетерологичной экспрессии бактериальных генов в грамотрицательных и грамположительных прокариотах, требует еще своего решения. Во всяком случае, недавно показано, что гены E. coli экспрессируются еще в двух грамположительных микроорганизмах— Brevibacterium и Corynebacterium.

Научно-исследовательский технологический
институт аминокислот, Ереван

Поступило 9.1 1985 г.

ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ԳԵՆԵՐԻ ՀԵՏԵՐԱԼՈԳԻԱԿԱՆ ԷՔՍՊՐԵՍԻԱՆ ՊՐՈԿԱՐԻՈՏՆԵՐՈՒՄ

Վ. Ա. ՍԱՔԱՆՅԱՆ

Հետազոտված են այն ֆակտորները, որոնք խոչընդոտում են բակտերիաների հետերոլոգիական գենների արտահայտումը պրոկարիոտ սիստեմներում տրանսկրիպցիոն և տրանսլյացիոն ստադիաներում: Հատուկ ուշադրություն է դարձված տարբեր բակտերիաների տրանսկրիպցիոն և տրանսլյացիոն ազդանշանների համեմատական կազմակերպմանը: Քննարկված են նաև կենսաբանական խոչընդոտների հաղթահարման ուղիները՝ հետերոլոգիական գենների արտահայտմանը հասնելու համար:

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF BACTERIAL GENES IN PROCARYOTES

V. A. SAKANYAN

The transcriptional and translational factors which can prevent the expression of heterologous bacterial genes in procaryotes have been discussed. From this point of view the transcriptional and translational signals of unrelated bacteria are compared. There are also discussed the ways of overcoming the biological barriers to achieve the expression of heterologous genes.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Данилевская О. Н.* Мол. биол., *16*, 453—480, 1982.
2. *Лидеман Л. Ф.* Генетика, *19*, 693—707, 1983.
3. *Никифоров В. Г.* Докт. дисс., М., 1984.
4. *Саканян В. А., Цой Т. В., Сезонов Г. В., Алиханян С. И.* Генетика, *18*, 1825—1834, 1982.
5. *Цой Т. В., Сорокин А. В., Крупенко М. А., Сезонов Г. В., Ребентиш Б. А., Саканян В. А., Алиханян С. И.* Генетика, *20*, 1419—1427, 1984.

6. *Чечик А. А., Бибилашвили Р. Ш., Мирзабеков А. Д.* Докл. АН СССР, *260*, 765—768, 1981.
7. *Achberger E. C., Whiteley H. R.* J. Biol. Chem., *255*, 11957—11964, 1980.
8. *Achberger E. C., Whiteley H. R.* J. Biol. Chem., *256*, 7424—7432, 1981.
9. *Aoyama T., Takanami M., Ohtsuka E., Taniyama Y., Marumoto R., Sato H., Ikehara M.* Nucl. Acids Res., *11*, 5855—5864, 1983.
10. *Arnaud M., Mahler I., Halvorson H. O., Boschwitz H., Keynan A.* J. Bacteriol., *142*, 1045—1048, 1980.
11. *Azad A. A.* Nucl. Acids Res., 7, 1913—1929, 1979.
12. *Banner C. D. B., Moran C. P., Losick R.* J. Mol. Biol., *163*, 351—370, 1983.
13. *Beveridge T. J.* Int. Rev. Cytol., *72*, 229—317, 1981.
14. *Bibb M. J., Cohen S. N.* Mol. Gen. Genet., *187*, 265—277, 1982.
15. *Borisova G. P., Volkova T., Berzin V., Rosenthal G., Green E.* Nucl. Acids Res., *6*, 1761—1774, 1979.
16. *Brammar W. J., Muir S., McMorris A.* Mol. Gen. Genet., *178*, 217—224, 1980.
17. *Brennan S. M., Geiduschek E. P.* Nucl. Acids Res., *11*, 4157—4175, 1983.
18. *Bujard H., Niemann A., Breunig K., Roisch U., Dresel A., von Gabain A., Gentz R., Stuber D., Weiher H.* In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds), Praeger Press, New York, 121—140, 1982.
19. *Calagan J. L., Pirtle R., Pirtle I., Kashdan M., Vreman H., Dudock B.* J. Biol. Chem., *255*, 9981—9984, 1980.
20. *Cantwell B. A., McConnell D. J.* Gene, *23*, 211—219, 1983.
21. *Chamberlin M. J.* Annu. Rev. Biochem., *43*, 721—775, 1974.
22. *Chlim B. K., Duffy J. J., Geiduschek E. P.* J. Biol. Chem., *257*, 6501—6508, 1982.
23. *Christie G. E., Platt T.* J. Mol. Biol., *142*, 519—530, 1980.
24. *Clarke P. H., Lavereck P. D.* J. Bacteriol., *154*, 508—512, 1983.
25. *Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. V., Helling R. B.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *70*, 3240—3244, 1973.
26. *Costanzo M., Pero J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *80*, 1236—1240, 1983.
27. *Davison B. L., Leighton T., Rabinowitz J. C.* J. Biol. Chem., *254*, 9220—9226, 1979.
28. *Davison B. L., Murray C. L., Rabinowitz J. C.* J. Biol. Chem., *255*, 8819—8830, 1980.
29. *De Boer H. A., Comstock L. J., Vasser M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 21—25, 1983.
30. *Doi R. H.* Arch. Biochem. Biophys., *214*, 772—781, 1982.
31. *Duffy J. J., Geiduschek E. P.* J. Biol. Chem., *250*, 4530—4541, 1975.
32. *Duffy J. J., Geiduschek E. P.* Nature, *270*, 28—32, 1977.
33. *Ehrlich S. D.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *75*, 1433—1436, 1978.
34. *Ehrlich S. D., Sgaramella V.* Trends Biochem. Sci., *3*, 259—261, 1978.
35. *Ehrlich S. D., Bursztyn-Pettegrew H., Stroynowski I., Lederberg J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *73*, 4145—4149, 1976.
36. *Ernst H., Hartmann G. R., Dombley H.* J. Biol. Chem., *124*, 427—433, 1982.
37. *Ferrari F. A., Nguyen A., Lang D., Hoch J. A.* J. Bacteriol., *154*, 1513—1515, 1983.
38. *Fox T. D., Losick R., Pero J.* J. Mol. Biol., *101*, 427—433, 1976.
39. *Fukuda R., Doi R. H.* J. Bacteriol., *129*, 422—432, 1977.
40. *Gilman M. Z., Wiggs J. L., Chamberlin M. J.* In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds), Praeger Press, New York, 293—304, 1982.
41. *Gold L., Pribnow D., Schneider T., Shinedling S., Singer B. S., Stormo G.* Annu. Rev. Microbiol., *35*, 365—403, 1981.
42. *Goldberg M. L., Steitz J. A.* Biochem., *13*, 2123—2129, 1974.
43. *Goldfarb D. S., Doi R. H., Rodriguez R. L.* Nature, *293*, 309—311, 1981.
44. *Goldfarb D. S., Rodriguez R. L., Doi R. H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5886—5890, 1982.
45. *Goldfarb D. S., Doi R. H., Close T. J., Rodriguez R. L.* In: Molecular cloning and gene regulation in Bacilli. Ganesan A. T., Chang S., Hoch J. A. (eds), Academic Press, New York, 311—324, 1982.

46. *Goze A., Ehrlich S. D.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *77*, 7333—7337, 1980.
47. *Grandi G., Mottes M., Sgaramella V.* Plasmid, *6*, 99—111, 1981.
48. *Grosjean H., Fiers W.* Gene, *18*, 199—209, 1982.
49. *Gryczan T., Grandi G., Hahn J., Grandi R., Dubnau D.* Nucl. Acids Res., *8*, 6081—6096, 1980.
50. *Haldenwang W. C., Losick R.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *77*, 7000—7004, 1980.
51. *Haldenwang W. G., Lang N., Losick R.* Cell, *23*, 615—624, 1981.
52. *Hall M. N., Gabay J., Debarbouille M., Schwartz M.* Nature, *295*, 616—618, 1982.
53. *Hardy K., Haefelt C. J.* Bacteriol., *152*, 524—526, 1982.
54. *Hardy K., Stahl S., Kupper H.* Nature, *293*, 481—483, 1981.
55. *Hawley D. K., McClure W. R.* Nucl. Acids Res., *11*, 2237—2255, 1983.
56. *Hedges R. W., Jacob A. E., Crawford I. P.* Nature, *267*, 283—284, 1977.
57. *Held W. A., Gette W. R., Nomura M.* Biochem., *13*, 2115—2122, 1974.
58. *Higo K., Otaka E., Osawa S.* Mol. Gen. Genet., *185*, 239—244, 1982.
59. *Holloway B. W., Krishnapillai V., Morgan A. F.* Microbiol. Rev., *43*, 73—102, 1979.
60. *Holmes W. M., Platt T., Rosenberg M.* Cell, *32*, 1029—1032, 1983.
61. *Horinouchi S., Weisblum B.* J. Bacteriol., *150*, 815—825, 1982.
62. *Horinouchi S., Byeon W.—H., Weisblum B. J.* Bacteriol., *154*, 1252—1262, 1983.
63. *Horinouchi S., Uozumi T., Beppu T.* Agric. Biol. Chem., *44*, 367—381, 1980.
64. *Huang J.—Y., Doi R. H.* J. Biochem., *104*, 313—320, 1980.
65. *Isterentant D., Fiers W.* Gene, *9*, 1—12, 1980.
66. *Ishihama A.* Adv. Biophys., *14*, 1—35, 1981.
67. *Jahning J. A., Wiggs J. L., Chamberlin M. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *76*, 5470—5474, 1979.
68. *Johnson W. C., Moran C. P., Losick R.* Nature, *302*, 800—804, 1983.
69. *Kaczorek M., Delpeyroux F., Chenciner N., Streek R. E., Murphy J. R., Boquet P., Tiollais P.* Science, *221*, 855—858, 1983.
70. *Kajitani M., Ishihama A.* Nucl. Acids Res., *11*, 3873—3885, 1983.
71. *Kiler A., Fargette F., Ribier J., Rapoport G.* EMBO J., *1*, 791—799, 1982.
72. *Kiler A. F., Lecadet M.—M., Dedonder R.* Europ. J. Biochem., *35*, 317—327, 1973.
73. *Kiler A. F., Kunst F., Rapoport G.* Nucl. Acids Res., *7*, 997—1010, 1979.
74. *Kiler A. F., Parsot C., Rapoport G.* Nucl. Acids Res., *11*, 3973—3987, 1983.
75. *Kozak M.* Microb. Rev., *47*, 1—45, 1983.
76. *Kreft J., Bernhard K., Goebel W.* Mol. Gen. Genet., *162*, 59—67, 1979.
77. *Kreft J., Burger K. J., Goebel W.* Mol. Gen. Genet., *193*, 384—389, 1983.
78. *Kroyer J., Chang S.* Gene, *15*, 343—347, 1981.
79. *Kudo T., Doi R. H.* J. Biol. Chem., *256*, 9775—9781, 1981.
80. *Kudo T., Jaffe D., Doi R. H.* Mol. Gen. Genet., *181*, 63—68, 1981.
81. *Lai J.—S., Sarras M., Brammar W. J., Neugebauer K., Wu H. C.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *78*, 3506—3510, 1981.
82. *Lake J. A.* Cell, *33*, 318—319, 1983.
83. *Laverie J. M., Spiegelman G. B., Whiteley H. R.* Gene, *2*, 251—262, 1977.
84. *Lee G., Pero J.* J. Mol. Biol., *152*, 247—265, 1981.
85. *Lee G., Talkington C., Pero J.* Mol. Gen. Genet., *180*, 57—65, 1980.
86. *Legault—Demare L., Chambliss G. H.* Mol. Gen. Genet., *142*, 277—287, 1975.
87. *Leong D., Coleman K. D., Murphy J. R.* Science, *220*, 515—517, 1983.
88. *Leong D., Coleman K. D., Murphy J. R.* J. Biol. Chem., *258*, 15016—15020, 1983.
89. *Lodish H. F.* Nature, *224*, 867—870, 1969.
90. *Lodish H. F.* Nature, *226*, 705—707, 1970.
91. *Lofdahl S., Guss B., Uhlen M., Philipson L., Lindberg M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *80*, 697—701, 1953.
92. *Losick R., Pero J.* Cell, *25*, 582—584, 1981.
93. *Loughney K., Lund E., Dahlberg J. E.* Nucl. Acids Res., *10*, 1607—1624, 1982.
94. *Malke H., Holm S. E.* Mol. Gen. Genet, *181*, 283—295, 1981.
95. *Mahler I., Halvorson H. O.* J. Bacteriol., *131*, 374—377, 1977.
96. *Mazza G., Perego M., Riva S.* Mol. Gen. Genet., *185*, 397—403, 1982.

97. *McLaughlin J. R., Murray C. L., Rabinowitz J. C.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA *78*, 4912—4916, 1981.
98. *McLaughlin J. R., Murray C. L., Rabinowitz J. C.* J. Biol. Chem., *256*, 11283—11291, 1981.
99. *Mergeay M., Boyen A., Legrain C., Glansdorff N.* J. Bacteriol., *136*, 1187—1188, 1978.
100. *Moran C. P., Lang N., Losick R.* Nucl. Acids Res., *9*, 5979—5989, 1981.
101. *Moran C. P., Lang N., Banner C. D. B., Haldenwang W. G., Losick R.* Cell, *25*, 783—791, 1981.
102. *Moran C. P., Lang N., LeGrice S. F., Lee G., Stephens M., Sonenshein A. L., Pero J., Losick R.* Mol. Gen. Genet., *186*, 339—346, 1982.
103. *Murphy N., McConnell D. J., Cantwell B. A.* Nucl. Acids Res., *12*, 5355—5367, 1984.
104. *Murray C. L., Rabinowitz J. C.* J. Biol. Chem., *257*, 1053—1062, 1982.
105. *Nagahari K., Sakaguchi K.* Mol. Gen. Genet., *158*, 263—270, 1978.
106. *Nomura T., Ishihama A., Kajitani M., Takahashi T., Nakada N., Yoshinaga K.* Mol. Gen. Genet., *193*, 8—16, 1984.
107. *Nomura M., Morgan E., Jaskunas S. R.* Annu. Rev. Genetics, *11*, 297—347, 1977.
108. *Ohmura K., Nakamura K., Yamazaki H., Shiroza T., Yamane K., Jigami Y., Tanaka H., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G.* Nucl. Acids Res., *12*, 5307—5319, 1984.
109. *Oppenheim D. S., Bennett G. N., Yanofsky C.* J. Mol. Biol., *144*, 143—159, 1980.
110. *Park C. S., Hillel Z., Wu C—W.* J. Biol. Chem., *257*, 6944—6949, 1982.
111. *Pero J., Nelson J., Fox T. D.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 1989—1993, 1975.
112. *Pribnow D.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 784—789, 1975.
113. *Rosenberg M., Court D.* Ann. Rev. Genetics, *13*, 319—353, 1979.
114. *Russel D. R., Bennett G. N.* Gene, *20*, 231—243, 1982.
115. *Schaller H., Gray C., Hermann K.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 737—741, 1975.
116. *Scherer G. E. F., Walkinshaw M. D., Arnott S.* Nucl. Acids Res., *5*, 3759—3773, 1978.
117. *Schmitz A., Galas D.* Nucl. Acids Res., *6*, 111—137, 1979.
118. *Schoner R. G., Williams D. M., Lovett P. S.* Gene, *22*, 47—57, 1983.
119. *Schottel J. L., Bibb M. J., Cohen S. N.* J. Bacteriol., *146*, 360—368, 1981.
120. *Shigesada K., Imai M.* Biochem., *21*, 5849—5856, 1982.
121. *Shimotsu H., Kawamura F., Kobayashi Y., Saito H.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *80*, 658—662, 1983.
122. *Shine J., Dalgarno L.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 1342—1346, 1974.
123. *Shorenstein R. G., Losick R.* J. Biol. Chem., *248*, 6170—6173, 1973.
124. *Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W.* Cell, *20*, 269—281, 1980.
125. *Simpson R. B.* Cell, *18*, 277—285, 1979.
126. *Sogin M. L., Pace N. R., Rosenberg M., Weissman S. M.* J. Biol. Chem., *251*, 3480—3488, 1976.
127. *Spiegelman G. B., Hiatt W. R., Whiteley H. R.* J. Biol. Chem., *253*, 1756—1765, 1978.
128. *Sprague K., Stetz J., Grenley R., Stocking C.* Nature, *267*, 462—465, 1977.
129. *Stallcup M. R., Rabinowitz J. C.* J. Biol. Chem., *248*, 3209—3219, 1973.
130. *Stallcup M. R., Sharrock W. J., Rabinowitz J. C.* J. Biol. Chem., *251*, 2499—2510, 1975.
131. *Stapleton M. J., Jagger K. S., Warren R. L.* J. Bacteriol., *157*, 7—12, 1984.
132. *Steege D. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *74*, 4163—4167, 1977.
133. *Stefano J. E., Ackerson J. W., Gralla J. D.* Nucl. Acids Res., *8*, 2709—2723, 1980.
134. *Steitz J. A., Jakes K.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 4734—4738, 1975.
135. *Steitz J. A., Wahba A. J., Laughrea M., Moore P. B.* Nucl. Acids Res., *4*, 1—15, 1977.
136. *Sundan R. M., Stringer E. A., Schulman L. H., Maitra U.* J. Biol. Chem., *251*, 3338—3345, 1976.

137. *Talkington C., Pero J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *75*, 1185—1189, 1978.
138. *Talkington C., Pero J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *76*, 5465—5469, 1979.
139. *Thompson J. F., Hearst J. E.* Cell, *33*, 19—24, 1983.
140. *Travers A. A., Lamond A. I., Mace H. A. F.* In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds), Praeger Press. New York, 216—228, 1982.
141. *Tweten R. K., Collier R. J.* J. Bacteriol., *156*, 680—685, 1983.
142. *Van Dieijen G., Zipori F., Van Prooijen W., Van Duin J.* J. Biochem., *90*, 571—576, 1978.
143. *Von Hippel R. H., Bear D. G., Winter R. B., Berg O. G.* In: Promoters: structure and function. Rodriguez R., Chamberlin M. (eds). Praeger Press, New York. 3—33, 1982.
144. *Walker R. T., RajBhandary U. L.* Nucl. Acids Res., *5*, 57—70, 1978.
145. *Weiher H., Schaller H.* Proc. Natl. Sci. USA, *79*, 1408—1412, 1982.
146. *West R. W., Rodriguez R. L.* Gene, *20*, 291—304, 1982.
147. *Wiggs J. L., Bush J. W., Chamberlin M.* Cell, *16*, 97—109, 1979.
148. *Wiggs J. L., Gilman M. Z., Chamberlin M.* Proc. Natl. Acad. USA, *78*, 2762—2766, 1981.
149. *Whiteley H. R., Achberger E. C., Hilton M. D.* In: Promoters: structure and function. Rodrigues R., Chamberlin M. (eds). Praeger Press, New York, 267—282, 1982.
150. *Williams D. M., Schoner R. G., Duvall E. J., Preis L. H., Lovett P. S.* Gene, *16*, 199—206, 1981.
151. *Williamson V. M., Dol R. H.* Mol. Gen. Genet., *161*, 135—141, 1978.
152. *Wong S.—L., Dol R. H.* J. Biol. Chem., *257*, 11932—11936, 1982.
153. *Wong S.—L., Dol R. H.* J. Biol. Chem., *259*, 9762—9767, 1984.
154. *Yansura D. G., Henner D. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *81*, 439—443, 1984.
155. *Zimmer S. G., Millette R. L.* J. Biol. Chem., *254*, 2199—2204, 1979.
156. *Zuber P., Losick R.* Cell, *35*, 275—283, 1983.
157. *Zukowski M. M., Gaffney D. F., Speck D., Kauffman M., Findell A., Wilcup A., Lecoeq J.—P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *80*, 1101—1105, 1983.

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

УДК 579.25.873

ГЕНЕТИКА АКТИНОФАГОВ И ИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ С АКТИНОМИЦЕТАМИ

Н. Д. ЛОМОВСКАЯ, Н. М. МКРТУМЯН, Т. А. ВОЕНКОВА, Г. Л. МУРАВНИК, Е. В. ПЕРОВА

Представлен обзор по генетике актинофагов и некоторым вопросам, связанным с их взаимодействием с хозяевами Streptomyces. Данные по генетическому и физическому картированию умеренного фага ∅C31 создали основу для использования делеционных мутантов фага при конструировании векторов. Генетические и физические исследования родственного фага ∅C43 показали присутствие в его геноме IS-подобной структуры, которая генерирует делеции с высокой частотой. Продемонстрирована возможность селекции in vivo фагов со структурными модификациями ДНК ∅C43.

Суммированы генетические данные по системам рестрикции и модификации, а также распространенности этих систем среди видов Streptomyces. Подчеркнута роль генетических данных актинофагов для фундаментальных и прикладных исследований актиномицетов.

Ключевые слова: генная инженерия, актинофаг, генетическая карта, модификация и рестрикция ДНК, векторы.

Систематические генетические исследования актинофагов были начаты с обнаружением умеренных и вирулентных актинофагов, действующих на генетически маркированный штамм Streptomyces coelicolor A3 (2)—основной объект генетики актиномицетов [2, 8]. Актинофаги играют важную роль в расширении возможностей генетического анализа у актиномицетов, в частности, при изучении систем рестрикции и модификации чужеродной ДНК, для идентификации супрессорных генов, комплекса генов хозяина и фага, обуславливающих их взаимоотношения.

Успехи, достигнутые в области генетики актиномицетов и актинофагов, и разработка методов молекулярного клонирования и применении к актиномицетам [7, 11] открыли широкие возможности для использования методологии генной инженерии при решении многих проблем молекулярной генетики актиномицетов и их фагов. В то же время актинофаги, благодаря их генетической изученности, являются одним из основных инструментов при использовании методов генной инженерии. Это в первую очередь относится к актинофагу ØC31, изолированному в 1970 г. [2], который действовал на модельные штаммы актиномицетов S. coelicolor A3 (2) и S. lividans 66. В экспериментальной работе с этим фагом оказалось возможным использование преимуществ стандартной системы как для молекулярно-генетического исследования актинофагов, так и для расширения возможностей их генетического анализа. В результате разработки методов молекулярного клонирования и применении к актиномицетам стало возможным конструирование фаговых векторов. Использование фага ØC31 в качестве вектора различных штаммов-продуцентов предполагает, что ген, клонированный на фаге в стандартной системе (штамм S. lividans 66), может быть перенесен в желаемый штамм при инфекции фагом. Такая стратегия вызывает необходимость детального изучения взаимоотношений фага ØC31 со штаммами Streptomyces: уровня литической и лизогенной реакции штаммов, круга хозяев, отношения фага к системам рестрикции и модификации фаговой ДНК, наличия в штамме гомологичного профага и др.

Фаг ØC31—умеренный актинофаг. Частота лизогенизации штамма S. lividans 66 составляет 30—40%. Показано, что фаг ØC31 имеет одно преимущественное место интеграции в хромосому штамма A3 (2), расположенного между маркерами argA1 и pheA1 [10]. Участок интеграции в хромосому штамма 66 расположен в том же районе. Среди штаммов, далеких в систематическом отношении от A3 (2) и 66, были обнаружены штаммы, частота лизогенизации которых фагом ØC31 резко снижена (напр., для S. cinnamonensis, продуцирующего антибиотик моненсин, эта величина составляет <0,1%). Фаг имеет относительно широкий круг хозяев. Так из 64-х штаммов, представителей систематической группы синих актиномицетов, родственных штаммов A3 (2) и 66, фаг ØC31 действовал на 41 штамм. Спектр действия на штаммы серой группы был уже (из 30-ти проверенных штаммов фаг действовал на 9). Из небольшой группы штаммов-продуцентов антибиотиков, ферментов и эндонуклеаз рестрикции (22 штамма) фаг ØC31 действовал на 6 штаммов. В процессе этих исследований было обнаружено, что в

ряде штаммов различных видов содержится профаг, родственный фагу ØC31. Так, лизогенный штамм S. caensis 55 несет в качестве профага фаг, который, по данным гетеродуплексного и рестрикционного анализов, полностью гомологичен фагу ØC31, а в штамме S. lividans 803 в качестве профага содержится фаг ØC43, имеющий 98% гомологии с фагом ØC31 [5]. Примечательно, что лизогенным по фагу ØC31 оказался штамм S. aureofaciens, образующий хлортетрациклин. Образующиеся в результате спонтанной индукции из этого штамма фаги в отличие от исходного фага ØC31 имеют делецию в EcoRI-C фрагменте ДНК. Использование таких методов тестирования профага в лизогенном штамме, как определение иммунитетной устойчивости с помощью вирулентных мутантов ØC31, ДНК/ДНК гибридизации с меченой ДНК фага ØC31, а также интеграция суперинфицирующего фага ØC31 с генами резистентности по гомологии с резидентным профагом, позволяет идентифицировать дефектно-лизогенные штаммы, содержащие, по-видимому, часть генома профага, гомологичного фагу ØC31. Среди них обнаружены как штаммы, обладающие иммунитетной устойчивостью к фагу ØC31 (напр., штамм S. rimosus—продуцент окситетрациклина), так и штаммы, чувствительные к нему. Эти данные указывают на то, что фаг ØC31 или его варианты, имеющие структурные модификации молекул фаговой ДНК, содержатся в качестве профага в довольно большом числе штаммов актиномицетов. Обнаружение в ряде штаммов профагов, родственных фагу ØC31, создает дополнительную возможность для включения в эти штаммы фагового вектора по гомологии с профагом.

Конструирование векторов на основе фага ØC31 стало возможным благодаря генетическому и физическому изучению этого фага [9, 12]. Была построена генетическая карта фага, при построении которой использовали температурочувствительные (ts) мутанты, с-мутанты, не способные к лизогенизации чувствительного штамма, и мутанты по кругу хозяев (h). Изучение делеционных мутантов фага позволило выявить «несущественные» для литического развития области генома. После повторных обработок фага хелатирующими агентами были получены делеционные мутанты с измененным фенотипом C, Lyg и G [3], с помощью которых в геноме актинофага идентифицирована непрерывная «несущественная» область (рис. 1), а также установлена корреляция между генетической и физической картами. С использованием данных гетеродуплексного анализа показано, что две протяженные области, составляющие 19,1 и 6% общей длины генома, перекрываются делециями. Это позволяет считать, что фаг ØC31 и его делеционные варианты могут быть использованы как векторы замещения и включения. Так, например, при замещении фрагмента EcoRI-C, расположенного в пределах «несущественной» области, клонируемым фрагментом рекомбинанты можно отбирать среди фагов, имеющих фенотип Lyg^{+} G^{-}. На основании данных, полученных на фаге ØC31, удалось сконструировать серию «KC» векторов. Эти векторы способны интегрировать в хромосому по гомологии с профагом и клонируемым фрагментом, а также по сайту прикрепления att [6].

В процессе работы по выявлению возможностей конструирования удобных фаговых векторов был обнаружен еще один фаг — ØC43, выделенный из лизогенного штамма S. lividans 803 [5], который может быть использован как основа для фагового вектора. Генетический и гетеродуплексный анализы фагового потомства, образующегося в ре-

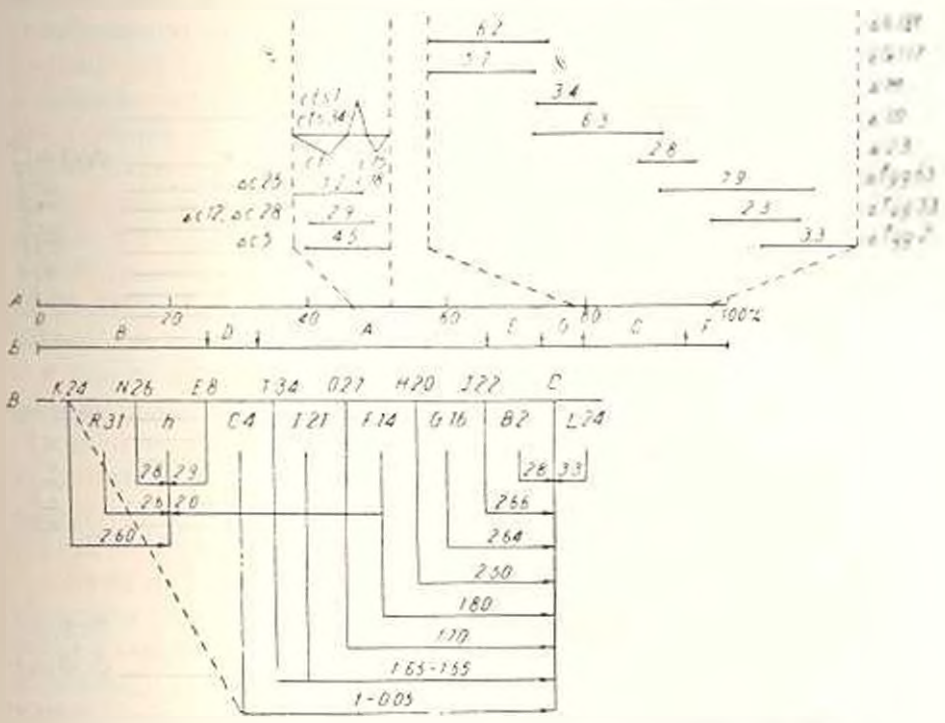


Рис. 1. Физическая и генетическая карты актинофага ØC31. (А) Сплошными линиями обозначено расположение делеций по результатам гетеродуплексного анализа. (Б) Буквами на рестрикционной карте обозначены EcoRI фрагменты ДНК фага. (В). Цифрами на генетической карте обозначены величины сцепления между мутациями c и h в трехфакторных скрещиваниях.

зультате спонтанной индукции лизогенного штамма 803, показали, что этот фаг идентичен фагу ØC31, и единственным отличием между ними является присутствие в геноме фага ØC43 чужеродной вставочной последовательности (IS) размером в 1,7 тысяч пар оснований (т. п. н.), расположенной в пределах «несущественной» области генома (рис. 2*А*). Показано, что в районе вставки с высокой частотой образуются делеции, один из концов которых находится либо в месте включения вставки, либо в ее пределах (рис. 2 *А, Б*). Варианты, несущие целую вставку, часть вставки или утратившие ее, отличаются друг от друга по фенотипу негативных колоний при высеве фага на газон тестерного штамма S. albus 43. Генетические данные и результаты гетеродуплексного анализа ДНК фагового потомства, образующегося в результате спонтанной индукции лизогенного штамма, наводят на мысль, что вставочная последовательность, по-видимому, присутствует в геноме профага на расстоянии 1,4 т. п. н. от одного из сайтов интеграции профага. Ана-

лиз свойств лизогенного штамма, несущего профаг со вставкой, показал, что у него с частотой $1-5\cdot10^{-3}$ возникают дефектно-лизогенные варианты. Согласно результатам анализа фенотипов фагового потомства двойных лизогенных штаммов, дефект профага обусловлен делецией att или cos сайтов, расположенных в районе вставочной последовательности [4]. Включение в эту структуру фрагмента ДНК с геном резистентности к тиострептону (рис. 2 *В*) не влияет на ее способность

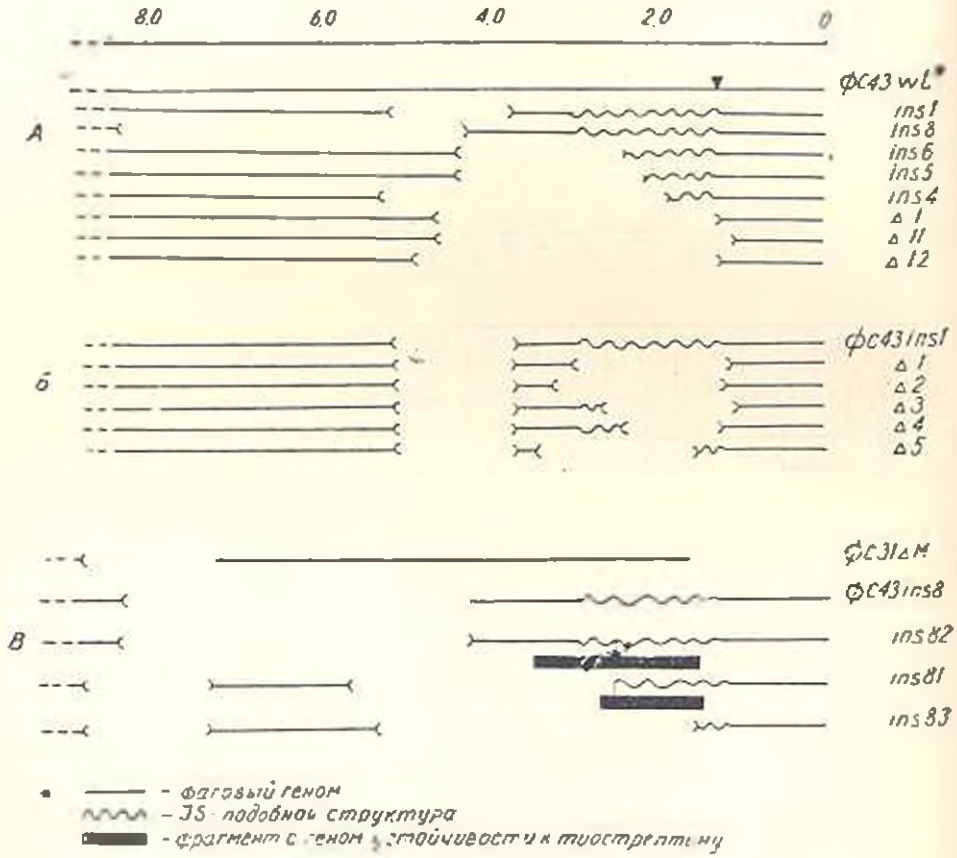


Рис. 2. Структурные модификации в геноме фага ØC43, обусловленные присутствием чужеродной вставочной последовательности (IS). (А) Фаговое потомство, образующееся в результате спонтанной индукции лизогенного штамма S. lividans (ØC43). (Б) Делетированные варианты, возникающие у фага ØC43 ins1, несущего целую вставочную последовательность. (В) Строение молекул ДНК рекомбинантных фагов, несущих ген устойчивости к тиострептону.

генерировать делеции и в ряде случаев приводит к увеличению частоты утраты структуры. Включение в вставку селективного маркера позволяет проводить эксперименты по изучению ее способности к перемещению в пределах хромосомных, фаговых и плазмидных репликонов и выяснению функциональной роли этой последовательности в дестабилизации актиномицетного генома. Полученные нами данные указывают на определенное сходство в поведении IS структуры актинофага ØC43 и IS элементов бактерий.

Анализ строения молекул фагового потомства лизогенного штамма 803 позволяет сделать вывод, что наличие в профаге вставки приводит к образованию сверхгенома, не способного к упаковке в фаговые частицы. Это обусловливает наличие в фаговом потомстве вариантов с делециями фагового генома и возможность отбора вариантов со структурными модификациями ДНК in vivo.

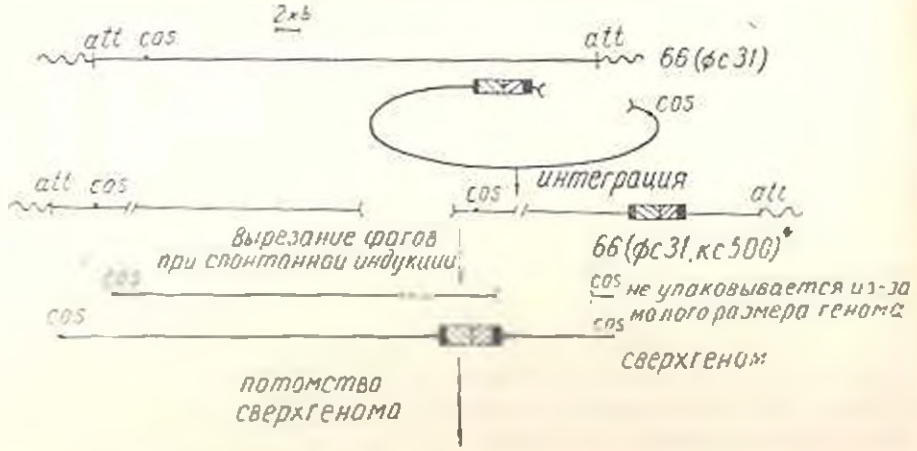
Наличие такого рода сверхгенома показано в профаге штамма, лизогенного по фагам ØC31 и KC500; последний несет гены устойчивости к тиострептону и виомицину, а также содержит делецию сайта att. Анализ строения фагового потомства, образующегося в результате спонтанной индукции штамма 66 (ØC31, KC500), указывает на то, что рекомбинация при образовании этого двойного лизогенного штамма произошла в участке между делецией и клонируемым фрагментом фага KC500 (рис. 3). При этом должны были образоваться молекулы фаговой ДНК, не способные упаковываться в фаговые головки как из-за малых, так и из-за слишком больших (сверхгеном) размеров. В потомстве такого двойного лизогенного штамма действительно обнаружены фаги со структурными модификациями молекул ДНК. Так, идентифицированы варианты, несущие два или один из маркеров устойчивости к тиострептону и виомицину, сохранившие или утратившие att сайт (рис. 3). Это позволяет идентифицировать фаги с изменениями в структуре ДНК in vivo, не прибегая к манипуляциям in vitro.

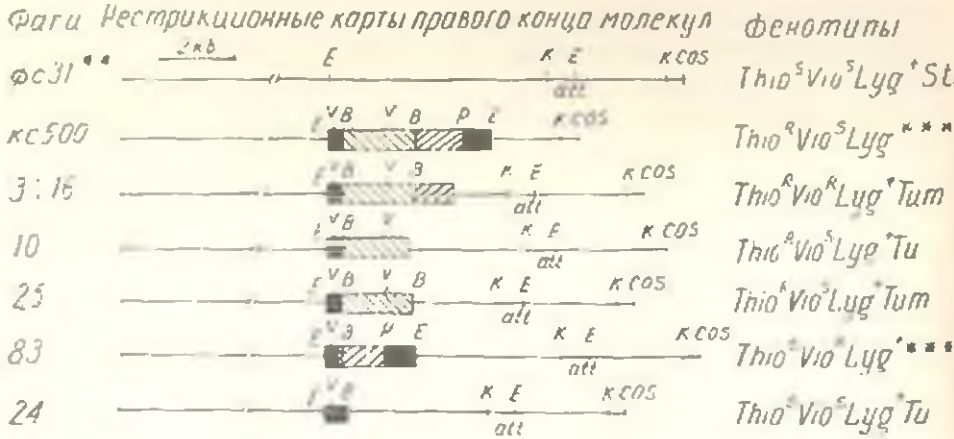
Важным этапом при осуществлении клонирования в штаммах актиномицетов с помощью фаговых векторов является необходимость проверки штаммов на наличие систем рестрикции и модификации (РМ) чужеродной ДНК. В табл. суммированы данные по идентификации РМ систем у ряда штаммов Streptomyces, таких как S. griseus, S. tradiae, S. cinnamonensis, продуцирующих антибиотики гризин, тилозин и монензин соответственно, S. albus G и Reg2, из которых изолированы эндонуклеазы, участвующие в рестрикции чужеродной ДНК in vivo. Как видно из данных таблицы, у ряда штаммов обнаружено по две системы рестрикции чужеродной ДНК. Кроме того, некоторые из этих РМ систем были перекрывающимися у штаммов различных видов.

Особый интерес представляют модельные штаммы S. coelicolor A3 (2) и S. lividans 66, которые широко используются в качестве реципиентов в опытах по молекулярному клонированию. Генетическое изучение взаимоотношений фага ØC31 со штаммом A3 (2) позволило нам заключить, что фаг ØC31 тестирует в штамме A3 (2) в присутствие системы РМ. Наблюдали строгую зависимость эффективности рассева фага ØC31 от предыдущего хозяина [1]. На основании результатов проведенных экспериментов нам удалось идентифицировать фенотипы R^+M^+, R^-M^+ и R^-M^- у ряда штаммов и показать одинаковую специфичность модифицирующих активностей штаммов A3(2) и 66.

Анализ генотипов межвидовых рекомбинантов, полученных при скрещивании штаммов A3 (2) R^+M^+ и 66 R^-M^+, позволил локализовать гены РМ на хромосомах этих штаммов. Были получены и исследованы рекомбинанты с различными перекрывающимися вкладами родительских хромосом.

Рекомбинанты с фенотипом R^+M^- содержали фрагменты хромосомы штамма A3 (2) в районах между маркерами adeA1 и strA1 или argA1 и cysD18. Замена этих фрагментов на фрагменты хромосомы





* – фаговый геном, ~~~ хромосома хозяина,
( ) делеция: фрагмент ДНК с pBR322 (▬), tsr (▭)
и vph (▭) генами

** контроль *** эффективность рассева на sol 43<10^8

E – EcoRI, V – EcoRV, K – KpnI, P – PstI, B – BamHI

Интеграция фага кс500 в резидентный профаг φc31
Структура и свойства ДНК рекомбинантных фагов,
образующихся в результате спонтанной индукции
двойного лизогенного штамма 66 (φc31, кс500)

Рис. 3. Схема образования фаговых рекомбинантов в процессе спонтанной индукции двойного лизогенного штамма и рестрикционный анализ ДНК этих фагов.

штамма 66 приводила к образованию рекомбинантов с фенотипом R^-M^-. На основании этих данных был сделан вывод о локализации PM генов между маркерами adeA1 и strA1 или argA1 и cysD18. Полученные рекомбинанты могут быть использованы в качестве реципиентов в

опытах по молекулярному клонированию на фаговых векторах. Использование рекомбинантов, у которых необходимые гены расположены в небольшом фрагменте хромосомы одного из родительских штаммов, увеличивает возможность отбора клонов с мутантным фенотипом среди рекомбинантных клонов, возникающих при включении векторного фа-

Таблица

Системы рестрикции и модификации штаммов Streptomyces, идентифицированные с помощью различных актинофагов

Штамм	РМ система	Рестриктазы	Фенотип штамма	Фаг-тестер	Группы РМ систем
S. coelicolor A3 (2)	ScoA I	—**	$R_I^+ M_I^+$	ØC 31	1
Reg 2	Seg 2 I	Seg2 I	$R_I^+ M_I^+$	Pg 81, Pg 2	1
S. griseus Kr. 20	Seg 20 I	Seg20 I	$R_I^+ M_I^+$	ØC 31, Pg 81, Pg 2	1
S. lividans 66	Sli 66 I	—	$R_I^- M_I^+$	ØC 31*	1
S. lividans 67	Sli 67 I	—	$R_I^+ M_I^+$	VP 5	2
S. tradiae B	StrB I	—	$R_I^+ M_I^+$	Pg 2	3
S. griseus Kr. 15	Sgr 15 I Sgr 15 II	—	$R_I^+ M_I^+ R_{II}^+ M_{II}^+$	Pg 81 Pg 2, ØC 2	4 3
S. griseus Kr. 15—13	Sgr 15 II	—	$R_I^- M_I^+ R_{II}^+ M_{II}^+$	Pg 2, ØC 2	3
S. albus G	SalG I SalG II	SalG I	$R_I^+ M_I^+ R_{II}^+ M_{II}^+$	Pg 2, ØC 31 Pg 2	5 6
S. albus G sal 43	SalG II	—	$R_I^- M_I^+ R_{II}^+ M_{II}^+$	Pg 2	6
S. albus G sal 2	SalG II	—	$R_I^- M_I^+ R_{II}^- M_{II}^+$	Pg 2	6

* Тестирует функционирование модифицирующего компонента PMSli 66 I системы
** —рестриктаза не выделена.

га по гомологии с клонируемым фрагментом. Дальнейшие исследования в этой области будут способствовать отбору удобных реципиентов изолированной ДНК, в которых могут быть совмещены свойства стандартного реципиентного штамма 66 и генетически маркированного штамма A3 (2). Арсенал имеющихся генетических приемов, доступных при работе с фагом ØC31, достаточен для того, чтобы оценить взаимоотношения этого фага со штаммами, в которые предполагается переносить клонируемые на фаговом векторе гены с помощью фаговой инфекции.

Суммируя вышеизложенное, можно считать, что степень генетической и физической изученности актинофагов, а также результаты анализа их взаимоотношений с культурами актиномицетов могут служить реальной предпосылкой для решения теоретических и прикладных задач генетики актиномицетов.

ВНИИГенетика, Москва

Поступило 13.VIII 1985 г.

ԱԿՏԻՆՈՖԱԳՆԵՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱՆ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ՓՈԽՀԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ԱԿՏԻՆՈՄԻՑԵՏՆԵՐԻ ՀԵՏ

Ն. Դ. ԼՈՄՈՎՍԿԱՅԱ, Ն. Մ. ՄԿՐՏՈՒՄՅԱՆ, Տ. Ա. ՎՈՒՅԿՈՎԱ,
Գ. Լ. ՄՈՒՐԱՎՆԻԿ, Ե. Վ. ՊԵՐՈՎԱ

Ներկայացված է ակտինոֆագերի գենետիկայի և Streptomyces տեռերի հետ նրանց փոխազդեցության որոշ ասպեկտների ամփոփումը։ ØC31 ֆագի բարեզավորման վերաբերյալ գենետիկական և ֆիզիկական տվյալները հիմք են ստեղծում ֆագի դելեցիոն մուտանտների օգտագործման համար վեկտորները կառուցելիս։ ØC43 աղդակից ֆագի գենետիկական և ֆիզիկական ուսումնասիրությունները մատնանշում են բարձր հաճախականությամբ դելեցիաները առաջացնող IS-նման տարուկտուրայի ներկայությունը նրա գենոմում։ Ցույց է տրված ØC43 ԴՆԹ կառուցվածքային մոդիֆիկացիաներով in vivo ֆագերի սելեկցիայի հնարավորությունը։

Հանրագումարի են բերված տեռերի կողմից հակողության տակ գտնվող ռեստրիկցիոն և մոդիֆիկացիոն սիստեմի գենետիկական ուսումնասիրությունները, ինչպես նաև այդ սիստեմների տարածվածությունը Streptomyces տեսակների շրջանում։ Ընդգծված է ակտինոֆագերի մոլեկուլյար կենսաբանության և գենետիկայի վերաբերյալ տվյալների դերը ակտինոմիցետների ֆունդամենտալ և կիրառական ուսումնասիրությունների համար։

GENETICS OF ACTINOPHAGES AND THEIR RELATIONSHIPS WITH ACTINOMYCETES

N. D. LOMOVSKAYA, N. M. MKRTUMIAN, T. A. VOEYKOVA,
G. L. MURAVNIK, E. V. PEROVA

A review of genetics of actinophages and some aspects of their relation to *Streptomyces* hosts is presented. Data on genetic and physical mapping of temperate ØC31 phage are shown to provide the basis for using deletion phage mutants in construction of phage vectors. Genetic and physical studies of related ØC43 phage have shown the presence in the phage genome of IS—like structure which generates deletions with high frequency. The possibility of *in vivo* selecting phages with structural ØC43 DNA modifications is demonstrated.

Genetic studies of host—controlled restriction and modification systems in actinomycetes are summarized and distribution of these systems among *Streptomyces* species is shown.

The role of the data on genetics and molecular biology of actinophages in fundamental and applied studies of actinomycetes is emphasized.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ломовская Н. Д., Воскова Т. А., Орехова А. В.* Мол. генет., микробиол. и вирусол., 6, 12—17, 1984.
2. *Ломовская Н. Д., Мкртумян Н. М., Гостимская Н. Л.* Генетика, 6, 135—137, 1970.
3. *Сладкова Н. А., Ключкова О. А., Ломовская Н. Д.* Мол. биол., 16, 739—744, 1982.

4. *Сладкова И. А., Клочкова О. А., Чиненова Т. А., Ломовская Н. Д.* Мол. биол., *18*, 497—503, 1984.
5. *Сладкова И. А., Чиненова Т. А., Ломовская Н. Д., Мкртумян Н. М.* Генетика, *15*, 1953—1962, 1979.
6. *Chater K. F.* Proc. of 4th Intern. Symp. on Genet. of Industr. Microorganisms, Kyoto, 1983.
7. *Chater K. F., Hopwood D. A.* The actinomycetes, Acad. Press, London, 1982.
8. *Dowding J. E., Hopwood D. A.* J. Gen. Microbiol., 78, 349—359, 1973.
9. *Lomovskaya N. D., Chater K. F., Mkrtumian N. M.* Microbiol. Rev., *44*, 206—229, 1980.
10. *Lomovskaya N. D., Emeljanova L. K., Mkrtumian N. M., Altkhanian S. I.* J. Gen. Microbiol., *77*, 455—463, 1973.
11. *Lomovskaya N. D., Sladkova I. A., Klochkova O. A., Orekhov A. O., Chinenova T. A., Mkrtumian N. M.* Proc. of 4th Intern. Symp. on Genet. of Industr. Microorganisms, Kyoto, 1983.
12. *Lomovskaya N. D., Voeykova T. A., Klochkova O. A., Muravnik G. L., Sladkova I. A.* Abstracts of 6th Intern. Congress of Virology, Delhi, 1984.

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

СИСТЕМА КОНЪЮГАЦИОННОГО ПЕРЕНОСА Hg^r ПЛАЗМИД У ACINETOBACTER

С. З. МИНДЛИН, Ж. М. ГОРЛЕНКО

В почвенных бактериях из рода Acinetobacter, выделенных из Хайдарканского ртутно-сурьмяного месторождения, присутствуют две плазмиды, несущие детерминанты устойчивости к соединениям ртути. Более крупная, pKL2 (60 т. п. н.), способна к конъюгативному переносу в чувствительные клетки Acinetobacter. Менее крупная, pKL1 (7,5 т. п. н.), не обладает конъюгативными свойствами, но с помощью pKL2 может проникать в чувствительные к ртути бактерии, в том числе далекие в систематическом отношении. Предполагается, что система конъюгативного переноса Hg^r детерминант, обнаруженная у Acinetobacter, может обеспечить распространение устойчивости к соединениям ртути среди широкого круга бактерий.

Ключевые слова: Acinetobacter, Hg^r детерминанты, конъюгативные плазмиды.

Ранее было показано, что в грунте шахты Хайдарканского ртутно-сурьмяного месторождения обитают бактерии различных систематических групп, устойчивые к соединениям неорганической ртути ($HgCl_2$) [2, 5]. В большинстве случаев Hg^r детерминанты были локализованы на плазмидах различного размера. Наше внимание привлекла плазмида, обнаруженная в нескольких штаммах Acinetobacter (Ps13—Ps18), обозначенная pKL1 [1]. Это небольшая плазмида, величиной в 7,5 т. п. н., характеризующаяся широким кругом хозяев. Сама по себе pKL1 не обладает конъюгативными свойствами, но с частотой 10^{-3}—10^{-5} может переходить из исходных штаммов Acinetobacter в клетки многих перод-

ственных видов бактерий. В штамме Ps18, наряду с pKL1, присутствует более крупная плазмида величиной ~60 т. п. н. Ей, предположительно, и приписали свойство конъюгативности, а также способность мобилизовывать плазмиду pKL1 [1].

Настоящая работа посвящена дальнейшему изучению природных плазмид, детерминирующих устойчивость к солям ртути.

Материал и методика. Штаммы. Acinetobacter Ps18, устойчивый к $HgCl_2$, описан ранее [1,2,5]. В качестве Hg^s реципиентов использовали Pseudomonas aeruginosa ML4232str-r, а также представителей рода Acinetobacter: A. calcoaceticus BD 413, любезно предоставленный Э. Джуни, A. calcoaceticus var. Iwoffi, полученный от М.З. Юрьева, и Acinetobacter sp.W14—180, являющийся Hg^s производным штамма W14. W14, как и Ps18, выделен из грунта Хайдарканского месторождения, но из другой пробы. W14—180 отобран нами в потомстве W14—1 (str^r мутант W14) после его облучения УФ лучами и подращивания выживших клеток при субletальной температуре (38,5°).

Среды. Культуры бактерий выращивали на стандартных средах LB и NB. При отборе трансконъюгантов использовали агаризованную среду NB с добавками $HgCl_2$ (5 мкг/мл) и стрептомицина (100—200 мкг/мл) или рифампицина (40 мкг/мл), как описано ранее [1].

Конъюгационные скрещивания проводили путем 16—20-часового выращивания смешанных культур на агаре Хоттингера с последующим высевом проб из различных разведений на селективные среды [1].

Электрофорез образцов ДНК проводили в блоке 1%-ного агарозного геля, 12×11 см, в трис-ацетатном буфере при 100 В в течение 4 часов.

Для выявления плазмид использовали модифицированный метод Эккарда [4], как описано ранее [2].

Результаты и обсуждение. Конъюгативные свойства и плазмидный состав трансконъюгантов Ps18×Acinetobacter Hg^s. При скрещивании Ps18 с бактериями других систематических групп в клетках трансконъюгантов неизменно обнаруживалась pKL1, тогда как pKL2 во всех случаях отсутствовала [1]. Поэтому предположили, что либо pKL2 не обладает конъюгативными свойствами, либо она нежизнеспособна в клетках неродственных бактерий или не передается в них при конъюгации. Первому предположению противоречат факты конъюгативного переноса pKL1 из Ps18 в другие бактерии, хотя сама pKL1 этой способностью не обладает [1]. Для проверки второго предположения были проведены близкородственные скрещивания Acinetobacter Ps18 Hg^r × Acinetobacter Hg^s с использованием в качестве реципиентов различных представителей рода Acinetobacter.

Во всех скрещиваниях с частотой $1-3\times10^{-3}$ обнаруживались Hg^r-колонии (часть данных представлена в табл. 1). Очевидно, что если pKL2 обладает способностью к конъюгации, она должна присутствовать в клетках хотя бы некоторых трансконъюгантов наряду с pKL1.

Чтобы выявить трансконъюганты такого типа, мы провели повторный цикл скрещиваний, в которых использовали в качестве реципиентов как Acinetobacter, так и Pseudomonas, при этом исходя из допущения, что трансконъюганты, приобретшие обе плазмиды (pKL1 и pKL2), будут образовывать Hg^r рекомбинанты в скрещиваниях с обоими реципиентными штаммами. В то же время трансконъюганты, содержащие только pKL1, не дадут Hg^r трансконъюгантов ни в одном из

Таблица 1

Частота переноса Hg^r плазмид и плазмидный состав трансконъюгантов

Трансконъюганты Ps18×W14–180*		Частота конъюгац онного переноса плазмид в скрещиваниях с**		Наличие плазмид в исходных трансконъюгантах (данные электрофореза)
тип	число	Acinetobacter (BSW27–2)	Pseudomonas (ML4262 str^r)	
I	4	$1.0–2.5\times10^{-3}$	$1.5–5.0\times10^{-4}$	pKL1, pKL2
II	3	$<2.5\times10^{-9}$	$<2.5\times10^{-9}$	pKL1
III	9	$1.5–2.5\times10^{-3}$	$<2.5\times10^{-9}$	pKL2

* Аналогичные результаты получены для трансконъюгантов Ps18×Acinetobacter BSW27-1 и BD413.

** Частоту переноса определяли как отношение числа Hg^r колоний к общему числу колоний

скрещиваний (см. схему, рис. 1). Результаты подтвердили это предположение (табл. 1 и рис. 2). В дополнение к двум указанным типам Hg^r трансконъюгантов неожиданно был обнаружен еще один. Как показали данные электрофоретического анализа, в клетках этого типа

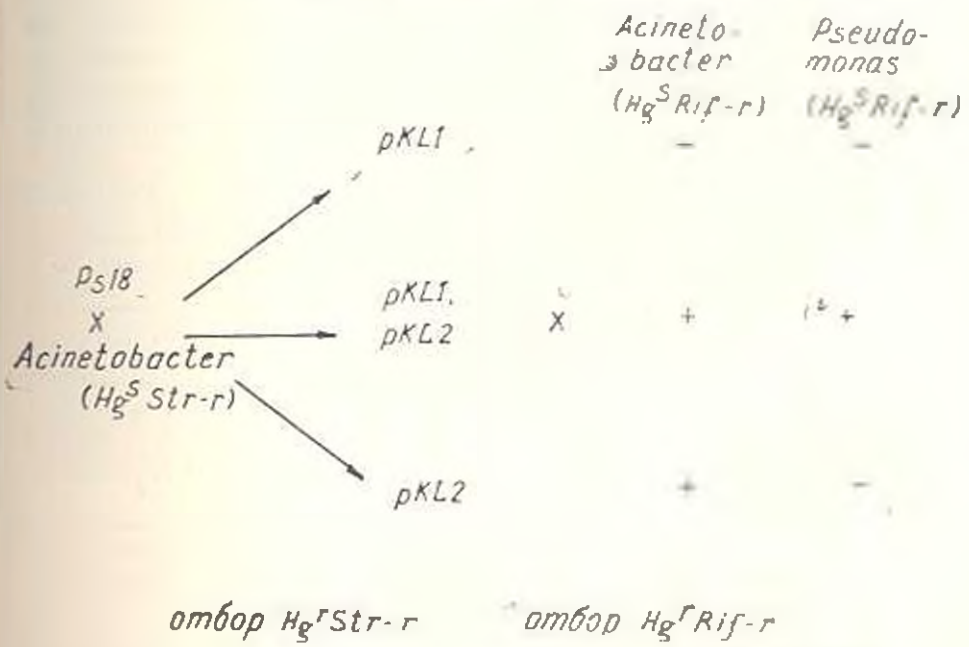


Рис. 1. Определение конъюгативных свойств плазмиды pKL2 (схема)
«+» присутствие Hg^r Rif^r рекомбинантов в соответствующих скрещиваниях
«–» отсутствие Hg^r Rif^r рекомбинантов в скрещиваниях.

присутствует только плазмида величиной 60 т. п. н., т. е. pKL2 (см. рис. 2, тип III). Такой тип Hg^r трансконъюгантов передает признак в последующих скрещиваниях только реципиентным штаммам Acinetobacter (табл. 1).

Из полученных данных следует несколько заключений: pKL2 несет детерминанты устойчивости к ртути; она является конъюгативной плазмидой с узким кругом хозяев, по-видимому, ограниченным видами

Acinetobacter; присутствие этой плазмиды обеспечивает конъюгативный перенос pKL1 в неродственные бактерии.

Конъюгативные свойства pKL2, в частности ее способность мобилизовывать неконъюгативную плазмиду pKL1, могут способствовать распространению последней среди почвенных бактерий, прежде всего представителей Acinetobacter. Вопрос особенно интересен при выяснении путей «горизонтальной» эволюции Hg^r факторов в ареале ртутного месторождения [2, 5]. В связи с этим исследовались свойства Hg^r плазмид у независимо выделенных штаммов Acinetobacter.

Распространенность pKL1 и pKL2 в штаммах Acinetobacter, выделенных из грунта Хайдарканского рудника. Смешанные культуры бактерий, устойчивых к ртути, были заложены на хранение в виде лиофильно высушенных образцов [2, 5]. Они и были использованы в качестве исходного материала при выделении новых штаммов Acinetobacter, идентифицированных в соответствии с описанием этого рода [3]. Мы изолировали свыше 30-ти штаммов этих бактерий, в дополнение к выделенным ранее Р. Б. Хесиным [2, 5].

Наличие конъюгативных Hg^r плазмид в клетках всех штаммов и размеры плазмид устанавливали по способности передавать признак Hg^r реципиентам Acinetobacter и Pseudomonas и результатам электрофоретического анализа плазмидной ДНК соответственно. Полученные данные сведены в табл. 2. Они свидетельствуют о частой встречаемости

Таблица 2

Распространенность pKL1 и pKL2 в Hg^r штаммах Acinetobacter

Место отбора проб	№ пробы	Всего изучено штаммов	Из них, содержащих плазмиды	
			pKL2	pKL1, pKL2
Штольня,	7′	16	6	7
~300 м	7″	9	9	—
от входа	7‴	5	3	1
Штольня,	8′	2	2	—
~100 м	8″	2	1	1
от входа	8‴	2	2	—

конъюгативной плазмиды величиной 60 т. п. н. среди штаммов, выделенных из различных проб грунта. Можно предположить, что этой плазмидой является pKL2. Плазмиду с молекулярной массой, характерной для pKL1, удалось выявить только в половине проб, причем во всех случаях в клетках одновременно присутствовала плазмида с молекулярной массой 60 т. п. н.

Таким образом, мы обнаружили систему конъюгационного переноса Hg^r детерминант, находящихся на плазмидах Acinetobacter. По-видимому, она не только обеспечивает распространение детерминан

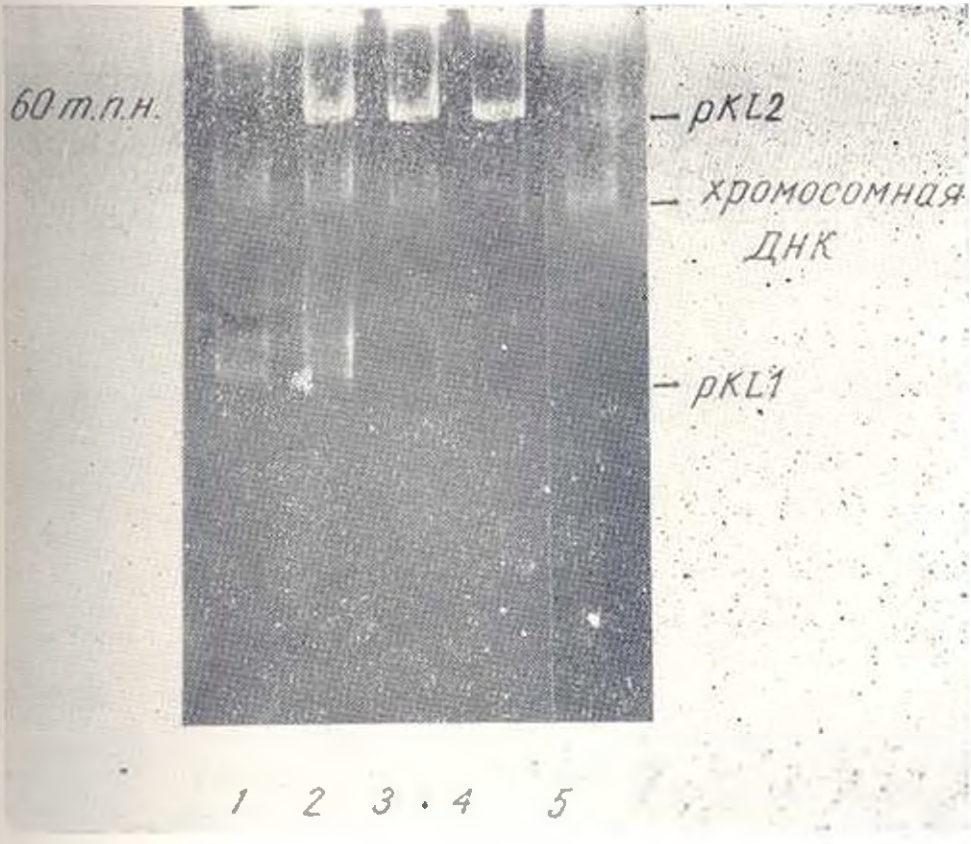


Рис. 2. Плазмиды различных типов трансконъюгантов от скрещивания Ps18×W11—180: 1—тип II (pKL1); 2—тип I (pKL1, pKL2); 3, 4—тип III (pKL2), 5—реципиент W11—180. Положение свидетеля—плазмиды RP1 (60 т. п. н.) и Hg' плазмид указано стрелками.

устойчивости к ртути внутри рода Acinetobacter, но и обладает потенциальными способностями к их миграции в неродственные бактерии. Дальнейшие исследования покажут, происходит ли это на самом деле.

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва Поступило 13.VIII 1985 г.

Hg^r —ՊԼԱԶՄԻԴՆԵՐԻ ԿԱՆՅՈՒՊԱՑԻՈՆ ՓՈԽԱՆՑՄԱՆ ՍԻՍՏԵՄԸ ACINETOBACTER-Ի ՄՈՏ

Ս. Զ. ՄԻՆԴԼԻՆ, Հ. Մ. ԳՈՐԼԵՆԿՈ

Խանդարկանի անդիկա-ծարրային հանքավայրից անջատված Acinetobacter ւեռի հողային բակտերիաներում առկա են 2 պլազմիդներ, որոնք կրում են սնդիկի միացություններին նկատմամբ կայունության դետերմինանտներ. pKL2(60 ն. հ. զ.) պլազմիդը ընդունակ է կոնյուգատիվ փոխանցման Acinetobacter-ի բջիջներում. pKL1 (7,5 ն. հ. զ.) պլազմիդը չունի կոնյուգատիվ առանձնահատկություններ, բայց pKL2-ի օգնությամբ կարող է ներթափանցել սնդիկի նկատմամբ զգայուն բակտերիաների մեջ, այդ թվում սիստեմատիկ տեսանկյունից հեռավորների մեջ։ Ենթադրվում է, որ Acinetobacter-ի մոտ հայտնաբերված Hg^r-դետերմինանտների կոնյուգատիվ փոխանցման սիստեմը կարող է ապահովել սնդիկի միացությունների նկատմամբ կայունությունը բակտերիաների լայն շրջանում։

SYSTEM OF CONJUGATION TRANSFER OF THE Hg^r PLASMIDS IN *ACINETOBACTER SP.*

S. Z. MINDLIN, G. M. GORLENKO

In soil bacteria of the *Acinetobacter sp.* isolated in the Khaidarkan mercury and antimony mine there are two mercury—resistant plasmids. The larger plasmid, pKL2 (60 kb) is capable of conjugational transfer to *Acinetobacter* sensitive cells. The smaller one, pKL1 (7,5 kb) displays no such transfer but with the aid of pKL2 can penetrate into mercury sensitive bacteria including those systematically remote. It is suggested that the Hg^r determinant conjugational transfer system revealed in *Acinetobacter* might be responsible for the distribution of $HgCl_2$ resistance in diverse bacteria.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ломовская О. Л., Мандлин С. З., Горленко Ж. М., Хесин Р. Б.* Генетика, *21*, 1985.
2. *Хесин Р. Б.* Мол. биол., *19*, 505—515, 1985.
3. *Baumann P., Doudoroff M., Stanier R. Y.* J. Bacteriol., *95*, 1520—1541, 1968.
4. *Eckhardt T.* Plasmid, *1*, 584—588, 1978.
5. *Khesin R., Karasyova E.* Mol. Gen. Genet., *197*, 280—285, 1984.

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

УДК 575.24:576.851

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ pAS8-121 У RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES

С. В. КАМЕНЕВА, А. Н. ДУБЕНКОВСКИЙ, Т. П. ПОЛИВЦЕВА

Предложена система конъюгации на основе плазмиды pAS 8-121, дающая возможность вводить транспозоны (Tn) и плазмиду в хромосому пурпурной несерной фототрофной азотфиксирующей бактерии Rhodopseudomonas sphaeroides. Осуществлены транспозиция Tn7 и введение плазмид pAS 8-121 и pAS 8-121::Tn5 в хромосому этой

бактерии, в результате чего индуцированы хромосомные мутации и вторичные перестройки хромосомной ДНК. Показано, что клетки пурпурной бактерии, несущие хромосомы с включенной в них плазмидой pAS 8-121, являются донорами, осуществляющими поляризованный перенос хромосомных маркеров; получена коллекция Hfr-штаммов, мобилизующих хромосому R. sphaeroides с различных точек. Выделены R′ варианты pAS 8-121, несущие фрагменты хромосомы пурпурной бактерии.

Ключевые слова: конъюгация, плазмиды с широким спектром хозяев, транспозон, фототрофные бактерии.

Собственных систем переноса генов у фототрофной бактерии R. sphaeroides не обнаружено. В ряде лабораторий предпринимаются попытки использовать для создания систем конъюгации у этой бактерии широкотрансмиссивных плазмид других бактерий. Показано, что в клетки R. sphaeroides с высокой эффективностью передаются конъюгативные плазмиды P1 группы несовместимости от E. coli и Pseudomonas aeruginosa. Переданные плазмиды стабильны в клетках нового хозяина и способны обеспечивать его внутривидовую и межвидовую конъюгацию [2, 8, 10, 13, 14]. Однако мобилизации хромосомы R. sphaeroides плазмиды P1 группы в большинстве случаев не способствовали или обеспечивали перенос хромосомных генов этой бактерии с очень низкой частотой [2, 8, 14]. Включение в плазмиды мигрирующих элементов (Tn и бактериофага Mu), как правило, не давало стабильного повышения частоты переноса хромосомных генов [2, 15], за исключением отдельных случаев, специфичных для определенных штаммов [11, 13]. Недавно Нюлером с соавторами сконструирована система для введения в геном фототрофных бактерий транспозонов [12].

Нами на основе плазмиды pAS 8-121 предложена система для введения в хромосому пурпурной бактерии транспозонов и получения у нее Hfr-доноров.

Материал и методика. *Штаммы бактерий*, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Среды. Полноценной средой служил L-бульон или L-агар [3], минимальной средой—среда Систрома [13]. Необходимые аминокислоты и основания добавляли в концентрации 20 мкг/мл. Антибиотики вносили в следующих количествах (в мкг/мл): ампициллин (Ap)—250, канамицин (Km) и мономицин (Mn)—50, стрептомицин (Sm)—25 для E. coli и 50—для R. sphaeroides, триметоприм (Tp)—20.

Конъюгационные скрещивания между штаммами E. coli проводили в жидкой L-среде по Миллеру [3], межродовые (E. coli с R. sphaeroides) и между штаммами R. sphaeroides—на твердой среде. В опытах по передаче Tn и плазмид в клетки пурпурных бактерий использовали минимальный агар, а при переносе хромосомных маркеров—L-агар. При скрещивании свежие культуры клеток донора и реципиента смешивали в соотношении 1:1 или 1:10. По 10 мкл конъюгационной смеси наносили капель на поверхность агаризованной среды в чашке Петри. В качестве контроля таким же способом наносили по 5 мкл культур донора и реципиента в отдельности. После 16—20 ч инкубации при 32° бактериальные клетки с каждого пятна суспендировали в 1—2 мл физиологического раствора и в соответствующих разведениях высевали на селективные среды для определения титров клеток донора и реципиента, трансконъюгантов или рекомбинантов.

Мутагенез. Обработку клеток E. coli этилметансульфонатом при получении Km^s вариантов плазмиды pAS 8-121 проводили по методике, описанной Миллером [3].

Плазмидную ДНК выделяли экспресс-методом [7].

Таблица 1

Штаммы бактерий, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
E. coli K—12:		
J 53 (pAS 8—121)	(λ) pro met (Ap^r Tc^r Km^r Et^{imm} Tra$^+$ RepA::Tn7)	ВНИИ Генетика, Москва
J 53 (pAS 8—121)	(λ) pro met (Ap^r Tc^r Km^r::Tn7 Et^{imm} Tra$^+$ Rep^{ts})	ВНИИ Генетика, Москва
HB 101	thi leu pro gal lac str^r recA rk$^-$ mk$^-$	ВНИИ Генетика, Москва
C 600 Mn^{dp}	tar thr leu Mn^{dp} Sm^{dp}	ВНИИ Генетика, Москва
KS 1324	thi thr leu his arg lac str^r::Tn5	НИИМ им. Н. Ф. Гамалеи, Москва
GC 146	pro met his mal3 lac gal str^r	
R. sphaeroides 2R	прототроф	МГУ, биологический факультет, кафедра микробиологии
Производные 2R		
ade 9	ade 9 rif^r str^r	Получены нами ранее [2]
ade 41	ade 41 rif^r str^r	
ade 42	ade 42 rif^r str^r	
arg 6	arg 6 rif^r str^r	
met 83	met 83 rif^r str^r	
phe 6	phe 6 rif^r str^r	
trp 1	trp1 rif^r str^r	
his 11	his 11 rif^r str^r	
his 22	his 22 rif^r str^r	
his 25	his 25 rif^r str^r	
his 40	his 40 rif^r str^r	
met 83 his 5	met 83 his 5 rif^r str^r	

а) В скобки заключены гены плазмид; Tn7 несет гены Sm^r Tp^r, Tn5 — Km^r.

Электрофорез проводили в 0,5%-ном агарозном геле в горизонтальном аппарате в течение 5—6 ч при напряжении 100 В, применяя Трис-боратный электродный буфер (Трис—90 мМ; борная кислота—90 мМ ЭДТА—2,5 мМ). Исследуемые препараты до нанесения на гель смешивали в пропорции 1:1 с раствором, содержащим бромфеноловый синий—0,07%, SDS—7%, глицерин—33%. Гель окрашивали бромистым этидием (2—5 мкг/мл в течение 20 мин), после чего смывали в течение часа и фотографировали в УФ свете на фотопленку «Микрат» с оранжевым светофильтром.

Обработку препаратов ДНК рестриктазой EcoRI осуществляли в течение 1—2 ч при 37° в буфере: Трис HCl—6,0 мМ, $MgCl_2$—6,0 мМ, NaCl—0,15 М, бычий сывороточный альбумин (BSA)—0,1 мг/мл, pH 7,9. Реакцию останавливали прогреванием при 65° в течение 5 минут.

Результаты и обсуждение. Транспозиция Tn7 и интеграция плазмид pAS8-121 и pAS8-1213 в геном R. sphaeroides 2R. Для введения транспозонов в клетки штамма 2R пурпурной бактерии использовалась сконструированная in vitro на основе плазмид RP4 и ColE1 гибридная плазмида pAS 8-121 со вставкой транспозона Tn7 в ответственную за репликацию (repA) область ДНК RP4 [5]. Эта плазмида широкотрансмиссивна за счет tra генов RP4 и реплицируется в E. coli за счет системы репликации ColE1; в клетках R. sphaeroides 2R pAS 8-121 реплицироваться не может.

Нами введен в pAS 8-121 дополнительно еще Tn5. Предварительно плазмида pAS 8-121 была модифицирована: в результате обработки клеток E. coli J53 (pAS 8-121) этилметансульфонатом был выделен Km^r вариант—pAS 8-1211. Последний был конъюгативно введен в клетки штамма KS 1324, несущего Tn5 в хромосоме. Затем при скрещивании двух штаммов E. coli KS 1324 (pAS 8-121) и GC 146, стандартным методом была получена плазмида pAS 8-121::Tn5, обозначенная pAS 8-1213.

Транспозиция Tn7 и Tn5 в геном пурпурной бактерии осуществлялась в проводимых на минимальном агаре межродовых скрещиваниях 2 R с последующим высевом конъюгационной смеси на селективные среды с антибиотиками, устойчивость к которым определяется транспозонами: стрептомицином в случае Tn7 и канамицином в случае Tn5. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 2. Видно, что маркеры Sm^r и Km^r наследуются клетками пурпурной бактерии с частотами 10^{-5} и 10^{-5} соответственно. В случае Tn7 осуществляется как индивидуальная миграция транспозона в геном R. sphaeroides, так и наследование его в составе плазмиды pAS 8-121; Tn5 наследуется преимущественно в составе плазмиды pAS 8-1213.

Все трансконъюганты, несущие признаки транспозонов и плазмид, как было показано при электрофоретическом анализе экстрахромосомной ДНК, не содержали в клетках автономных плазмид pAS 8-121 и pAS 8-1213 и не передавали контролируемых ими признаков лекарственной устойчивости другим штаммам R. sphaeroides при скрещивании.

Локализация включений Tn7 и плазмид pAS 8-121 и pAS 8-1213 в геноме R. sphaeroides 2R. Вставок Tn7 и плазмид pAS 8-121 и pAS 8-1213 в криптические плазмиды пурпурной бактерии (м. в. 69 и 94 Мд)

Таблица 2

Передача признаков Tn7 и плазмид pAS 8-121 и pAS 8-1213 от E. coli K-12 в R. sphaeroides 2B при конъюгации

Доноры-штаммы E. coli K—12	Трансконъюганты			
	селектируемые признаки Tn	частота переноса на клетку донора б)	наследование признаков плазмид	
			признак	частота, %
J53 (pAS 8-121)	Sm^r	$1-3\cdot10^{-6}$	Km^r	80
QC 145 (pAS 8-1213)	Km^r	$1-5\cdot10^{-5}$	Tp^r	100
J53 (pAS 8-101)а)	Sm^r	$5-8\cdot10^{-3}$	Km^r	100

а) — Плазмида, используемая в качестве контрольной, несет Tn7, внедренный в ген aph, и реплицируется в клетках R. sphaeroides 2R.

б) — частота спонтанного возникновения Sm^r и Km^r мутаций у R. sphaeroides 2R — 10^{-8} и менее 10^{-9} на клетку соответственно.

Таблица 3

Мутанты, индуцированные у R. sphaeroides 2R в результате внедрения Tn7 и плазмиды pAS 8—1213

Фенотип мутантов		Ауксотрофные							Пигментные	
		Ade	Ura	Trp	Phe	Met	Aro	His	Crt—w	Crt—g
Число мутантов, индуцированных:	Tn7	4	0	2	1	1	1	0	0	2
	pAS 8—1213	3	7	0	0	0	0	1	3	1

обнаружено не было [1]. По-видимому, они встраиваются преимущественно в хромосому, так как среди трансконъюгантов, несущих Tn7 и плазмиду pAS 8-1213 с частотами 0,4 и 0,8% соответственно, были получены ауксотрофные и пигментные мутации. Спектры их представлены в табл. 3 и показывают, что обе эти структуры могут включаться в хромосому пурпурной бактерии в различающихся для этих двух случаев точках. У клонов с включениями в хромосому Tn7 или плазмид pAS 8-121 и pAS 8-1213 были выделены вторичные ауксотрофные мутанты [1], что указывает на возникновение хромосомных перестроек в областях их интеграции.

Плазмида pAS 8-121 может быть использована для введения в геном R. sphaeroides других транспозонов с целью получения мутаций либо более значительных перестроек генетического материала.

Выделение Hfr-штаммов. Способность плазмиды pAS 8-121 индуцировать мутации и вторичные перестройки в хромосоме пурпурной бактерии свидетельствует об ее ассоциации с хромосомой. В состоянии коинтеграта с последней плазмида должна обеспечивать ее мобилизацию с высокой частотой при конъюгации. Для проверки этой возможности один из ауксотрофных мутантов, возникших в результате внедрения в

хромосому штамма 2R плазмиды pAS 8-121, был использован в качестве донора в скрещиваниях с шестью реципиентами, несущими различные ауксотрофные мутации. Скрещивания проводили на полной среде, рекомбинанты отбирались на минимальной среде по признаку прототрофности. Как видно из табл. 4, донор 2R sul::pAS 8-121 обеспечивал

Таблица 4

Перенос хромосомных маркеров R. sphaeroides в скрещиваниях донора 2R sul::pAS 8-121 и различными ауксотрофами

Реципиенты — производные штамма 2R		Максимальная частота возникновения прототрофных рекомбинантов на клетку донора
переносимый маркер	частота реверсий	
ade 41	$<1\cdot10^{-8}$	$1.5\cdot10^{-3}$
phe 6	$0.4\cdot10^{-8}$	$1.3\cdot10^{-4}$
trp 1	$0.5\cdot10^{-8}$	$1.0\cdot10^{-5}$
arg 6	$<1\cdot10^{-8}$	$8.4\cdot10^{-4}$
ade 42	$<0.3\cdot10^{-8}$	$3.2\cdot10^{-6}$
ade 9	$0.3\cdot10^{-8}$	$2.6\cdot10^{-6}$

Частота реверсий к sul^+ — $1\cdot10^{-7}$.

передачу хромосомных маркеров пурпурной бактерии с высокой частотой. При этом наблюдался градиент частот образования рекомбинантов по разным маркерам от 10^{-3} до 10^{-6} на клетку донора. По-видимому, внедрение в хромосому штамма 2R плазмиды pAS 8-121 приводит к возникновению Hfr клонов R. sphaeroides 2R.

С целью получения коллекции Hfr-штаммов плазмида pAS 8-121 в межродовых скрещиваниях была введена от E. coli J53 (pAS 8-121) в хромосомы трех ауксотрофных мутантов штамма 2R: met83 his5, met83, arg6. 29 клонов, полученных в результате независимых внедрений pAS 8-121 в хромосомы этих мутантов (9 в первом случае и по 10 во втором и третьем), анализировались на способность к передаче хромосомных маркеров в конъюгационных скрещиваниях с десятью ауксотрофными реципиентными штаммами. Отбор рекомбинантов проводили на минимальной среде по признаку прототрофности.

Все клоны пурпурной бактерии, несущие в хромосоме плазмиду pAS 8-121, оказались способными к передаче с высокой частотой хромосомных маркеров. При этом во всех случаях наблюдался градиент частоты переноса различных маркеров от 10^{-3} до 10^{-7} на клетку донора. По градиенту передачи различных маркеров все доноры были разделены на пять групп (табл. 5).

Следует отметить, что описываемые эксперименты позволяют определить порядок передачи донорами различных маркеров лишь грубо, так как каждый из доноров скрещивался с набором реципиентов, каждый из которых нес одну ауксотрофную мутацию. Тем не менее результаты, суммированные в табл. 5, позволяют заключить, что плазмида pAS 8-121 встраивается в хромосому пурпурной бактерии в несколь

Таблица 5

Характеристика Hfr-доноров R. sphaeroides 2R

Доноры		Порядок передачи маркеров
тип	число клонов	
I	4	his (11, 22, 25, 40) met 83 ade 41 phe 6 trp 1
II	4	met 83 ade 41 phe 6 trp 1
III	15	ade 41 phe 6 trp 1 arg 6
IV	4	trp 1 phe 6 ade 41
V	2	arg 6 trp 1 phe 6 ade 41

ких точках. Это обеспечивает возможность получения Hfr-доноров этой бактерии, передающих ее хромосому с разных точек, и грубо определить порядок проанализированных мутаций на хромосоме (рис.).

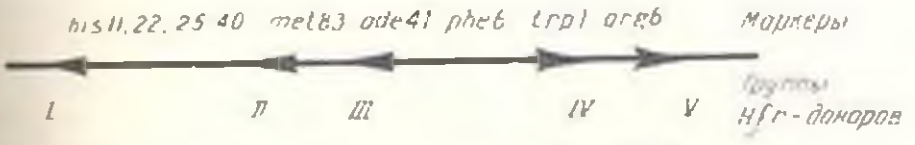


Рис. Порядок передачи маркеров R. sphaeroides 2R Hfr — донорами.

Полученные Hfr-доноры могут быть использованы для локализации различных мутаций на генетической карте R. sphaeroides 2R при скрещивании с множественно маркированными реципиентами или при учете сцепления анализируемых аллелей с каким-либо тестерным геном.

Селекция R′ плазмид, несущих фрагменты хромосом R. sphaeroides. Наличие коинтеграторов плазмиды pAS 8-121 с хромосомой R. sphaeroides (Hfr-штаммы) открывает перспективы получения R′ плазмид, несущих участки хромосомы этой бактерии. С целью изучения стабильности коинтеграторов клоны R. sphaeroides 2R::pAS 8-121 скрещивали с E. coli HB 101. В случае распада коинтеграта плазмида должна передаваться в клетки E. coli в автономном состоянии. Тестом на передачу pAS 8-121 в E. coli HB 101 служило приобретение клетками кишечной палочки устойчивости к канамицину, контролируемой плазмидным геном.

Анализ сорока клонов 2R::pAS 8-121 показал, что в 80% случаев плазмида передавалась из состояния коинтеграта в клетки кишечной палочки с частотами 10^{-1} — 10^{-4} на клетку донора. Электрофоретический анализ плазмидной ДНК у Km^r трансконъюгантов E. coli HB 101 подтвердил наличие в них одной плазмиды, не отличающейся по молекулярной массе от исходной pAS 8-121. Следствием разрешения коинтеграта хромосомы R. sphaeroides с pAS 8-121 с исключением автономной плазмиды является возможность образования R′ плазмид различной структуры.

Выделение R′ плазмид по их способности комплементировать ауксотрофные мутации E. coli K-12, классический метод отбора R′ факторов [9], не дало положительных результатов.

Был предпринят поиск R′ плазмид среди исключенных из коинтегратов делетированных вариантов pAS 8-121. Предполагалось, что делетированные участки плазмидной ДНК могут быть замещены фрагментами хромосомы R. sphaeroides. Для получения делетированных плазмид был использован феномен, обнаруженный Мироновым с соавт. [4], которые показали, что при конъюгативном переносе плазмид с генами Km^r (Sm^r) в мономицин- или стрептомицинзависимые (Mn^{dp} Sm^{dp}) штаммы E. coli возникают трансконъюганты с плазмидами, несущими делеции генов Km^r или Sm^r.

С целью получения вариантов плазмиды pAS 8-121 с делециями гена Km^r 24 клона R. sphaeroides 2R::pAS 8-121 скрещивали с реципиентом E. coli K-12 C600 Mn^{dp}. Трансконъюганты отбирали на среде с Ap и Mn, полученные Ap^r трансконъюганты анализировали на наличие гена Km^r.

Во всех скрещиваниях были получены Km^s варианты плазмиды pAS 8-121. При электрофоретическом анализе плазмидной ДНК 24 таких вариантов были обнаружены плазмиды с различными молекулярными массами.

Большинство Km^s плазмид уступало по молекулярной массе pAS 8-121, и лишь у пяти вариантов молекулярная масса была равна таковой pAS 8-121 или превышала ее. Для анализа причин изменения молекулярной массы у Km^s плазмид (вставки фрагмента хромосомы пурпурной бактерии или перестройки внутри самой плазмиды) был проведен анализ EcoRI-рестриктов ДНК Km^s плазмид с увеличенной молекулярной массой. Поскольку на плазмиде pAS 8-121 имеется всего три сайта узнавания для EcoRI, можно было ожидать, что вставки в плазмиду хромосомной ДНК пурпурной бактерии можно будет обнаружить по увеличению числа сайтов рестрикции для EcoRI.

Рестрикционный анализ показал, что две Km^s плазмиды имеют 12 и 14 сайтов для EcoRI. Это свидетельствует о том, что выделены плазмиды с нуклеотидными последовательностями, отличными от последовательностей pAS 8-121, т. е. R′ плазмиды. Остальные Km^s плазмиды содержали не более одного дополнительного сайта для EcoRI.

Обнаруженные R′ плазмиды были не трансмиссивны (Tra^-). Поскольку tra гены плазмиды RP4 разобщены [6], при получении делетированных вариантов pAS 8-121 велика вероятность их утери. Tra^+ варианты, по-видимому, могут быть отобраны при анализе большей выборки Km^s плазмид. Tra^- варианты R′ плазмид в дальнейшем могут быть использованы для передачи различным реципиентам в скрещиваниях с Tra^+ плазмидами-помощниками.

Полученные нами R′ факторы, как и исходная плазмида pAS 8-121, не реплицируются в клетках R. sphaeroides. Они могут быть использованы как источник хромосомной ДНК пурпурной бактерии для конъюгативного введения ее в клетки других бактерий, способных поддерживать плазмиду ColE1, или для клонирования. Кроме того, репликационная функция R′ вариантов плазмиды pAS 8-121 может быть восстановлена при рекомбинации с другими Rep^+ плазмидами.

Система конъюгации на основе плазмиды pAS 8-121 может быть применена для разработки генетики не только R. sphaeroides, но и других грамотрицательных бактерий, в клетках которых не реплицируется плазмида ColE1.

Московский государственный университет,
кафедра генетики и селекции

Поступило 12.VIII 1985 г.

ԳԵՆԵՐԻ ՓՈԽԱՆՑՄԱՆ ՍԻՍՏԵՄԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ *pAS* 8—121 ՊԼԱԶՄԻԴԻ ՀԻՄԱՆ ՎՐԱ RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES-Ի ՄՈՏ

Ս. Վ. ԿԱՄԵՆԵՎԱ, Ա. Ն. ԴՈՒԲԵՑԿՈՎՍԿԻ, Տ. Պ. ՊՈԼԻՎՑԵՎԱ

pAS 8—121 պլազմիդի հիման վրա կոնյուգացիոն սիստեմ է առաջարկված, որը հնարավորություն է տալիս տրանսպոզոնները (Tn) և պլազմիդը ներմուծել ֆոտոտրոֆ ազոտֆիքսող Rhodopseudomonas sphaeroides *բակտերիայի քրոմոսոմի մեջ։ Իրականացված են Tn7-ի տրանսպոզիցիա և* pAS *8—121 ու* pAS *8—121 :: Tn 5 պլազմիդների ներմուծում այդ բակտերիայի քրոմոսոմի մեջ, որի հետևանքով ինդուկցված են քրոմոսոմային մուտացիաները և քրոմոսոմային ԴՆՔ-ի երկրորդական վերակառուցումները։ Ցույց է տրված, որ բջիջները, որոնք կրում են ներմուծված* pAS *8—121 պլազմիդով քրոմոսոմներ, հանդիսանում են քրոմոսոմային մարկերների բևեռացված փոխանցումն իրականացնող դոնորներ։ Ստացված է Hfr-շտամների հավաքածուն, որոնք տարբեր կետերից մոբիլիզացնում են* R. sphaeroides *քրոմոսոմը։ Առանձնացված են* pAS *8—121-ի* R′ *տարբերակներ, որոնք կրում են* R. sphaeroides *քրոմոսոմի ֆրագմենտներ։*

GENE TRANSFER SYSTEM ON THE BASE OF PLASMID *pAS8—121* IN *RHODOPSEUDOMONAS SPHAEROIDES*

S. V. KAMENEVA, A. N. DUBLIKOVSKI, T. P. POLIVTSEVA

A conjugation system on the base of plasmid *pAS 8—121* is proposed. The plasmid can be transfered from *E. coli K—12* to *R. sphaeroides* but cannot be replicated in the latter. This gives the possibility to transpose transposons and to insert the plasmid into the purple bacterium genome.

The transposons Tn5 and Tn7 have been transposed and plasmids *pAS 8—121* and *pAS 8—1213* have been inserted into *R. sphaeroides 2R* chromosome. Transpositions and insertions cause mutations and rearrangements of chromosomal DNA in the purple bacterium.

It has been shown that strains of *R. sphaeroides 2R* which carry the plasmid *pAS 8—121* in their chromosomes are Hir—donors. They realize the polarized transfer of chromosomal markers. A collection of *Hfr*—strains that transfer the *R. sphaeroides* chromosome from a few points has been isolated.

The R′ derivatives of the plasmid *pAS 8—121* carrying *R. sphaeroides* chromosomal fragments have been selected in *E. coli K—12* cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Дубейковский А. Н., Каменева С. В.* Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, *8*, 18—22, 1983.
2. *Каменева С. В., Поливцева Т. П., Коптева А. В., Муронец Е. М.* Генетика, *18*, 9, 1433—1441, 1982.
3. *Миллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике, М., 1976.
4. *Миронов В. Н., Слуцкий А. М., Гордеев В. К.* В сб. Метаболические плазмиды. Тез. докл. Всесоюзн. конф., 157, Таллин, 1982.
5. *Степанов А. И.* Автореф. докт. дисс., М., 1979.
6. *Barth P. T., Grinter N. J., Bradley D. E.* J. Bacteriol., *133*, 43—52, 1978.
7. *Holmes D. S., Quigley M.* Analyt. Biochem., *114*, 193—197, 1981.
8. *Miller L., Kaplan S.* Arch. Biochem. and Biophys., *187*, 229—235, 1978.
9. *Morgan A. F.* J. Bacteriol., *149*, 651—661, 1982.
10. *Olsen R. H., Shipley P.* J. Bacteriol., *113*, 772—780, 1973.
11. *Pemberton J. M., Bowen A. R.* J. Bacteriol., *147*, 110—117, 1981.
12. *Pühler A., Aguilar M. O., Hynes M., Muller P., Klipp W., Prieter U., Simon R., Weber G.* In : Advances in Nitrogen Fixation Research, Ed. Veeger C., Newton W. E., 609—619, 1984.
13. *Sistrom W. R.* J. Bacterial., *31*, 526—532, 1977.
14. *Tucker W. T., Pemberton J. M.* FEMS Microbiol. Letters, *5*, 173—176, 1979.
15. *Tucker W. T., Pemberton J. M.* FEMS Microbiol. Letters, *5*, 215—217, 1979.

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

УДК 575.113.576.858.9

ТРАНСПОЗИЦИЯ ГЕНОВ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ И РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Э. С. ПИРУЗЯН

Обобщены некоторые данные в области исследования транспозиции ДНК бактериофага Mu и переноса и интеграция фрагмента бактериальной ДНК (Т-ДНК опухолеобразующей Ti-плазмиды агробактерий) в хромосомы растений. Основное внимание уделяется вопросу получения мини-производных фага Mu и конструированию на их основе интегративных векторов у прокариот. Процесс опухолеобразования у растений рассматривается в аспекте применения векторов—производных Ti-плазмиды для переноса чужеродных генов в растительные клетки.

Ключевые слова: генная инженерия, транспозиция генов, бактериофаг Mu, Ti-плазмиды агробактерий, конструирование векторов.

Понятие «нестабильность генома» отражает явление транспозиции (миграции) определенных сегментов ДНК [10]. Смысл нестабильности генома заключается прежде всего в том, что в результате перемещения отдельных мигрирующих элементов ДНК и внедрения их в новые сайты происходит нарушение последовательности нуклеотидов в гене и возникает мутация. Таким образом, транспозоны играют большую роль в эволюционном процессе.

Впервые гены, названные автором открытия Б. Мак Клинток «контролирующими» элементами, были открыты у кукурузы [17, 18]. Затем были выявлены транспозоны (Tn) и инсерционные последовательности (IS) у бактерий. Существенный скачок в исследовании природы транспозонов был сделан после открытия уникального бактериофага Mu, оказавшегося представителем класса транспозируемых элементов [24].

Транспозиция ДНК у бактериофага Mu. Способность фага Mu к интеграции практически в любой сайт любого бактериального гена свидетельствует о его высокой мутагенности, что и обусловило его название Mu (от Mutator). После заражения бактериальных клеток фагом Mu фаговая ДНК встраивается в хозяйскую ДНК, затем в процессе размножения фага образовавшиеся копии ДНК Mu перемещаются в различные участки бактериальной ДНК, вызывая при этом мутации в бактериальных генах. В процессе перемещения копий ДНК Mu фаг может «захватывать» и перемещать вместе со своими копиями и гены самой бактерии, тем самым осуществляя генетическую инженерию бактерий in vivo [3, 11, 16, 21].

Работа с бактериофагом Mu в нашей стране была впервые начата в лаборатории, руководимой проф. С. И. Алиханяном в ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Основное внимание в генетических исследованиях с бактериофагом Mu уделяется изучению механизма перемещения копий ДНК Mu и расшифровке генетического контроля транспозиции. Согласно моделям, разработанным для объяснения механизма транспозиции [12, 23], процесс перемещения сегментов ДНК является многоступенчатым, в него вовлекается ряд ферментных систем. Акт транспозиции включает такие этапы, как разрезание и сшивку ДНК мишени, репликацию транспозируемого элемента и сайтспецифическую рекомбинацию. Цикл развития Mu включает интеграцию в хозяйскую хромосому, дупликацию его генома, реинтеграцию новых копий генома Mu в новые сайты бактериальной ДНК. Поэтому трудно допустить, что вся генетическая информация, контролирующая процесс миграции копий, содержится лишь в геноме Mu.

Действительно, в процессе транспозиции копий Mu участвуют некоторые гены E. coli, функция которых необходима для осуществления нормальной репликации самой бактериальной ДНК (dna). К числу генов E. coli, влияющих на процесс транспозиции Mu, относятся также гены himA, himB и hip, осуществляющие сайтспецифическую рекомбинацию фага λ. Тем не менее вопрос о генетическом контроле транспозиции Mu со стороны бактериального генома остается открытым, поскольку решение его упирается в проблему отбора соответствующих бактериальных мутантов и отсутствия прямых методов их селекции. Нами разработаны методы прямого отбора мутантов E. coli, в которых нарушена транспозиция Mu [2, 5]. Использование этих методов привело к выделению мутаций у E. coli, исключающих развитие фага Mu [1, 9].

Фаг Mu может служить основой при конструировании универсального вектора для клонирования генов благодаря его способности интегрироваться в случайные сайты ДНК хозяйской клетки и амплификации фагового генома. Основным условием такого конструирования должно быть получение делеционных вариантов Mu, так называемых мини-Mu фагов. Смысл создания мини-Mu фагов заключается в получении в фаговом геноме обширных центральных делеций при сохранении интактных концов фагового генома, необходимых для осуществления нормальной репликации и транспозиции фаговой ДНК. Такие мини-Mu фаги были получены в ряде лабораторий [6, 13, 22, 25]. Полученная нами коллекция мини-Mu фагов включает различные делеционные производные, в том числе фаг, размер генома которого составляет всего лишь 4,4 т. п. н. (размер генома фага Mu 37 т. п. н.). На основе одного из полученных мини-Mu фагов был сконструирован универсальный интегрирующийся вектор, способный давать пятикратное увеличение копий клонируемого гена в клетках E. coli.

Следует подчеркнуть еще одно уникальное свойство бактериофага Mu — способность осуществлять транспозицию в клетках более чем 20-ти различных видов микроорганизмов. Круг естественных хозяев этого фага ограничен лишь некоторыми представителями семейства Enterobacteriaceae [14, 15]. Однако, будучи интегрированным в плазмиду RP4, имеющую чрезвычайно широкий круг хозяев, фаг Mu был перенесен в клетки различных видов микроорганизмов. Во всех изученных случаях с клетками грамотрицательных бактерий после преодоления адсорбционного барьера геном Mu в новом генетическом окружении транскрибировался и транслировался, хотя кинетика фагового развития в ряде случаев оказывалась измененной [20].

В клетках E. coli удалось также осуществить интеграцию фага Mu в клонированные гены хлоропластов гороха [21].

Перенос Т-ДНК опухолеродных бактерий в растительные клетки. Уникальный механизм переноса фрагмента ДНК бактериального происхождения в клетки высших растений имеет место в случае образования опухолей. Генетика опухолеродных Ti-плазмид (от Tumor-inducing) Agrobacterium tumefaciens и возможность применения этой системы для генетической инженерии растений подробно обсуждаются в монографии [4]. Остановимся лишь на основных положениях этого необычного генетического процесса. Возможность использования Ti-плазмид A. tumefaciens в качестве векторов для генетической инженерии высших растений основана на том, что определенный фрагмент этой плазмиды — Т-ДНК (Transfer DNA) переносится и стабильно встраивается в хромосому растения. Таким образом, в этом, пока еще единственном хорошо изученном случае преодолевается естественный барьер, установленный самой природой между прокариотами и высшими организмами с тем, чтобы предотвратить обмен генами между ними. Такая встройка чужеродной ДНК приводит к тому, что нормальная растительная клетка перерождается (трансформируется) в раковую. Это свойство пере

дается всем потомкам трансформированной клетки, и начинается не контролируемое растительным организмом деление клеток, в результате чего образуется опухоль, называемая корончатым галлом.

Генетическое изучение Ti-плазмид затруднено из-за их больших размеров, а также неспособности реплицироваться в клетках E. coli, в которых упрощаются манипуляции с плазмидными ДНК. Поэтому весьма важным является клонирование отдельных фрагментов Ti-плазмиды.

Наша работа была начата с получения банка клонов, содержащих различные районы ДНК Ti плазмиды нопалинового типа (pTi C58) с молекулярным весом 132 мегадальтон. Всего получено 210 рекомбинантных клонов с EcoRI-фрагментами и 160 клонов с HindIII-фрагментами, что в сумме в несколько раз превышает общее количество фрагментов pTi C58 и дает основание считать, что геном pTi C58 полностью перекрывается полученным банком клонов [7, 8.]

Использование одного из фрагментов (HindIII-13) в качестве зонда позволило идентифицировать область начала репликации нопалиновой плазмиды pTi C58 и провести мутагенизацию этой области транспозонами для детального генетического анализа.

Процесс образования корончатых галлов у растений, в основе которого лежит миграция фрагмента бактериальной ДНК в растительную клетку, представляет собой, таким образом, природную форму генетической инженерии растений. В настоящее время этот процесс используется как основа для экспериментального переноса чужеродных генов любого происхождения в растения. Так, например, осуществлен успешный перенос гена фазеолина (запасного белка) бобов в подсолнечник и получено химерное растение— подсолнечник, в клетках которого экспрессируется ген другого (неродственного) растения [19].

При рассмотрении возможности использования Ti-плазмид для переноса новых генов в растения существенным является то, что для образования опухолей важна не вся Т-ДНК Ti-плазмиды целиком, а только определенные районы Т-ДНК. Следовательно, утрата остальных ее участков или встройка в них «чужих» генов, которые желательно передать в растение, не мешают процессу опухолеобразования. Единственным условием при этом является сохранение коротких сегментов ДНК слева и справа от Т-области, с помощью которых она транспозируется в растительную хромосому, и сохранение функций Т-ДНК, существенных для процесса внедрения. Таким образом, если Т-ДНК несет в своем составе «чужой» для растения ген, то он также окажется встроенным в хромосому растения, и когда с сигналов узнавания будет считываться информация, заключенная в Т-ДНК, начнет функционировать и чужеродный ген, перенесенный в растительную клетку.

Для успешного осуществления генетической инженерии на растениях имеется еще много трудностей, однако уже первые успехи на этом пути свидетельствуют о больших возможностях экспериментального переноса генов с помощью Ti-плазмид A. tumefaciens.

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва Поступило 1.X 1985 г

ԳԵՆԵՐԻ ՏՐԱՆՍՊՈԶԻՑԻԱՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ԵՎ ԲՈՒՅՍԵՐԻ ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ

Է. Ս. ՓԻՐՈՒԶՅԱՆ

Հոդվածում ընդհանրացված են տվյալները, որոնք վերաբերում են Mu բակտերիոֆագի ԴՆԹ-ի տրանսպոզիցիայի, ինչպես նաև բույսերի բջիջներում բակտերիալ ԴՆԹ-ի հատվածի (Ti պլազմիդի) տեղափոխման և ինտեգրացման ուսումնասիրմանը։ Ուշադրություն է դարձված նաև Mu ֆագի մինիածանցյալների ստացման և դրանց հիման վրա պրոկարիոտների մոտ ինտեգրատիվ վեկտորների ստեղծման հարցերին։ Բույսերի մոտ ուսումնասիրման պրոցեսը դիտվում է որպես Ti պլազմիդների հիման վրա ստացված վեկտորների օգնությամբ օտարածին գեները բուսական բջիջներ տեղափոխելու միջոց։

TRANSPOSITION OF GENES IN BACTERIAL AND PLANT CELLS

E. S. PIRUZIAN

Specific peculiarities of the temperate bacteriophage *Mu* genetics and its ability to accomplish the transposition of bacterial genes are discussed. Bacteriophage *Mu* has a unique integration system which favours the integration of *Mu*—genome and circular forms of foreign DNA into the bacterial chromosome and plasmids.

The system of transfer and integration of T—DNA of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens* and the application of this system for genetic engineering of plants are also discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Великодворская Г. А., Абдрашитова А. И., Миркин С. М., Могилов М. А., Пирузян Э. С.* Мол. генетика, микробиол. и вирусол., *6*, 15, 1985.
2. *Могилов М. А., Великодворская Г. А., Павлова Г. В., Пирузян Э. С.* Мол. генетика, микробиол., и вирусол., 2, 20, 1984.
3. *Пирузян Э. С.* Генетика, *15*, 7, 1979.
4. *Пирузян Э. С., Андрианов В. М.* Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М., 1985.
5. *Пирузян Э. С., Корецкая Н. Г.* Генетика, *19*, 744, 1983.
6. *Пирузян Э. С., Могилов М. А., Великодворская Г. А.* Генетика, *20*, 5, 1984.
7. *Пирузян Э. С., Стехин Н. Н., Андрианов В. М.* Докл. АН СССР, *273*, 1249, 1983.
8. *Стехин Н. Н., Андрианов В. М., Пирузян Э. С.* Мол. генетика, микробиол. и вирусол., 4, 19, 1981.
9. *Умлаз М. Р., Кобец Н. С., Ильина Т. С., Пирузян Э. С.* Генетика, *20*, 924, 1981.
10. *Хесин Р. Б.* Непостоянство генома. М., 1984.
11. *Bukhari A. I.* Annu. Rev. Genet., 10, 389, 1976.
12. *Bukhari A. I.* In: Genetic Interaction and gene transfer, Brookhaven Symp., 218, 1977.
13. *Chaconas J., de Bruijn F., Casadaban M. J. et al.* Gene, 13, 37, 1981.
14. *de Graaff J., Stouthamer A. H.* J. Gen. Microb., *67*, 91, 1971.
15. *de Graaff J., Kreuning P. C., van de Putte P.* Molec. Gen. Genet., *123*, 283, 1973.
16. *Howe M., Bade E.* Science, *190*, 624, 1975.
17. *McClintock B.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *28*, 458, 1942.
18. *McClintock B.* Carnegie Inst. Wash. Yb., *45*, 176, 1946.

19. *Murrai N., Sutton D. W., Murrai M. G. et al.* Science. *222*, 476, 1983.
20. *Murooka Y., Takizawa N., Harada T. H.* J. Bacteriol. *145*, 358, 1981.
21. *Piruzian E., Andrianov V. et al.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., *45*, 365, 1981.
22. *Restbois A., Toussaint A., van Gijsegem F., Faelen M.* Gene. *14*, 103, 1981.
23. *Shapiro J. A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. *76*, 1933, 1979.
24. *Taylor A.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. *50*, 1043, 1963.
25. *van Leerdam E., Goosen T., Plasterk R., van de Putte P.* Gene. *13*, 111, 1981.

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

УДК [577.214.622:577.152.41:579.842.24]:579.812.11

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ ПЕКТАТЛИАЗЫ ERWINIA CHRYSANTHEMI В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI

И. О. БУКАНОВ, М. Ю. ФОНШТЕЙН, А. Н. КАРАСИН, О. А. ТОЛМАЧЕВ, С. Н. АЛИХАНЯН, Н. К. ЯНКОВСКИЙ

Гены пектатлиазы (ptl) штамма E. chrysanthemi ENA49 клонировали в клетках Escherichia coli на фаговом векторе λ47.1. Гибридизационный анализ показал, что гены ptl тесно сцеплены и локализованы на EcoRI-фрагменте хромосомной ДНК E. chrysanthemi протяженностью 7,3 т. п. н. Фрагменты ДНК, содержащие гены ptl, а также прилегающие к ним области хромосомы E. chrysanthemi ENA49 клонировали на фагово-плазмидном векторе. Проведено субклонирование генов ptl на многокопийной плазмиде pUC19.

Ключевые слова: генная инженерия, пектатлиазы, молекулярное клонирование, экспрессия гена.

Фитопатогенные бактерии рода Erwinia секретируют во внеклеточное пространство ряд пектолитических ферментов, которые разрушают первичную стенку растительных клеток и вызывают мацерацию растительных тканей [4, 5, 7, 15, 16]. Фермент пектатлиаза (EC 4.2.2.2.) продуцируется Erwinia sp. и накапливается в культуральной среде до концентрации около 100 мг/литр [4, 5]. Гены пектатлиазы могут быть использованы в качестве удобной модельной системы для изучения механизмов секреции белка во внеклеточное пространство у грамотрицательных бактерий. Электрофоретический анализ белков культуральной жидкости после выращивания бактерий штамма ENA49 позволил обнаружить 6 ферментов (изоферментов), характеризующихся пектатлиазной активностью [2]. Это позволяет предположить, что синтез пектатлиаз в клетках штамма ENA49 обусловлен несколькими генами.

Ранее мы осуществили клонирование структурного гена пектатлиазы штамма ENA49 в клетках E. coli на фаговом векторе λ47.1 [1]. BamHI-фрагмент ДНК протяженностью 1 т. п. н., общий для всех Ptl⁻ фагов, переклонировали с помощью многокопийной плазмиды pUC19. Гибридные плазмиды pEAN4 и pEAN41, содержащие BamHI-фрагмент в противоположных ориентациях, использовали в качестве радиоактив-

но меченых зондов в гибридизационных экспериментах. При помощи гибридизационного анализа показали, что клонированный ген представлен на хромосоме штамма ENA49 в 1 копии. Структурный ген пектатлиазы, клонированный в составе гибридных плазмид pEAN4 и pEAN41, обозначили pIIA [1].

В представленной работе приводятся результаты молекулярного клонирования генов пектатлиазы штамма Erwinia chrysanthemi ENA49 в клетках E. coli на фаговом и фагово-плазмидных векторах. Итогом работы явилось клонирование и характеристика еще одного гена пектатлиазы, обозначенного pIIB.

Материал и методика. *Бактериальные штаммы и плазмиды*, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Использованные бактериальные штаммы и плазмиды

Штаммы и плазмиды	Характеристика	Источник
E. coli: Q 358	thr leu sup E $r^- m^+$	[10]
Q 359	thr leu sup E $r^- m^+$ (P 2)	[10]
QR 48	sup E recA $r^- m^+$	[10]
BHB 2688	met [λ 434 CI_{ts} red E_{am} S_{am}]/λ	[9]
BHB 2690	met [λ 434 CI_{ts} red D_{am} S_{am}]/λ	[9]
TG1	$r^- m^-$ lac pro sull thi (F' tra D 36 pro AB $lacI^q$ ZΔM 15)	
E. chrysanthemi		
ENA49	lac^- str^s	
Векторы λ 47.1	b/Δsrl 1—2 i434 cI^- nin 5	[2] [10]
pUC 19	Ap^r	[18]
pEMBL 8 (+)	Ap^r	[6]

Питательные среды: использовали L, 2%-ный агар Хоттингера, L-бульон и 1,2%-ный агар.

Ферменты нуклеотидного обмена: ферменты рестрикции, T4 ДНК-полинуклеотидлигазу (Вильнюсский ОПЗ ферментных препаратов), ДНК-полимеразу («Amersham», Англия) использовали в условиях, рекомендованных изготовителем.

Электрофорез образцов ДНК проводили в 0,7—1,5%-ных агарозных гелях в Трис-ацетатном буфере [12].

Выделение ДНК плазмид проводили щелочным методом [3]. Хромосомную ДНК штамма ENA49 выделяли методом Мармура [13] с незначительными модификациями; ДНК фагов—как описано [10].

Определение пектатлиазной активности проводили in situ на индикаторных средах как описано ранее [1].

Упаковку ДНК гибридных фагов в капсид фага λ осуществляли по описанному методу [9].

Трансформацию клеток E. coli плазмидной ДНК проводили по описанному методу [14].

Гибридизацию по Саузерну на нитроцеллюлозных фильтрах проводили как описано в работе [12]. В гибридизационных экспериментах использовали плазмидную

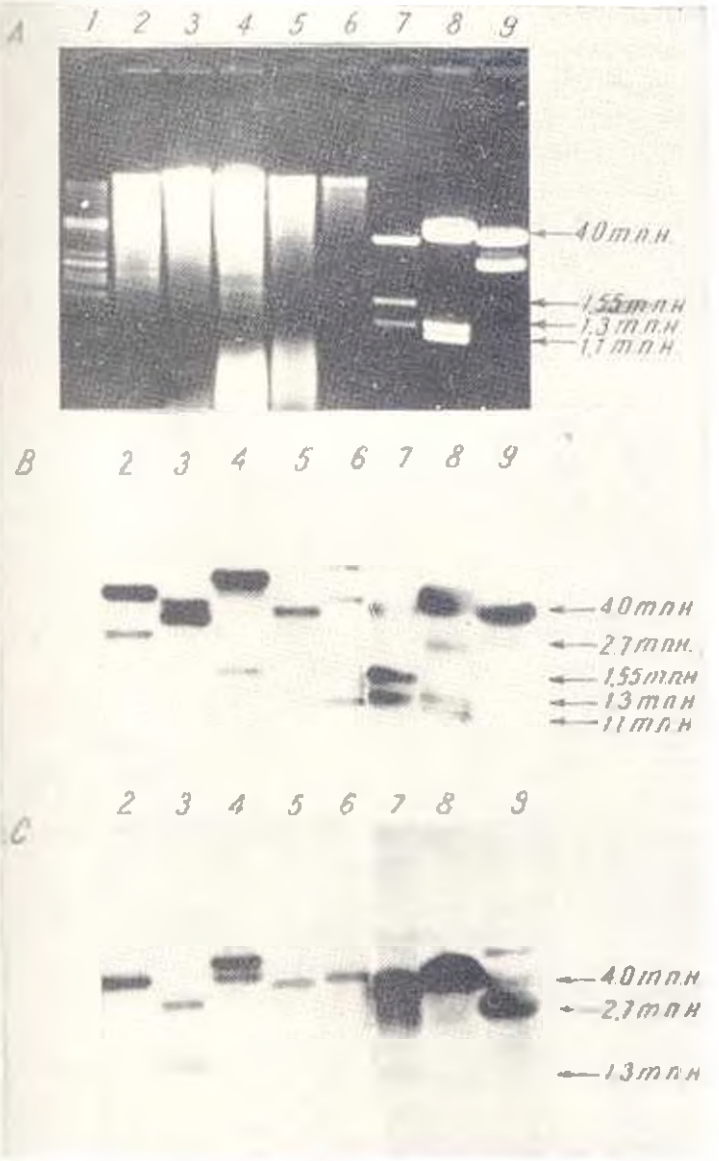


Рис. 1. Гибридизация по Саузерну Р-меченой ДНК плазмиды pEAN1 (авторадиограмма B) и pMB1 pst—1 (авторадиограмма C) с рестриктами плазмид pEAN1, pEAN11 и хромосомной ДНК штамма EAN19 (электрофореграмма A): 1) ДНК фага λ, обработанная ферментом PstI; 2)—6) хромосомная ДНК штамма EAN19, обработанная ферментами PstI, KpnI, EcoRI, BamHI, SalI соответственно. 7) ДНК pEAN11, обработанная SalI; 8) ДНК pEAN1, обработанная SalI. 9) ДНК pEAN1, обработанная BamHI.

ДНК, меченную радиоактивным фосфором при помощи ник-трансляции [11]. ДНК из агарозных гелей переносили на нитроцеллюлозные фильтры методом двустороннего переноса [17].

Отмывку фильтров после гибридизации проводили в жестких условиях [12].

Результаты и обсуждение. Мы осуществили клонирование EcoRI-фрагментов хромосомной ДНК штамма ENA49 на фаговом векторе λ 47.1 в клетках E. coli. Среди 1500 рекомбинантных клонов на индикаторной среде идентифицировали 2 клона, обладающих пектатлиазной активностью. Рестрикционный анализ плазмидной ДНК из этих клонов показал, что они содержат идентичные фрагменты хромосомной ДНК штамма ENA49. EcoRI-фрагменты ДНК гибридного фага переклонировали на мультикопийную плазмиду pEMBL8 (+). Клетки E. coli TG1, содержащие гибридную плазмиду, обозначенную pEMBLptl, проявляли пектатлиазную активность. Плазмида pEMBLptl, содержащая фрагмент чужеродной ДНК протяженностью около 7 т. п. н., характеризуется значительной нестабильностью. В процессе последовательных пересевов субклонов с гибридной плазмидой наблюдали уменьшение размеров лунок, образуемых колониями бактерий на индикаторной среде. Некоторые субклоны полностью утрачивали пектолитическую активность. После 2-кратного пересева колоний на среду с полипектатом и дальнейшем подробно исследовался один из Ptl$^+$ клонов, обозначенный E. coli TG1 (pEMBLptl-1). ДНК плазмиды pEMBLptl-1, меченную радиоактивным фосфором, гибридизовали по Саузерну с ДНК плазмид pEAN4 и pEAN41, обработанных рестриктазами BamHI и SalI, а также с хромосомной ДНК штамма ENA49, обработанной рестриктазами PstI, KpnI, EcoRI, BamHI, SalI (рис. 1 *C*). Те же образцы ДНК, перенесенные на целлюлозу с того же геля, гибридизовали с меченной ДНК плазмиды pEAN4 (рис. 1 *B*). Анализ авторадиограмм показал, что фрагмент ДНК штамма ENA49, клонированный в составе плазмиды pEMBLptl-1, не гибридизуется с SalI-субфрагментами размером 1,55 и 1,1 т. п. н. и очень слабо гибридизуется с SalI-субфрагментом 1,3 т. п. н. плазмиды pEAN4. Таким образом, на плазмиде pEMBLptl-1 находится ген (или гены) пектатлиазы, не гомологичный клонированному ранее гену pelA. Новый ген обозначен как pelB. Характер гибридизации плазмид pEAN4 и pEMBLptl-1 с фрагментами хромосомной ДНК штамма ENA49 также указывает на то, что последовательности ДНК, клонированные в составе этих плазмид, не идентичны, но, по-видимому, представляют тесно сцепленные области хромосомы штамма ENA19, так как фрагменты PstI (5,2 т. п. н.), KpnI (3,8 т. п. н.) EcoRI (7,3 т. п. н.) и SalI (5,2 т. п. н.) хромосомной ДНК штамма ENA49 гибридизуются как с ДНК плазмиды pEAN4, так и ДНК плазмиды pEMBLptl-1 (табл. 2).

Для подтверждения сцепленности детерминант, определяющих синтез пектатлиазы в клетках штамма ENA19, получили библиотеку EcoRI-фрагментов хромосомной ДНК штамма ENA49 на фагово-плазмидном векторе, сконструированном в нашей лаборатории. Среди примерно 11000 рекомбинантных фагов идентифицировали 45 негативных

Таблица 2

Фрагменты хромосомной ДНК штамма ENA49, гибридизующиеся с ДНК плазмид pEAN4 с pEMBLptl-1

Меченая проба	Размеры (т. п. н.) гибридизующихся фрагментов ДНК, обработанных рестриктазами				
	Pst I	Kpn I	EcoR I	BamH I	Sal I
pEAN 4	5.2 2.8	4.5 3.8	7.3 1.7	4.0	9.0 5.2 1.3
pEMBLptl—1	5.2	3.8 1.6	7.3 5.4	5.0	5.2

колоний, погрузившихся в полипектат натрия. Рестрикционный анализ ДНК, выделенной из 12-ти проанализированных фагов, показал, что все они содержат EcoRI фрагмент ДНК штамма ENA49 протяженностью 7,3 т. п. н. Гибридные молекулы, сконструированные на основе фагово-плазмидного вектора, могут размножаться в клетках в виде фага или наследоваться в клетках в виде плазмиды. Плазмидная часть фагово-плазмидного вектора представляет собой ДНК плазмиды pUC19. Встраивание фрагментов ДНК штамма ENA49 осуществляли по рестрикционным сайтам, расположенным в последовательности pUC19-компонента фагово-плазмидного вектора (рис. 2). Последовательно об-

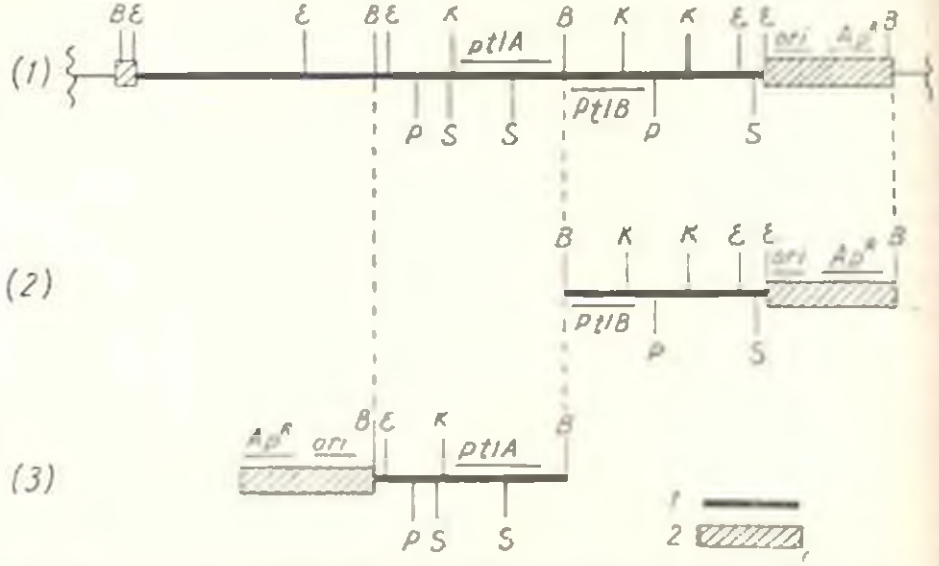


Рис. 2. Рестрикционные карты ДНК гибридного фага pMK2 (1) и ДНК плазмид pMK2-1 (2) и pEAN4 (3). B, E, K, P, S—участки узнавания рестриктазами BamHI, EcoRI, KpnI, PstI, SalI соответственно, ▬ ДНК штамма ENA49, [hatched box] плазмидная ДНК (pUC19) фагово-плазмидного вектора

рабатывая ДНК гибридных молекул подходящей эндонуклеазой рестрикции и лигазой, можно осуществить субклонирование фрагментов чужеродной ДНК на плазмиде pUC19. Для дальнейшего анализа использовали гибридный фаг, обозначенный pMK2 (рис. 2). ДНК фага

рМК2 обрабатывали рестриктазой BamHI, лигазой и трансформировали в клетки E. coli TG1. Из трансформантов E. coli, отобранных на среде с ампициллином (50 мкг/мл), выделили плазмиду, обозначенную рМК2-1. Клоны E. coli, содержащие плазмиду рМК2-1, проявляют пектатлиазную активность на чашках с индикаторной средой. Плазмида рМК2-1 стабильно поддерживается в клетках E. coli, так как при последовательных пересевах на индикаторную среду с полипектатом натрия вокруг колоний образуются лунки одинакового размера.

По-видимому, характер локализации генов ptl на хромосоме зависит от штамма. В работе [8] показано тесное сцепление генов ptl в штамме E. chrysanthemi B 374. Кини со соавт. показали, что в штамме E. chrysanthemi EC16 гены ptl отстоят друг от друга по крайней мере на 40 т. п. н. [19]. Нами установлено тесное сцепление двух генов ptl в штамме E. chrysanthemi ENA49.

ВНИИГенетика. Москва

Поступило 11 IX 1985 г.

ERWINIA CHRYSANTHEMI ՊԵԿՏԱՏԼԻԱԶԱՅԻ ԳԵՆԵՐԻ ՄՈԼԵԿՈՒԼՅԱՐ ԿԼՈՆԱՎՈՐՈՒՄԸ *ESCHERICHIA COLI* ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ

Ն. Օ. ԲՈՒԿԱՆՈՎ, Մ. ՅՈՒ. ՖՈՆՇՏԵՅՆ, Ա. Ի. ԿԱՐԱՍԻՆ, Օ. Ա. ՏՈԼՄԱՉՈՎ, Ս. Ի. ԱԼԻԽԱՆՅԱՆ և Կ. ՅԱՆԿՈՎՍԿԻ

E. chrysanthemi ENA *49 շտամի պեկտատլիազայի (ptl) գեները կլոնավորվել են* Escherichia coli *բջիջներում λ47.1 ֆագային վեկտորի վրա։ Դնթ-ի կլոնավորման հաջորդականությունների հիբրիդիզացիան անալիզը ցույց է տվել, որ ptl գեները սերտորեն կապված և տեղայնացված են* E. chrysanthemi *քրոմոսոմային Դնթ-ի* EcoRI*-ֆրագմենտում 7,3 ն. զ. երկարությամբ։ ptl գեները պարունակող Դնթ-ի ֆրագմենտները, ինչպես և* E. chrysanthemi ENA *49 քրոմոսոմի նրանց հարող շրջանները կլոնավորվել են ֆագ-պլազմիդային վեկտորի վրա։ Իրականացվել է ptl գեների ենթակլոնավորում* pUC*19 բազմապատճեն պլազմիդի վրա։*

MOLECULAR CLONING OF GENES OF PECTAT LYASE OF *ERWINIA CHRYSANTHEMI* IN THE CELLS OF *ESCHERICHIA COLI*

N. O. BUKANOV, M. YU. FONSTEIN, A. I. KARASIN, O. A. TOLMACHEV, S. I. ALIKHANIAN, N. K. YANKOVSKY

The genes of excreted protein pectat lyase (ptl) of *Erwinia chrysanthemi ENA 49* were cloned in *Escherichia coli* cells on the phage vector λ47.1 and on the plasmid vector. 10 hybrid phages were identified in the population of BamHI, EcoRI and SalI fragments of ENA49 chromosomal DNA on λ47.1 and 45 Ptl⁺ hybrid phages were constructed on plasmid vector. Southern blot analysis was used for the localization of ptl⁺ genes on ENA49 chromosal DNA.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Буканов Н. О., Фонштейн М. Ю., Евтушенков А. Н., Сваринский М. А., Стрельченко П. П., Янковский Н. К., Алиханян С. И., Фомичев Ю. К., Дебабов В. Г.* Генетика, *21*, 1985.
2. *Евтушенков А. Н., Прокулевич В. А., Белясова Н. А., Попова Л. Б., Фомичев Ю. К.* Мол. генетика, микробиология и вирусология, *6*, 11—15, 1984.
3. *Birnboim H. C.* Methods Enzymol., *100*, 243—255, 1983.
4. *Chatterjee A. K., Buchanan G. E., Behrens M. K., Starr M. P.* Can. J. Microbiol., *25*, 94—102, 1979.
5. *Coltmer A., Berman P., Mount M. S.* In: Phytopathogenic prokaryotes. Mount M., Lacy G. (eds.), Academic Press, Inc NY., *1*, 395—122, 1982.
6. *Dente L., Cesareni G., Cortese R.* Nucl. Acids Res., *11*, 1645—1655, 1983.
7. *Garibaldi A., Bateman D. F.* Physiol. Plant Pathol., *1*, 25—40, 1971.
8. *van Gijesgem F., Toussaint A., Schoonejans E.* EMBO J., *4*, 787—792, 1985.
9. *Hohn B.* Methods Enzymol., *68*, 299—309, 1979.
10. *Loenen W. A. M., Brammar W. J.* Gene, *10*, 249—259, 1980.
11. *Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., *72*, 1184—1188, 1975.
12. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y., 1982.
13. *Marmur J.* J. Mol. Biol., *3*, 208—218, 1961.
14. *Morrison D. A.* J. Bacteriol., *132*, 349—351, 1977.
15. *Pupillo P., Mazzucchi U., Pierini G.* Physiol. Plant Pathol., *9*, 113—120, 1976.
16. *Rombouts F. M., Plinik W.* Microb. Enzymes and Bioconvers, London, *5*, 227—282, 1980.
17. *Smith G. E., Summers M. D.* Anal. Biochem., *109*, 123—129, 1980.
18. *Vieira J., Messing J.* Gene *19*, 259—268, 1982.
19. *Keen N. T., Dahlbeck D., Staskawicz B., Belser W.* Bacteriol., *159*, 825—831, 1984

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

УДК 577.19:579.83

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЮРИЦИНОВ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ ШТАММАМИ BACILLUS THURINGIENSIS

А. С. ОВСЕПЯН, Б. П. КАРАБЕКОВ

Показано, что 42 штамма B. thuringiensis (из 100 проверенных), относящихся к 10 вариантам, продуцируют тюрицины. 9 проверенных штаммов варианта dendrolimus не продуцируют и сами чувствительны ко всем тюрицинам. Синтезируемые бактерицины чувствительны к трипсину, но различаются по чувствительности к высокой температуре, способности проходить через целлофановую мембрану, морфологии зон торможения индикаторного штамма, спектру действия. Получены моно- и полирезистентные мутанты универсального индикаторного (чувствительного ко всем тюрицинам) штамма B. thuringiensis var. galleriae P 10/14. Используя эти мутанты, тюрицины распределили на 4 типа.

Ключевые слова: бактерициногения B. thuringiensis, тюрицины.

Представители различных серотипов вида B. thuringiensis продуцируют бактерицины, так называемые тюрицины [1, 6, 7, 9]. Имеются

данные об экстрахромосомальной природе детерминант, кодирующих синтез тюрицинов у morrisoni и darmstadiensis [5]. О самой природе тюрицинов, их свойствах известно очень мало [1, 6, 7]. Выяснение этих вопросов имеет важное значение для понимания биологии B. thuringiensis.

Настоящая работа посвящена изучению распространенности явления бактериоциногении у B. thuringiensis, предварительной характеристике и типированию синтезируемых тюрицинов.

Материал и методика. В работе использованы природные и коллекционные штаммы различных вариантов B. thuringiensis, полученные из Всесоюзного института защиты растений (Ленинград), Института им. Пастера (Париж), Института микробиологии АН АрмССР (г. Абовян), Института ядерной физики им. Б. П. Константинова (Ленинград), Биологического института СО АН СССР (Новосибирск), Среднеазиатского института фитопатологии (Ташкент), Института ВНИИгенетика (Москва).

Для выращивания культур использовали 1,2%-ный мясопептонный агар (МПА) и мясопептонный бульон (МПБ), минимальную среду, состав которой описан в работе [2]. Составы сред, использованные для проявления бактериоциногении, описаны в соответствующем месте текста.

Принадлежность штаммов к тому или иному серотипу определяли в реакции агглютинации с помощью H-антисывороток, полученных из Института им. Пастера.

Для определения тюрициногенности клетки исследованных штаммов, выращенные в течение 48 ч при 20° на МПА, убивали парами хлороформа и заливали 0,7%-ным МПА с индикаторным штаммом. О тюрициногенности судили через 24 ч по появлению на газоне индикаторного штамма зоны подавления роста клеток.

Для определения теплоустойчивости тюрицинов чашки с убитыми клетками B. thuringiensis прогревали при 60° и 80° в течение 60 мин и при 100° в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры чашки заливали 0,7%-ным МПА с индикаторным штаммом и через 24 ч учитывали результаты.

Способность тюрицинов проходить через целлофановую мембрану и диффундировать в агар определяли по описанным методам [4, 8]. Чувствительность их к протеолитическому ферменту трипсину и типирование проводили по описанному методу [3].

Результаты и обсуждение. Установлено, что из 100 исследованных штаммов 42 штамма, принадлежащие к 10-ти из 18-ти проанализированных вариантов, являются тюрициногенными (табл. 1). Тюрициногенность не обнаружена у штаммов, принадлежащих к вариантам kurstaki, dendrolimus, kenyae, canadiensis, aizawai, morrisoni, tolworthi, israelensis.

Для отбора индикаторных штаммов (чувствительных к тюрицинам) использовали всю коллекцию, а также мутанты штамма B. thuringiensis var. galleriae 69-6, продуцирующие темно-коричневый пигмент. Наиболее чувствительными к тюрицинам оказались все штаммы варианта dendrolimus, некоторые пигментирующие мутанты варианта galleriae, а также 2 штамма несеротипированных вариантов. Среди них отобраны универсальные индикаторные штаммы, чувствительные ко всем продуцируемым тюрицинам. Таковыми являются все штаммы варианта dendrolimus, пигментирующий мутант P 10-14 штамма B. thuringiensis var. galleriae 69-9 и штаммы, обозначенные И-50 и 17-2, из несеротипированных вариантов. Отобранные индикаторные штаммы использовались в последующих экспериментах.

Таблица 1

Тюрициногенность различных серотипов Bacillus thuringiensis

Вариант	Серотип	Исследовано штаммов	Выявлена тюрициногенность
thuringiensis	H 1	11	9
finitimus	H 2	2	1
alesti	H 3a	4	2
kurstaki	H 3a : 3a	3	—
dendrolimus	H 4a : 4a	9	—
kenyae	H 4a : 4c	1	—
galleriae	H 5a : 5a	40	19
canadiensis	H 5a : 5c	1	—
subtoxicus	H 6	1	1
entomocidus	H 6	2	1
aizawai	H 7	1	—
morrisoni	H 8	2	—
tolworthi	H 9	2	1
darmstadiensis	H 10	1	1
caucasicus	H 10	3	3
thompsoni	H 11	1	1
toumanoffi	H 12	1	—
israelensis	H 14	1	—
—	не серотипированы	11	3
Всего:		100	42

Изучали влияние состава сред на продукцию тюрицинов. Как видно из табл. 2, наиболее эффективно тюрицины продуцируются при росте клеток на МПА. Присутствие в среде 0,5%-ной глюкозы и 0,5—1%-ного NaCl приводит к уменьшению зоны торможения индикаторного штамма, возможно, из-за ослабления синтеза тюрицинов. В связи с этим в дальнейшем в качестве питательной среды использовали МПА.

В табл. 3 представлены результаты сравнительного анализа некоторых тюрицинов. Из 42-х исследованных тюрицинов только 9 способны проходить через целлофановую мембрану, что говорит об их низком молекулярном весе.

Все исследованные тюрицины чувствительны к трипсину, хотя необходимо отметить, что тюрицины, синтезируемые вариантами thuringiensis, thompsoni, штаммом 44-1 из несеротипированных вариантов менее чувствительны к нему, так как инактивируются только при 10-кратном (и более) разведении их.

Анализируемые тюрицины различаются по чувствительности к высокой температуре. Если штаммы thuringiensis, caucasicus, darmstadiensis, thompsoni, subtoxicus (в последних 3 случаях анализировалось только по одному штамму) синтезируют теплоустойчивые тюрицины, то штаммы других серотипов—как теплоустойчивые, так и теплочувствительные.

Эти данные говорят о неодинаковой природе синтезируемых тюрицинов или, по крайней мере, о количественном различии в соотношении компонентов, входящих в их состав.

О неоднородности синтезируемых тюрицинов свидетельствуют и другие данные. В опытах по диффузии тюрицинов в агаре отмечено, что

Таблица 2

Влияние состава сред на синтез тюрицинов

Состав среды	Появление бактериоциногенности и ее интенсивность
МПА	+++
МПА, глюкоза—0,5%	+
Дрожжевой экстракт—1%,	
Пептон—1%, NaCl—0,5%	+
Дрожжевой экстракт—0,5%	
Пептон—1%, NaCl—1%	++
Дрожжевой экстракт—1%, NaCl—0,5%	—
Дрожжевой экстракт—0,5%	
Пептон—0,5%, NaCl—0,5%	+
Пептон—1%, NaCl—0,5%	—
Дрожжевой экстракт—1%, NaCl—1%	—
Пептон—1%, NaCl—1%	+
Дрожжевой экстракт—1%,	
Пептон—1%, NaCl—1%	+
Минимальная среда для B. thuringiensis	—

Примечание: представлены результаты анализа тюрициногенных штаммов B. thuringiensis в отношении индикаторного штамма И-50. Использовали 1,2%-ные агаризованные среды; «+» означает условный размер зоны торможения индикаторного штамма, «—» —отсутствие зоны торможения у индикаторного штамма.

Таблица 3

Сравнительная характеристика тюрицинов

Тюрицины вариантов B. thuringiensis	Проходимость через целлофановую мембрану	Чувствительность к трипсину	Устойчивость к тепловой обработке		
			60°	80°	100°
thuringiensis	7/9	9/9	9/9	9/9	9/9
finitimus	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
alesti	0/2	2/2	1/2	1/2	1/2
galleriae	0/19	19/19	10/19	10/19	10/19
subtoxicus	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1
entomocidus	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
tolworthi	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
darmstadiensis	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1
caucasicus	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
thompsoni	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
не серотипированы	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3

Примечание: в знаменателе число тюрициногенных штаммов, в числителе—число тюрициногенных штаммов, обладающих соответствующим свойством.

штаммы вариантов thuringiensis, thompsoni, несеротипированный штамм 44-1 сохраняют свои антагонистические свойства в течение длительного времени по сравнению со штаммами других вариантов. Однако замечено, что тюрицины одного и того же варианта могут различаться по скорости диффузии в агаре. Замечено также, что тюрицины, синтезируемые вариантами thuringiensis, thompsoni, несеротипированными штаммами 44-1 и 17-2, активнее в отношении не только универсальных индикаторных штаммов, но и большего числа штаммов из других серотипов. Это предполагает более широкий спектр действия тюрицинов, синтезируемых штаммами указанных вариантов.

Тюрициногенные штаммы различаются также по морфологии зоны торможения индикаторной культуры (по размеру, прозрачности, характеру расположения вторичных колоний в зоне торможения и т. д.).

Полученные данные обусловили необходимость типирования тюрицинов, продуцируемых штаммами B. thuringiensis. Для этого у универсального индикаторного штамма P 10/14 (продуцирует пигмент и устойчив к стрептомицину) были получены мутанты, резистентные к одному из синтезируемых тюрицинов (монорезистентные мутанты). Не все монорезистентные мутанты, полученные одноступенчатым отбором, оказались пригодными для типирования тюрицинов. Наиболее удобным для этих целей оказался мутант, резистентный к тюрицину, продуцируемому штаммом 260/15 варианта galleriae, и обозначенный как 14/260-15. Этот мутант оказался устойчивым еще к 7-ми тюрицинам, продуцируемым штаммами варианта galleriae. Синтезируемые этими штаммами тюрицины обладают одинаковыми свойствами—у них одинаковая морфология зоны торможения индикаторного штамма, все они теплочувствительны, не проходят через целлофановую мембрану. Таким образом, 8 из 42-х тюрициногенных штаммов продуцируют тюрицины одного и того же типа, их мы отнесли к типу «А».

У мутанта 14/260-15 не изменился характер чувствительности к тюрицинам, продуцируемым 22-мя штаммами различных серотипов, а у 12-ти других штаммов различных серотипов наблюдалось сужение зоны торможения роста. Из суженной зоны торможения роста мутанта 14/260-15, вызванного действием тюрицина штамма 3-16 варианта galleriae, был выделен новый мутант 2-16, который оказался одновременно резистентным еще к 21-му тюрицину, продуцируемому штаммами разных серотипов. Таким образом, с помощью двойного резистентного мутанта 2/16 протипированы еще 22 тюрициногенных штамма; продуцируемые тюрицины отнесены к типу «В». Тюрицины этого типа не проходят через целлофановую мембрану, имеют одинаковую чувствительность к трипсину, но различаются по морфологии зоны торможения индикаторного штамма и теплочувствительностью.

В отношении тюрицинов, продуцируемых остальными 12-ю тюрициногенными штаммами, у мутанта 2/16 было отмечено сужение зоны торможения роста. Тюрицины, продуцируемые 7-ю штаммами варианта thuringiensis, штаммом P варианта thompsoni, несеротипированным штаммом 44-1, проходят через целлофановую мембрану, теплоустойчи-

вы, менее чувствительны к трипсину, имеют одинаковые зоны торможения и широкий спектр действия. Они отнесены к типу «C». Тюрицины штамма 19-2 варианта galleriae, штамма P варианта subtoxicus и одного несеротипированного штамма теплоустойчивы, но в отличие от тюрицинов типа «C» не проходят через целлофановую мембрану, чувствительны к трипсину, имеют узкий спектр действия и мутные зоны торможения роста. Они отнесены к типу «D».

Представленные данные не исключают, однако, что некоторые штаммы продуцируют более одного типа тюрицинов. В настоящее время проводятся эксперименты по более детальной характеристике типированных тюрицинов и установлению соответствующих генетических детерминант.

Авторы выражают благодарность В. А. Саканяну за критические замечания и обсуждение результатов.

Научно-исследовательский технологический
институт аминокислот, Ереван

Поступило 11.IX 1985 г.

BACILLUS THURINGIENSIS-Ի ՇՏԱՄՆԵՐՈՎ ՍԻՆԹԵԶՎՈՂ ՏՅՈՒՐԻՑԻՆՆԵՐԻ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

Ա. Ս. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ, Բ. Պ. ԿԱՐԱԲԵԿՈՎ

Յուցց է տրված, որ B. thuringiensis-*ի 10 վարիանտների 42 շտամներ (100 ստուգվածներից) սինթեզում են տյուրիցիններ։* Dendrolimus *վարիանտի 9 ստուգված շտամներ տյուրիցին չեն սինթեզում և իրենք էլ զգայուն են տյուրիցինների նկատմամբ։ Սինթեզված տյուրիցինները զգայուն են տրիպսինի նկատմամբ, սակայն միմյանցից տարբերվում են բարձր ջերմաստիճանի նկատմամբ ունեցած զգայունությամբ, ցելոֆանե թաղանթով անցնելու ունակությամբ, ինդիկատոր շտամի աճի արգելակված գոնայի մորֆոլոգիայով, բակտերիաների վրա ազդման սպեկտրով։ Ստացված են* B. thuringiensis var. galleriae *p10/14 ունիվերսալ ինդիկատոր շտամի տյուրիցինների նկատմամբ ռեզիստենտ մուտանտներ։ Դրանց միջոցով տյուրիցինները դասակարգվել են 4 տիպի։*

CHARACTERIZATION OF THURICINS PRODUCED BY *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS

A. S. HOVSEPYAN, B. P. KARABEKOV

42 strains (of 100 tested), which belong to 10 subspecies of *B. thuringiensis* produce thuricins. 9 tested strains of *B. thuringiensis var. dendrolimus* do not produce thuricins and are sensitive to any thuricin. All thuricins are sensitive to trypsin, but differ by heat stability, permeability through dialysis membrane, spectrum of action on bacteria. Thuricin—resistant mutants of the indicative *B. thuringiensis var. galleriae* P10/14 strain (which is sensitive to all thuricins) are isolated. The thuricins are subdivided into four types by means of these mutants.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Иванов Г. М., Марченкова Т. В., Лихотникова И. И.* Изв. Сибирск. отделения АН СССР, серия биолог. наук, вып. 3, 15, 126—128, 1973.
2. *Карабеков Б. И., Чахмахчян А. Г., Оганесян М. Г.* Генетика, *18*, 1062—1067, 1982.
3. *Кудлай Д. Г., Лиходей В. Г.* Бактериоиногения. Л., 1966.
4. *Лиходей В. Г.* Антибиотики, *9*, 771—780, 1963.
5. *Рабченко Н. Ф., Аликанян С. И.* Генетика, *20*, 1067—1071, 1981.
6. *De 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. *Frederieq P.* Rev. Belge Path. Med. Exp., *19*, 4—8, 1948.
9. *Krieg A.* J. Invert. Pathol., *15*, 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 udp в геноме бактерий rho15 на фоне различных мутаций, затрагивающих структурный ген metE. Показано, что в отличие от точковой мутации metE инсерция metE::Tn5 супрессирует эффект мутации rho15 на экспрессию гена udp, 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 udp осуществляется под контролем промотора metE.

Ключевые слова: ген уридинфосфорилазы, регуляция экспрессии гена.

Структурный ген udp, контролирующий синтез фермента уридинфосфорилазы (УДФ), расположен в районе 85 мин хромосомной карты Escherichia coli. Промоторная область гена udp локализуется в участке, примыкающем к гену metE, т. е. транскрипция гена udp осуществляется по часовой стрелке карты E. coli [1, 4]. Экспрессия гена udp 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 udp подвержено строгой катаболитной репрессии, о чем свидетельствует практически полное подавление активности его промотора на фоне мутаций по аденилатциклазе (cya) или белку-рецептору циклического АМФ (crp) [5, 9, 12].

Важную роль в регуляции экспрессии гена udp играет фактор терминации транскрипции rho. Показано, что присутствие в геноме бактерий мутации rho15 ts обусловливает полуконститутивный синтез УДФ, причем усиление экспрессии гена udp 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 udp 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 udp 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 udp 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 udp, восстанавливая чувствительность его промотора к специфическим эффекторам—белку cytR 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—цитидин (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 Лоури с соавт. [11].

Результаты и обсуждение. Интеграция транспозонов в бактериальные опероны вызывает строгий полярный 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 udp в геноме rho15 действительно обусловлена сквозной транскрипцией с промотора гена metE, то интеграция транспозона в последовательность последнего гена должна прервать транскрипцию, восстанавливая чувствительность промотора udp к действию белка cytR 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 udp в геноме rho15 штамма.

Для изучения влияния мутаций по структурному гену metE на экспрессию гена udp в геноме rho15 мы сконструировали на основе штамма AMO56 с помощью трансдукции фагом P1 серию изогенных штаммов, содержащих различные комбинации мутаций по генам rho, cytR, cya, metE (табл. 1).

Таблица 1

Штаммы E. coli K-12, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
S30	araD (ara$_{ABOIC}$– leu)Δ_{7679} lac$^{\Delta}_{X74}$ galU galK ilv::Tn10	С. Браун (США)
SBK040	thy metE::Tn5	К. Берг (США)
RK4349	ilv metB proB entA his lac rpsL metE::Tn10 metE::Tn10	Р. Каднер (США)
AM056	thi upp	[6]
AM058	thi uppΔcya Val—r	[6]
AM059	thi uppΔ cya rho15 Val—r	[6]
AM357	thi upp rho15 Val—r	[6]
AM440	thi upp metE	[1]
AM441	thi upp metE rho15 Val—r	AM357 × AM440
AM1000	thi upp cytR	[6]
AM1001	thi upp cytR rho15 Val—r	AM357 × AM1000
AM1002	thi upp cytRΔ cya Val—r	AM058 × AM1000
AM1003	thi upp cytRΔcya rho15 Val—r	AM059 × AM1000
AM1004	thi upp metEΔcya Val—r	AM058 × AM440
AM1005	thi upp metEΔcya rho15 Val—r	AM059 × AM440
AM1006	thi upp metE::Tn5	SBK040 × AM056
AM1007	thi upp metE::Tn5 rho15 Val—r	AM357 × AM1006
AM1008	thi upp metE::Tn5Δcya Val—r	SBK040 × AM058
AM1009	thi upp metE::Tn5Δcya rho15 Val—r	SBK040 × AM059
AM1010	thi upp cytR metE::Tn5	SBK040 × AM1000
AM1011	thi upp cytR metE::Tn5 rho 15 Val—r	AM357 × AM1010
AM1012	thi upp cytR metE::Tn5Δcya Val—r	SBK040 × AM1002
AM1013	thi upp cytR metE::Tn5Δcya rho15 Val—r	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 обусловливает 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 дерепрессию синтеза УДФ (штамм AM1000), а мутация cya, напротив, подавляет экспрессию гена udp 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 cya и cytR, а также мутации metE (точковая) и metE::Tn5

Сравниваемые штаммы	Генотип по локусам cya, cytR, metE	Индуктор	Активность УДФ, ед/мг, в геноме	
			rho15	rho+
AM357	дикий тип	—	1112	116
и AM056		CR+цАМФ	1236	1268
AM059	cya	—	1104	139
и AM058		CR+цАМФ	958	762
AM1001	cytR	—	1211	1556
и AM1000		цАМФ	1363	1610
AM1003	cytRΔcya	—	814	121
и AM1002		цАМФ	1087	862
AM441	metE	—	574	132
и AM440		CR+цАМФ	617	896
AM1005	metEΔcya	—	538	128
и AM1004		CR+цАМФ	614	1078
AM1007	metE::Tn5	—	190	134
и AM1006		CR+цАМФ	489	968
AM1009	metE::Tn5Δcya	—	140	154
и AM1008		CR+цАМФ	469	965
AM1011	metE::Tn5 cytR	—	603	830
и AM1010		цАМФ	862	1372
AM1013	metE::Tn5 cytRΔcya	—	147	115
и AM1012		цАМФ	591	1214

ность УДФ у всех четырех исследуемых штаммов rho (табл. 2). Таким образом, в геноме бактерий met$^+$ мутация rho 15 практически полностью подавляет чувствительность промотора гена udp к действию белка cytR и комплекса цАМФ—CRP.

Характер экспрессии гена udp 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 rho 15 снижена примерно в 2 раза по сравнению с соответствующим штаммом met$^+$ (AM357), экспрессия гена udp 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 cya. Кроме того, у штаммов AM441 и AM1005, как и у соответствующих штаммов met$^+$ 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 rho15 не восстанавливает чувствительность промотора udp 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 rho15 на экспрессию гена udp. Так, у штаммов AM1007, AM1009 и AM1013, содержащих мутацию rho15, на фоне инсерции metE::Tn5 активность УДФ снижается почти до базального уровня, характерного для соответствующих штаммов rho$^+$ AM1006, AM1008 и AM1012 (табл. 2). Важно подчеркнуть, что присутствие в геноме rho15 инсерции metE::Tn5, кроме того, восстанавливает чувствительность промотора udp 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 rho$^+$. В связи с этим следует отметить, что уровень дерепрессии УДФ у штамма AM1011 metE::Tn5 cytR rho15 также несколько снижен по сравнению с таковым у контрольного штамма AM1010 cytR rho$^+$. Полученные данные указывают на то, что интеграция транспозона Tn5 в ген metE прерывает сквозную транскрипцию гена udp с промотора metE в геноме rho15, восстанавливая чувствительность промотора udp к действию белка cytR и комплекса цАМФ—CRP. Частичное подавление функций промотора udp в отношении способности к cytR-дерепрессии может быть объяснено активностью промоторов интегрированного транспозона Tn5, которые могут инициировать в геноме rho сквозную транскрипцию примыкающих бактериальных генов, подавляя активность их собственных промоторов [7].

Итак, полученные данные в целом позволяют заключить, что экспрессия гена udp в геноме бактерий rho15 осуществляется за счет сквозной транскрипции, инициируемой на промоторе соседнего гена metE. В соответствии с этим заключением отмеченное выше снижение экспрессии гена udp на фоне точковой мутации metE, очевидно, связано с подавлением активности промотора metE экзогенным L-метионином (присутствие которого в случае метиониновых 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 rho15 [6].

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

ВНИИгенетика, Москва

Поступило 5.IX 1985 г.

ՈՒՐԻԴԻՆՖՈՍՖՈՐԻԼԱԶԱՅԻ 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 իրադործվում է միջանցիկ տրանսկրիպցիայի հաշվին, որը հավանաբար նախաձևավորվում է metE հարևան գենի պրոմոտորից։ Ուսումնասիրված է udp գենի էքսպրեսիան rho 15 մուտանտում՝ metE կառուցվածքային գենը շոշափող տարբեր մուտացիաների ֆոնի վրա։ Ցույց է տրված, որ ի տարբերություն metE կետային մուտացիայի, metE::Tn 5 ինսերցիան ճնշում է rho 15 մուտացիայի էֆեկտը udp գենի էքսպրեսիայի վրա, վերականգնելով նրա զգայունությունը սպեցիֆիկ էֆեկտորների՝ cytR ռեպրեսորի սպիտակուցի և cAMP-CRP կոմպլեքսի նկատմամբ։ Ստացված տվյալների հիման վրա հետևություն է արված, որ rho 15 բակտերիաների գենոմում udp 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.

ЛИТЕРАТУРА

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, *14*, 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., *148*, 49, 1976.
10. *Kleckner N., Barker D. F., Ross D. G., Botstein D.* Genetics, *90*, 427, 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 pndA, ответственный за синтез второй пуриннуклеозидфосфорилазы E. coli K-12, расположен на 51 мин генетической карты и тесно сцеплен с геном-регулятором синтеза ПНФазы 2—pndR. Порядок генов на хромосоме, установленный с помощью многофакторных трансдукционных скрещиваний: nupC—proR—pndA—ptsH. Осуществлено молекулярное клонирование гена pndA в составе векторной плазмиды pBR322. Мутации pndA рецессивны по отношению к дикому аллелю pndA$^+$ на эписоме F′ или в составе плазмиды pBR322.

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

Ключевые слова: регуляция генной активности, структура и функция ферментов, пуриннуклеозидфосфорилаза.

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 пуриннуклеозидфосфорилазу (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 расщепляет ксантозин [12].

Изучение фенотипических ревертантов, полученных у мутантов deoD, показало существование у E. coli второй пуриннуклеозидфосфорилазы (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 pndR, 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 pndR синтез фермен-

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

В настоящей работе осуществлено генетическое картирование и молекулярное клонирование структурного гена ПНФазы2—pndA, а также установлено наличие двух форм фермента, различающихся некоторыми 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].

Конъюгационные и трансдукционные (фаг P1) скрещивания, введение в геном бактерий мутантного аллеля recA 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 Маниатису с соавт. [15].

Фосфоролиз 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 pndR1 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 цитохром 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% амфолинов с pH 5—7 и 0,4% с pH 3,5—10, а также 9 М мочевину.

Результаты и обсуждение. Отбор и идентификация мутантов по структурному гену pndA. Известно, что мутанты E. coli, дефектные по уридилфосфорибозилтрансферазе (upp), могут приобретать устойчивость к 5-фторурацилу в комбинации с пуриновым дезоксирибонуклеозидами за счет мутаций по ПНФазе 1 [16]. Для отбора мутантов, дефектных по ПНФазе2, использовали среды с 2,5 мкг/мл 5-фторурацила и 400 мкг/мл дезоксиаденозина, а в качестве родительского штамма—мутант SK737, лишенный активности ПНФазы1 (мутация deoD), но обладающий за счет мутации pndR10 конститутивным синтезом ПНФазы2 и несущий в геноме мутацию upp (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 ПНФазы2. Ранее было показано, что мутация pndR10 доминантна по отношению к дикому аллелю pndR⁺ на эписоме F′ 198-1 [3]. Поэтому следовало ожидать, что введение в клетки бактерий, дефектных по структурному гену ПНФазы2 и несущих в геноме мутацию pndR10, эписомы F′ 198-1 должно сопровождаться восстановлением спо-

Таблица 1

Штаммы E. coli K-12, использованные в работе

Штамм	Генотип*	Источник**
SK460	F⁻, val⁻, his, pndR1, rpsL, metB, purD, Δ (deoB—deoD) 25	[2]
LBG1158	F⁻, ptsH, cysA, trp, ilv, rpsL	В. Н. Гершанович (Москва)
NK6659	HfrKL16, srl : : Tn10, recA56	Д. А. Складнев (Москва)
AK607	F⁻, ptsH, cysA, ilv, rpsL, deoD8	[3]
AK626	F⁻, pndR10, ptsH, cysA, ilv, rpsL, deoD8	[3]
F'198—1/FF	F', pndR⁺, ptsH⁻, ptsI⁻, cysA⁺ / F⁻, proC43, ptsI 40, 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
S2 1024	Hfr11, nupC : : Tn10, metC69, thi1, rel1	Б. Мигинд (Копенгаген, Дания)

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

**—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.

собности 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*		Ксантозинфосфорилазная активность, наномолей в мин на мг
		аденозина, инозина и гуанозина	ксантозина	
LBG1158		+	+	0 (62)**
AK607	deoD	—	—	0 (71)**
SK737	deoD, pndR10	—	—	82
SK757	deoD, pndR10, pndA8	—	—	0
SK856	deoD, pndR10, pndA8 F'198—1	+	+	34
SK888	deoD, pndR10, pndA8, recA	—	—	0

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

**—В скобках указано значение активности в условиях индукции ксантозином (выращивания в среде с 0,1% ксантозина).

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 (nupC::Tn10), $CysA^-$ и $PndA^-$, которые анализировали на наследование неселектируемых маркеров nupC, pndR, pndA, ptsH и cysA. Во всех случаях соотношение рекомбинантных классов по неселектируемым маркерам соответствовало порядку генов на хромосоме: nupC—pndR—pndA—ptsH—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				
	$nupC^-$	$pndR^-$	$pndA^+$	$ptsH^+$	$cysA^-$
Tet^R (nupC::Tn10)	100	н. о.*	81.9	67.4	58.1
$CysA^-$	32.7	н. о.*	53.2	79.7	100
PndA	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 BamH1, лигировали полученные фрагменты и трансформировали клетки штамма SK815. В результате были отобраны клоны трансформантов, восстановившие 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 BamH1 и последующего электрофореза в агарозном геле, состоит из вектора pBR322 и встроенного 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, встроенный в плазмиду pBR322 BamH1 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 фосфоролиза в %			
дезоксиинозина	100 (91)*	100 (60)*	100
дезоксигуанозина	62	78	74
инозина	56	58	46
гуанозина	33	37	48
ксантозина	23	53	0
дезоксиаденозина	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 фосфоролиза	6.5—7.0	6.5—7.0	7.0—7.5

*—В скобках указано абсолютное значение активности в микромолях в мин на мг белка, принятое за 100%.

**—По данным работ [12, 14].

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

В результате единичной мутации pndA8, которая реверсирует с частотой $\sim 10^{-8}$, 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 Зипкаса 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 степени гомологии нуклеотидных последовательностей их структурных генов. Для этой цели предполагается использовать плазмиду pND1 с встроенным геном pndA.

Авторы считают своим долгом отметить неоценимую 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 ՊՈՒՐԻՆՆՈՒԿԼԵՈԶԻԴՖՈՍՖՈՐԻԼԱԶԱՅԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱՆ ԵՎ ԲԻՈՔԻՄԻԱՆ

Շ. Մ. ՔՈՉԱՐՅԱՆ, Խ. Հ. ԲԵԶԻՐՋՅԱՆ, Մ. Ա. ՄԵԼՔՈՒՄՅԱՆ, Ն. Ի. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ,
Ա. Մ. ՔՈՉԱՐՅԱՆ, Ժ. Ի. ՀԱԿՈԲՅԱՆ

E. coli K-*12-ի երկրորդ պուրիննուկլեոզիդֆոսֆորիլազայի (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* nupC-pndR-pndA-ptsH *բազմաֆակտոր տրանսդուկցիոն խաչասերումների օգնությամբ: Իրականացված է* pndA *գենի մոլեկուլյար կլոնավորումը* pBR *322 վեկտորային պլազմիդի կազմում:* pndA *մուտացիան* F' *էպիսոմի կամ* pBR *322 պլազմիդի կազմում գտնվող* pndA⁺ *վայրի ալելի նկատմամբ ռեցեսիվ է:*

ՊՆՖ-2-ի անջատման ընթացքում հաստատված է ֆերմենտի երկու ձևերի առկայությունը, որոնք իրարից տարբերվում են չորրորդային կառուցվածքով (տրիմեր և հեքսամեր), նատիվ ֆերմենտի և նրա ենթամիավորների մոլեկուլյար կշիռներով (տրիմերի համար՝ 85000 և 28000, հեքսամերի համար՝ 150000 և 25000), ինչպես նաև սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ՝ հեքսամերը, ի տարբերություն տրիմերի, չի ճեղքում ադենին նուկլեոզիդները:

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 — ptsH 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 purifications 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. *Аликанян С. И., Ильина Т. С., Калиева Э. С., Каменева С. В., Суходолец В. В.* Микробиология, *34*, 666—674, 1965.
2. *Безирджян Х. 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 Х. 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. *Alikhanian S. I., Ilyina T. S., Kalijaeva E. S., Kameneva S. V., Sukhodolec 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. *Davis B. J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., *121*, 404—427, 1964.
12. *Jensen K. F., Nygaard P.* Eur. J. Biochem., *51*, 253—265, 1975.
13. *Hammer—Jespersen K., Buxton R. S., Hansen T. D.* Mol. Gen. Genet., *179*, 341—348, 1980.
14. *Krenitsky T. A., Koszalka 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.* Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases microorganisms. London—New York, Acad. Press, 1983.
17. *Weber K. M., Osborn M. J.* Biol. Chem., *244*, 4406—4412, 1969.
18. *Zipkas D., Riley M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *72*, 1354—1358, 1975.

«Биолог. ж. Армении», 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 повторяющиеся последовательности ДНК, ответственные за рекомбинационные процессы в клетках бактерий и, по всей вероятности, обуславливающие структурно-функциональную вариабельность изученных плазмидных ДНК.

Ключевые слова: сальмонелла, плазмида.

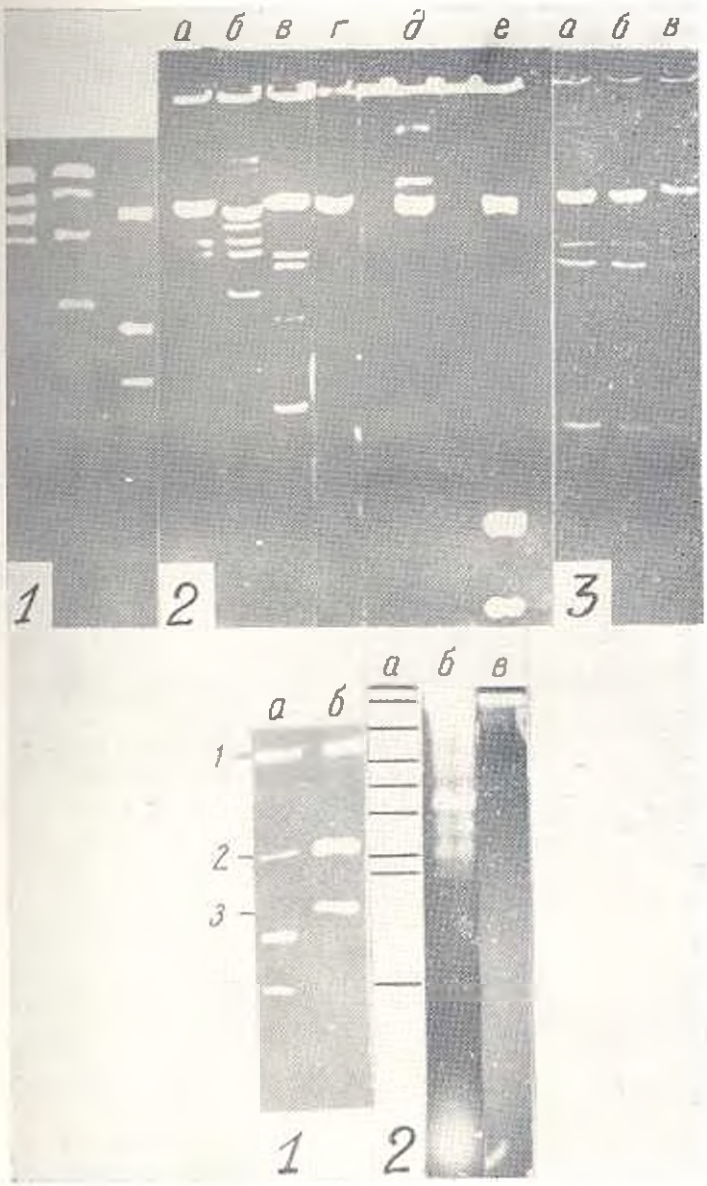


Рис. 1. 1. Электрофоретические профили плазмидных ДНК S. derby K-89 в различных условиях культивирования. 2. Электрофоретические профили плазмидных ДНК S. derby K-89 в составе трансформантов. а), б), в) E. coli J 5-3, трансформированные плазмидными ДНК 1, 2, 3. г) E. coli J 5-3; д) Pen—устойчивый трансформант E. coli J 5-3 (ДНК 3); е) Cm/Sm—устойчивый трансформант E. coli J 5-3 (ДНК 3). 3. Электрофоретические профили плазмидных ДНК экконъюгантов S. typhimurium AG-64. а) Pen—устойчивый экконъюгант, б) Sm—устойчивый экконъюгант, в) Cm—устойчивый экконъюгант.

Рис. 2. 1. Электрофорез плазмидных ДНК S. derby K-89, обработанных (б) и необработанных (а) S1 нуклеазой. 2. Электрофорез в 1.1%-ной агарозе. а) фаг λ, обработанный Pst I, б) инвертированные повторяющиеся последовательности ДНК S. derby K-89; в) инвертированные повторы ДНК S. derby K-89 после денатурации и ренатурации.

Salmonella derby К-89 выявлен в клинических изолятах больных детей в период доминирования этого штамма в качестве основного возбудителя сальмонеллеза в Армянской ССР [4]. У данного штамма определена антибиотикоустойчивость к пенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину. Ранее нами были выделены и охарактеризованы плазмидные ДНК S. derby К-89, ответственные за данный спектр устойчивости к антибиотикам [1—3, 6].

Материал и методика. Бактерии штамма S. derby К-89 выращивали в течение 18—20 ч при 37° в питательном бульоне, приготовленном на основе рыбной пасты (50 г пасты на 1 л воды) или на агаризованной среде с антибиотиками. Осветленные лизаты получали по Гуэрри [12]. Плазмидные ДНК осаждали изопропиловым спиртом, осадок после центрифугирования промывали, суспендировали в буфере 50 мМ Трис HCl (pH 7,8), 10 мМ Na_2 ЭДТА, к которому добавляли SDS до конечной концентрации 0,7%, и инкубировали в течение 60 мин при 65° в присутствии протеиназы К (200 мкг/мл) [11]. Затем ДНК депротеинизировали и осаждали спиртом. Идентификацию плазмидных ДНК проводили путем гель-электрофореза в 1%-ной агарозе (Serva, ФРГ) в буфере 0,04 М трис-ацетата (pH 7,8), 0,02 М ацетата Na, 0,002 М Na_2 ЭДТА.

Трансформацию плазмидными ДНК S. derby К-89 проводили по описанному нами ранее экспрессному методу [6]. В качестве реципиентов при этом использовали следующие штаммы: Salmonella typhimurium AG-64, предоставленный член-корр. АМН СССР А. Г. Скавронской, E. coli C-600, E. coli J 5—3. Реципиентные штаммы исследовали на антибиотикочувствительность и отсутствие плазмидной ДНК. Трансформанты возникали с частотой 10^5—10^6 на 1 мкг ДНК. После ряда проверок на стабильность фенотипа под селективным давлением из полученных клонов выделяли плазмидные ДНК, которые анализировали электрофорезом в 1%-ной агарозе.

В качестве реципиента при конъюгации использовали штамм S. typhimurium AG-64 Nal^{res}. Конъюгацию проводили согласно руководству Миллера [7] при 37° от 15 мин до 2 ч; контрселекцию — налидиксовой кислотой в концентрации 10 мкг/мл. Конъюганты возникали с частотой 10^{-5}—10^{-4}. После проверок на стабильность фенотипа из экконъюгантов выделяли плазмидные ДНК и изучали их поведение в 1%-ной агарозе при гель-электрофорезе в течение 3 ч при 80В.

Обработку S1-нуклеазой (Serva, ФРГ) проводили по описанной методике [5]. Пробы инкубировали при 37° в течение 15, 30 мин и 1 часа. Реакцию останавливали при 65°. Оптимальная концентрация S1-нуклеазы в наших опытах составляла 500 единиц на 1 мкг ДНК.

Выделение инвертированных повторяющихся последовательной ДНК проводили по известному методу [8], идентифицировали их гель-электрофорезом в 1,1%-ной агарозе при 60 В в течение 5 часов.

Результаты и обсуждение. Электрофоретические профили плазмидных ДНК S. derby К-89, выделенных при культивировании штамма в различных условиях, показаны на рис. 1, *1*. Плазмидные ДНК варианта «б» на рис. 2, *1* предназначались для трансформации.

Приведенная таблица отражает функциональную вариабельность плазмидных ДНК S. derby К-89 при экспрессии их в гетерологичных и гомологичных системах трансформации. Внимание привлекает тот факт, что все молекулы ДНК, выявляемые при гель-электрофорезе (рис. 2, *1*), передают при трансформации все исследуемые детерминанты антибиотикоустойчивости, что хорошо прослеживается на примере реципиента S. typhimurium AG-64. Однако в случае отдельной молекулы ДНК происходит диссоциация нестабильного фенотипа PenCmSm на стабильные CmSm и Pen или PenCm и Sm. В таблице показаны

различная экспрессия плазмидных ДНК в E. coli J 5-3, E. coli C-600, S. typhimurium AG-64. В наших экспериментах закономерен сам факт передачи одной молекулой ДНК независимо от молекулярной массы всех исследуемых признаков антибиотикоустойчивости, а именно Pen, Cm, Sm. В этой передаче разделяются 2 стабильных фенотипических признака PenCm и Sm в одном случае и CmSm и Pen — в другом. Ни в одном эксперименте по трансформации Cm не является самостоятельным фенотипически стабильным детерминантом, что подтверждается также опытами по конъюгации бактерий S. derby K-89 и S. typhimurium AG-64.

На рис. 1, *2*, и 1, *3* представлены электрофоретические профили плазмид S. derby K-89 в составе бактерий-трансформантов. Как видно, в них имеет место повышенная вариабельность структурных форм плазмидных ДНК.

ДНК 3 (рис. 2, *1* б, полоса 3) в штамме E. coli J 5-3, не имеющем плазмид в своем составе (рис. 1, *2* г), проявляет фенотип CmSm и Pen и при электрофорезе дает целый ряд полос, в том числе мигрирующих с крайне низкой скоростью, сопоставимой со скоростью миграции самой высокомолекулярной плазмиды (рис. 1, *2* в).

На рис. 1, *2* и 1, *3* видно, что низкомолекулярные плазмидные ДНК образуют в трансформантах высокомолекулярные формы, а ДНК 1 в составе трансформантов дает начало ряду низкомолекулярных форм.

При конъюгации S. derby K-89 с S. typhimurium AG-64 реципиентный штамм приобретал все признаки устойчивости к антибиотикам Cm, Sm, Pen, причем Pen-устойчивые колонии были устойчивы к Cm, но не к Sm, а Sm-устойчивые — только к Sm. Cm-устойчивые колонии конъюгантов росли также на Pen-чашках и были чувствительны к Sm.

Электрофоретический анализ плазмид, выделенных из эксконъюгантов, выявил наличие в случае с PenCm устойчивостью высокомолекулярной плазмидной ДНК, которая при Sm-устойчивости отсутствует (рис. 1, *3*).

Присутствие инвертированных повторяющихся последовательностей в генетическом материале S. derby K-89 определяли как указано в методике. На рис. 2, *2* представлены результаты гель-электрофореза в 1,4%-ной агарозе обработанного препарата плазмидных ДНК. Видно, что в составе исследуемых ДНК S. derby K-89 имеются обратные повторы ДНК с молекулярными массами, близкими по величине извест-

Таблица

Трансформация плазмидными ДНК Salmonella derby K-89

№ ДНК	Реципиенты					
	S. typhimurium AG—64		E. coli J 5—3		E. coli C—600	
ДНК № 1	PenCm	Sm	PenCm	Sm	PenCmSm	
ДНК № 2	PenCm	Sm	PenCm	Pen	Pen	Sm
ДНК № 3	PenCm	Sm	PenCmSm	Pen	PenCmSm	Pen
				CmSm	PenCm	Sm

ным инсерционным последовательностям (от 800 до 1500 т. п. н.), а также значительно превышающими их.

Результаты экспериментов убедительно показывают структурно-функциональную вариабельность плазмидных ДНК в составе S. derby K-89. Изучение фенотипически стабильных форм плазмидной ДНК выявило ряд закономерностей: каждая плазмида передает реципиентному штамму устойчивость ко всем исследуемым антибиотикам, однако во всех случаях происходит диссоциация «трехчленного» детерминанта PenCmSm на стабильные PenCm и Sm или CmSm и Pen, причем первый случай преобладает: плазмидные ДНК с низкими молекулярными массами образуют в составе трансформантов стабильные высокомолекулярные формы; высокомолекулярная ДНК 1 является коинтегратом, способным существовать, возможно, как в виде олигомера, так и катенана, а соотношение этих двух структурных форм в бактериях может определяться метаболическим состоянием бактерии-хозяина, условиями роста [10].

Из приведенных экспериментальных данных явствует, что метаболической системе S. derby K-89 свойственно поддержание в своем составе определенного количества (до 3-х) стабильных структурных форм плазмид с различными молекулярными массами, фенотипически выражающими устойчивость к пенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину.

В основе всех описанных явлений лежат рекомбинационные события, происходящие на внутримолекулярном и межмолекулярном уровнях. Полученные данные свидетельствуют о том, что обнаруженные в эксперименте инвертированные повторы ДНК вовлечены в подобные рекомбинации in vivo, известные для многих штаммов [9], и создают основу для существования сложной, но закономерной вариабельности структурно-функциональных форм плазмидных ДНК S. derby K-89.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 11.VI 1985 г.

K—89 ՇՏԱՄԻ *SALMONELLA DERBY* ՊԼԱԶՄԻԴԱՅԻՆ ԴՆԹ-ՆԵՐԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԱ-ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՎԱՐԻԱԲԻԼՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա. Ֆ. ԿԱԶԱՆՉՅԱՆ

Հոդվածում ցույց է տրված Salmonella derby K-8 *պլազմիդների ԴՆԹ-ի կառուցվածքա-ֆունկցիոնալ վարիաբիլությունը և ԴՆԹ-ի փոխակերպված կրկնվող հաջորդականությունների գոյությունը ուսումնասիրվող շտամում, որոնցով էլ հավանաբար պայմանավորված է այդ վարիաբիլությունը։ 1.4 % ագարոզայում էլեկտրաֆորեզի օգնությամբ բացահայտված են հայտնի JS-ների շրջանում մոլեկուլյար կշիռներով ԴՆԹ-ների փոխակերպված կրկնությունները, ինչպես և բարձրագույն կարգի փոխակերպված կրկնությունների առկայությունը։*

STRUCTURAL–FUNCTIONAL VARIABILITY OF PLASMID DNA-s OF *SALMONELLA DERBY* K—89 STRAIN

A. F. KAZANCHIAN

Data, concerning the variability of plasmid DNA structure and function in *Salmonella derby K—89* strain are shown. It has been found out that these plasmid DNA—s harbour the inverted repeat sequences, which appear to be responsible for the mentioned plasmid DNA variability.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Казанчян А. Ф., Вартанян М. К., Исраелян Ю. Т., Агабалян А. С., Захарян Р. А.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии. Ереван, 1979.
2. *Казанчян А. Ф., Вартанян М. К., Амирханова Л. М., Агабалян А. С., Захарян Р. А.* Биолог. ж. Армении, *31*, 3, 229—233, 1981.
3. *Вартанян М. К., Казанчян А. Ф., Амирханова Л. М., Агабалян А. С., Захарян Р. А.* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол., 8, 42—45, 1982.
4. *Матевосян Н., Карабеков Б., Вартанян М.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии. Ереван, 1971.
5. *Дрысин Ю. Ф., Зверев В. В.* Мол. биол., *16*, 633—636, 1982.
6. *Казанчян А. Ф.* В кн.: Вопросы молекулярно-клеточной биологии. Ереван, 1983.
7. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
8. *Ohtsubo H., Ohtsubo E.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. *73*, 7, 2316—2320, 1976.
9. *Bukhari A. G., Shapiro G. A., Adhya S. L.* In: DNA Insertion Elements Plasmids and Episomes. Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
10. *Bazaral M., Hellinsky D. R.* Biochemistry, 7, 3513—3520, 1968.
11. *Faust R., Spizizen G., Gage V., Travers R.* Journal of Invertebrate Pathology, *33*, 2, 233—238, 1979.
12. *Guerry P., Le Blanc D. G., Falkow S.* Journal of Bacteriology, *116*, 1064—1066, 1973.