

К. М. ЗЛОТНИКОВ, М. И. ХМЕЛЬНИЦКИЙ

ОБ АВТОНОМНОСТИ ВНУТРИГЕННОГО МЕХАНИЗМА РЕКОМБИНАЦИИ У *ESCHERICHIA COLI* K-12

(Представлено академиком А. А. Баевым 29 VIII 1972)

К настоящему времени накопилось очень много косвенных данных, которые позволяют разделять механизм генетической рекомбинации на межгенный и внутригенный механизмы. Это, прежде всего, данные о существовании высокой локальной отрицательной интерференции⁽¹⁾, о выявлении при генетическом анализе у грибов особых единиц организации генома — поляронов^(2,3), о различном влиянии внешних факторов на межгенные и внутригенные рекомбинации^(4,5) и так далее (подробнее см. в книге Кушева⁽⁶⁾). Следует отметить, что выражение «внутригенный механизм рекомбинации» при существующем уровне знаний о структурно-функциональной организации генома является условным и соответствует пока выражению «механизм рекомбинации на коротких участках». Тем не менее, представление об автономности внутригенного механизма рекомбинации дает основание высказать рабочую гипотезу о существовании в клетке особой ферментной системы для внутригенных рекомбинаций. При нарушении такой системы посредством мутации в первую очередь должны наблюдаться изменения в частотах внутригенных рекомбинаций. Задачей настоящей работы и было выяснение возможности выделения мутантов *hes*⁻ с такими свойствами у *E. coli* K-12.

Мутанты получали с помощью NG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) у штамма F⁻P86 (генотип штамма, табл. 1). При этом культуры в логарифмической фазе роста обрабатывали мутагеном в концентрации 100 мг/мл в течение 20 мин. при 37° в 0,1 М цитратном буфере pH 6,0⁽⁷⁾ — условия, при которых уровень выживаемости бактерий был около 40%. После отмыва от мутагена и подрачивания в течение 6—8 час. в мясо-пептонном бульоне (м. п. б) культуры высевали на чашки с минимальной средой и выросшие колонии проверяли на способность осуществлять генные и внутригенные рекомбинации в скрещиваниях с HfrAB312 и Hfr312argG₇ (генотип штаммов — табл. 1), отбирая рекомбинанты *arg*⁺*pur*⁺. Для повторной проверки брали колонии, которые давали рекомбинанты *arg*⁺*pur*⁺ в скрещиваниях с HfrAB312 и не давали (или давали очень мало) в скрещиваниях с Hfr312argG₇. Скрещивания проводили в плосках из оргстекла с лунками, откуда конъюгационная смесь печаталась на чашки с селективной средой с помощью специальных печаток. Этот метод позволил нам анализировать в день до 200 колоний.

Из более чем 2000 проверенных колоний нам удалось отобрать 8 независимо выделенных мутантов, у которых наблюдалось значительное снижение частоты внутригенных рекомбинаций в гене *argG*. Частота рекомбинаций определялась в специальных скрещиваниях как отношение в процентах числа рекомбинантов класса по внутригенным рекомбинациям (класс а) к общему числу рекомбинантов родительского класса (класс б, табл. 1). У части штаммов параллельно со снижением частоты внутригенной рекомбинации резко снизился и уровень ревертабельности по гену *arg*. Генетический анализ этих штаммов показал, что они являются *hes*⁺, и их свойства обусловлены дополнительными мутациями или в других генах

arg, или в пределах локуса argG (для выяснения второго случая мы заменяли у исследуемых штаммов район хромосомы с локусом argG на аналогичный район от родительского штамма P86 и проверяли у них уровень ревертабельности и частоту рекомбинации в гене argG). Остальные мутанты имели нормальный уровень ревертабельности по гену argG, частота внутригенной рекомбинации в этом гене у них была снижена в зависимости от штамма в 2—4 раза. При проверке способности включать маркеры донора в расчете на 100 клеток Hfr все они показывали фенотип res^+ (проверяли в скрещиваниях с HfrKL16 и HfrH), кроме того все мутанты, за исключением res_s , были устойчивы к у.-ф. Известные до сих пор классы res^- мутантов характеризуются снижением частоты включения марке-

Таблица 1

Частоты внутригенных рекомбинаций в скрещиваниях Hfr × F⁻ (данные единичных опытов)

Штаммы Hfr* и время скрещивания в мин.	Штаммы F***	а *** в 0,5 мл конъюгационной смеси			Штаммы Hfr* и время скрещивания в мин.	Штаммы F***	а *** в 0,5 мл конъюгационной смеси		
		в 0,5 мл конъюгационной смеси	(×100) в 0,5 мл конъюгационной смеси	Частота рекомбинации в % (a/b)			в 0,5 мл конъюгационной смеси	(×100) в 0,5 мл конъюгационной смеси	Частота рекомбинации в % (a/b)
312 arg G ₇ , 30	recI ₈	25	870	0,03	311 his ₂ , 50	recI ₈	228	690	0,33
	prvI ₁	87	370	0,23		prvI ₁	870	512	1,69
	P86	220	1750	0,13		P86	1192	1418	0,84
	recI ₈	120	1070	0,11		recI ₈	470	1270	0,37
KL 16thy ₁ , 50	prvI ₁	1540	3700	0,42	30 SODrm ₇ , 40	prvI ₁	1460	794	1,84
	P86	194	283	0,68		P86	706	760	0,93

* 312 argG₇ — производный штамма AB312 (см. (9)), у которого нами получена с помощью NG мутация argG₇. Генотип штамма: thi, pur, argG, lac. KL thy₁ — производный штамма KL16 (9), у которого нами с помощью аминокислотной методики выделена мутация thy₁. Генотип штамма: thi, thy₁, 311 his₂ — производный штамма AB311 (9), у которого с помощью NG мы получили мутацию his₂. Генотип штамма: thi, thr, leu, lac, his₂ (Δ defective). 30 SODrm₇ — производный HfrH (9), старое обозначение штамма Hfr thr₁ (10). Генотип штамма: thi, lac, thy, drm.

В скрещиваниях с целью стандартизации условий через указанные промежутки времени осуществляли прерывание конъюгации с помощью фара T₆ с множественностью, большей 100.

** Штамм P86 происходит от штамма P678 и имеет генотип: thi, malA, drm, xyl, mtl, rha, ara, lac, gal, arg⁺, thr, leu, trp, his, thyA, aroF, str, t⁺, t⁺rA. Мутации rha, argG, trp, his, thyA, aroF, t⁺х выделены нами (thyA — с помощью аминокислотной методики, t⁺х и drm — спонтанные мутации, остальные получены с помощью NG). Обозначение маркеров см. (11).

*** а, b — классы рекомбинантов. В скрещиваниях с Hfr312 argG₇: а — arg⁺ mal⁺ pur⁺, b — mal⁺ pur⁺; с KL16thy₁: а — thy⁺ his⁺ str⁻, b — his⁺ str⁻; с 311 his₂: а — his⁺ trp⁺ str⁻, b — trp⁺ str⁻; с 30 SODrm₇: а — drm⁺ leu⁺ str⁻, b — leu⁺ str⁻ (селективные условия для отбора рекомбинантов класса drm см. (11)). Класс b, (×100).

ров донора, и уже на основе этого признака выделенные нами мутанты можно отнести к особому классу. В соответствии с устоявшимся способом обозначения res^- мутантов (8), выделенные мутанты мы предварительно обозначили как класс recI.

Для детального изучения мы взяли у.-ф. чувствительный мутант recI₈, так как нас интересовал вопрос о возможной связи у.-ф.-чувствительности с механизмом внутригенной рекомбинации. Этот мутант, в отличие от других, характеризовался заметно сниженной жизнеспособностью и чувствительностью к высоким температурам, при дозе у.-ф. 200 эрг/мм² выживаемость у него была около 10%. В табл. 1 приведены величины внутригенных рекомбинаций для этого штамма в генах argG, thyA, his и drm. Во всех случаях была зафиксирована статистически достоверная разница в частотах рекомбинации по сравнению с контрольным штаммом P86, причем в генах argG и thyA эта разница достигала величины 4 и 6. Такая разница позволила нам осуществить картирование гена recI на хромосоме E. coli. В скрещиваниях различных штаммов Hfr со штаммом recI₈ мы отбирали рекомбинанты по маркерам, расположенным в разных частях хромосомы, и проверяли их на наследование фенотипа recI (в скрещиваниях с Hfr312argG₇) и у.-ф.-чувствительности. В этих опытах было пай-

дено, что оба свойства наследуются с большой частотой с генами *mtl* и *rha*. Кроме того, при анализе 30 рекомбинантов *rha*⁺ был обнаружен рекомбинант генотипа *rha*⁺ *recI* *uv-r*. Этот факт говорит о том, что свойства *recI* и *uv-s* контролируются разными генами.

Следует отметить, что низкие частоты внутригенных рекомбинаций в скрещиваниях со штаммом *recI*_s хорошо воспроизводятся только в опытах со свежими культурами. После хранения и нескольких пересевов штрихом на чашках с мясо-пептонным агаром (м.п.а.) культуры дают более высокие значения частот рекомбинации. Оказалось, что последнее свойство вызывается накоплением в культурах псевдоревертантов, и из расставов таких культур нам удалось выделить штамм (мы его обозначили *prvI* № 1), который показывал частоты

внутригенных рекомбинаций, гораздо более высокие (за исключением гена *thy*), чем даже контрольный штамм P86 (табл. 1). Штамм *prvI*, кроме того, практически восстанавливал нормальный уровень жизнеспособности и не отличался от штамм *recI*_s по у.-ф.-чувствительности. Предполагая, что свойство *prvI* обусловлено супрессорной мутацией в неизвестном гене, мы предприняли картирование этого гена на хромосомной карте. Использовали при этом тот же метод, что и при картировании гена *recI* и нашли, что ген *prvI* тесно сцеплен с геном *thyA* (около 90% сцепления).

При нашем способе определения частоты внутригенной рекомбинации источником артефактов могло бы быть значительное изменение у мутантов *recI*_s и *prvI*₁ уровня сцепления между маркерами донора. Однако в специально сделанных опытах нам не удалось обнаружить сколько-нибудь заметную разницу в сцеплении маркеров донора у мутантов *recI*_s, *prvI*₁ и контрольного штамм P86.

Основное значение полученных результатов, на наш взгляд, состоит в том, что они доказывают существование у *E. coli* особой энзиматической системы, контролирующей внутригенные рекомбинации. Эта система, очевидно, представляет единый для всего генома механизм, так как эффект мутаций *recI*_s и *prvI*₁ проявляется в нескольких генах, расположенных в разных частях хромосомы. Известные же гены *rec* у грибов (¹²) влияют на частоту внутригенных рекомбинаций только в определенных генах и, по-видимому, затрагивают иную систему контроля.

У мутанта *recI*_s частоты внутригенных рекомбинаций снижены в несколько раз, под влиянием же мутации *prvI*₁ они становятся гораздо более высокими, чем даже у контрольного штамма. При этом частота наследования маркеров донора в расчете на 100 клеток *Hfr* у штаммов *recI*_s и *prvI*₁ заметно не снижена. Эти данные указывают на существование специального механизма внутригенных рекомбинаций, отличного от механизма межгенной рекомбинации (механизм интеграции фрагментов ДНК донора). Попробуем теперь допустить, что у известных мутантов *rec* A, B и C нарушен механизм межгенной рекомбинации. В таком случае механизм внутригенной рекомбинации у них должен функционировать нормально. Для проверки этого предположения нами были сделаны специальные опыты.

В скрещиваниях *Hfr* штаммов JC5088, JC5412, JC5426 (¹³) с F-P86 мы получили штаммы F-P86 *thy*⁺ *recB*, P86 *thy*⁺ *recC* и P86 *thy*⁺ *recA* и проверили у них в скрещиваниях со штаммов 3080 *drm*, частоту внутриген-

Таблица 2
Частоты внутригенных рекомбинаций в гене *drm* у штаммов *rec*⁻ классов A, B и C (суммарные данные двух опытов) *

Штаммы <i>rec</i> ⁻	а в 2 мл конъюгационной смеси	б (X40) в 2 мл конъюгационной смеси	Частота рекомбинации
P86 <i>recB</i>	23	182	1,26
P86 <i>recC</i>	62	1035	0,59
P86 <i>recA</i>	0	317	0,00
P86	1060	11970	0,88

* Обозначения см. в табл. 1 и в тексте.

ной рекомбинации в гене *dtm*. Для предотвращения проникновения гес⁺ аллеля время конъюгации было ограничено 30 мин. В опытах со штаммами гес В и С трудно было получить большие количества рекомбинантов родительского класса, вследствие чего наблюдались колебания от опыта к опыту в частоте внутригенной рекомбинации. Несмотря на это, полученные данные (табл. 2) позволяют сделать вывод о том, что частота внутригенной рекомбинации у этих штаммов практически не отличается от таковой у контрольного штамма. Следовательно, эти результаты также говорят в пользу автономности механизмов внутригенной и межгенной рекомбинаций.

В случае штамма гесА нам не удалось получить рекомбинанты класса *dtm*⁺*leu*⁺. Возможно, ферментная система гесА необходима как при межгенных, так и при внутригенных рекомбинациях. С другой стороны показано, что в скрещиваниях с F⁻гес А образуются в основном не истинные рекомбинанты, а устойчивые меродиплоиды (¹⁴). Значит, в наших опытах количество настоящих рекомбинантов *leu*⁺ могло быть недостаточным для выявления класса *dtm*⁺*leu*⁺.

Авторы глубоко признательны академику А. А. Баеву за помощь в работе и участие в обсуждении полученных данных.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
Академии наук СССР
Пушкино-на-Оке

Поступило
21 VIII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. C. Norkin, J. Mol. Biol., **51**, 633 (1970). ² P. Lissoube, G. Rizet, C. R., Ser. D, **250**, 3408 (1960). ³ N. E. Murray, Genetics, **48**, 1163 (1963). ⁴ R. Holliday, In: Replication and Recombination of the Genetic Material, Canberra, 1968, p. 157.
- ⁵ E. G. Hunnabale, B. S. Cox, Mutation Res., **13**, 291 (1971). ⁶ В. В. Кушев, Механизмы генетической рекомбинации, Л., 1971. ⁷ E. A. Adelberg, M. Mandel, G. C. C. Chen, Biochem. Biophys. Res. Commun., **18**, 788 (1965). ⁸ P. K. Storm, W. P. M. Hackstra et al., Mutation Res., **13**, 9 (1971). ⁹ A. L. Taylor, C. D. Trotter, Bacteriol. Rev., **31**, 332 (1967). ¹⁰ К. М. Злотников, В. В. Суходолец, Г. Э. Бауманис, Генетика, **5**, № 12, 114 (1969). ¹¹ A. L. Taylor, Bacteriol. Rev., **34**, 155 (1970). ¹² D. G. Catcheside, Barbara Austin, Aust. J. Biol. Sci., **24**, 104 (1971). ¹³ N. S. Willetts, A. J. Clark, J. Bacteriol., **100**, 231 (1969). ¹⁴ М. В. Торосян, О. В. Шипикова, Генетика, **8**, № 7, 103 (1972).