



УДК 576.859.9 : 576.851.48

Сергей ТАММ

РЕКОМБИНАЦИОННЫЙ ХАРАКТЕР ТОЧНОЙ ЭКСЦИЗИИ ТРАНСПОЗОНА Tn9 *ESCHERICHIA COLI* K-12

У прокариот принято различать три класса подвижных генетических элементов или транспозонов: бактериофаг μ и ему подобные; элементы семейства Tn3 или «истинные транспозоны»; составные транспозоны (Клекнер, 1981).

Составные транспозоны чрезвычайно интересны, в частности, как факторы эволюции, так как состоят из мобильных элементов IS, фланкирующих любую и сколь угодно длинную часть бактериального генома.

IS — элементы составных транспозонов могут быть как в обратной (например, Tn5 и Tn10), так и в прямой ориентации. Типичным примером последнего является транспозон Tn9, у которого элементы IS 1 (768 нп) фланкируют уникальную часть, содержащую детерминант устойчивости к хлорамфениколу (Хесин, 1984).

При внедрении транспозона в мишень на концах интегрированного элемента образуются прямые короткие повторы (ПКП). Для Tn9, Tn5 и Tn10 это последовательности в 9 нп.

В случае точной эксцизии транспозона происходит восстановление целостности генома, в частности — восстановление функции гена инактивированного интегрированным элементом. При этом вместе с транспозоном исключается и один из ПКП мишени. Естественно предположить, что в процессе точной эксцизии гомологические ПКП в 9 нп принимают непосредственное участие. Именно это и постулирует модель рекомбинационной эксцизии (Горышин и др., 1987).

Явление точной эксцизии изучено сравнительно слабо. Высказывается точка зрения, что этот процесс не зависит от системы гомологической рекомбинации клетки и протекает по механизму «проскальзывания» в ходе репликации (Egner, Berg, 1981).

Модель «проскальзывания» основана на представлении, что длинные инвертированные повторы (элементы IS) вступают в синаптическое взаимодействие и образуют структуру стебель—петля, мимо которой якобы и проскальзывает репликативный комплекс. Достаточно очевидно, что в случае транспозона Tn9 с IS-элементами в прямой ориентации такое проскальзывание невозможно, так как структура стебля—петля не образуется. Между тем точная эксцизия Tn9 осуществляется с вероятностями того же порядка величины как у Tn5 и Tn10.

В настоящей работе показано, что, действительно, точная эксцизия транспозона Tn9 (в отличие от Tn5 и Tn10) в ходе конъюгации не усиливается, а зависит от активности рекомбинационных ферментов клетки.

Материал и методика

Штаммы представлены в табл. 1. Для выращивания клеток и для конъюгации использовали максимальную среду LB и минимальную среду M9 (Миллер, 1976).

Использованные в работе штаммы

Штамм	Генотип
AB1157: ECK107: MR30 HfrP4x ECK100-9 ECK107-9	thr, leu, his, proA, argE, rec ⁺ как AB1157, но recA441 (tif), lexA51, sfiA1 $\Delta(\text{proAB-lac})$, rec ⁺ proA: :Tn9, rec ⁺ как AB1157, но proA: :Tn9 как ECK107, но proA: :Tn9

Таблица 2

Частоты точной эксцизии транспозона Tn9 из сайта proA: :Tn9 (локализованного на факторе F') в штаммах с различным генотипом rec

Штамм	rec-генотип	Частота эксцизии*
AB1157	rec ⁺	$(1,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$
ECK107	recA441 (tif) lexA51, sfiA1	$(2,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-8}$

* Частоту эксцизии определяли как N_p/N_o (по трем измерениям), где N_p — число клеток с фенотипом Pro⁺; N_o — общее число клеток.

Таблица 3

Частоты точной эксцизии транспозона Tn9 из сайта proA: :Tn9 (локализованного на факторе F') после конъюгации с реципиентами, содержащими различный rec-генотип

Донор	Реципиент	Rec-генотип	Частота эксцизии*
MR30/F'proA: :Tn9	AB1157	rec ⁺	$(3,2 \pm 1,5) \cdot 10^{-8}$
"	ECK107	recA441 (tif) lexA51, sfiA1	$(3,3 \pm 1,0) \cdot 10^{-8}$

* Частоту эксцизии определяли как N_p/N_o (по трем измерениям), где N_p — число сексдуктантов Pro⁺, N_o — число сексдуктантов Ст^r.

Таблица 4

Частота эксцизии транспозона Tn9 из сайта proA: :Tn9 (локализованного на хромосоме HfrP4x) после конъюгации с реципиентами, различающимися по гену rec

Реципиент	Rec-генотип	Частота эксцизии *
AB1157	rec ⁺	не более $1 \cdot 10^{-8}$
ECK107	recA441 (tif) lexA51, sfiA1	$(2,5 \pm 1) \cdot 10^{-7}$

* Частоту эксцизии определяли как N_p/N_o (по трем измерениям), где N_p — выход рекомбинатов Pro⁺, N_o — выход рекомбинатов Ст^r.

Конъюгацию проводили по стандартной методике (Миллер, 1976), при соотношении 1 донор на 2 реципиента. Точную эксцизию определяли по восстановлению фенотипа Pro^+ , утраченного при интеграции транспозона в ген proA .

В селективные минимальные чашки добавляли додецилсульфат натрия до концентрации $4 \cdot 10^{-2}\%$ для предотвращения вторичной конъюгации. При сравнении вероятностей эксцизии соблюдали условия стандартного выращивания клеток в течение заданного числа генераций.

Результаты и обсуждение

В табл. 2 представлены данные о частоте точной эксцизии транспозона Tn9 из состава фактора F' , не подвергшегося конъюгации. Фактор F' , несущий одну и ту же инсерцию proA : Tn9 , поместили в штаммы, обладающие разной активностью рекомбинационной системы. Оказалось, что частота эксцизии практически не зависит от генетического фона. Те же штаммы использовали в качестве реципиентов в конъюгационном скрещивании с донором $\text{MR30}/F' \text{proA} : \text{Tn9}$. Данные о частотах точной эксцизии после конъюгации представлены в табл. 3. Эти частоты практически одинаковы и мало отличаются от величин точной эксцизии, полученных без конъюгации. Действительно, в отличие от случаев с Tn5 и Tn10 (Berg и др., 1983), в ходе конъюгационной передачи фактора $F' \text{proA} : \text{Tn9}$ однострочное состояние передаваемой ДНК не способствует образованию структуры стебель—петля (из-за прямой ориентации IS-элементов) и, следовательно, не увеличивает частоту точной эксцизии этого транспозона. Следует отметить, что рекомбинационные события при передаче фактора F' достаточно редки и не могут дать заметного вклада в величину точной эксцизии.

Иная ситуация складывается в случае использования в качестве донора штамма HfrP4x , несущего ту же инсерцию $\text{proA} : \text{Tn9}$. Принципиальное отличие этих экспериментов в том, что генетический материал, переданный штаммом Hfr , может фенотипически проявиться в реципиенте только после рекомбинации. Именно на этапе рекомбинационного взаимодействия донорного и реципиентного материала может сказаться различие в активности рекомбинационных систем разных штаммов.

При использовании штамма ЕСК107-9 , имеющего повышенную рекомбинационную активность за счет мутации гена A441 (tif), частота точной эксцизии оказывается на порядок величины выше, чем во всех рассмотренных ранее случаях (табл. 4). Что же касается штамма AB1157 с обычной активностью рекомбинационной системы, нам не удалось получить клоны с фенотипом Pro^+ (из-за некоторой ограниченности используемой в работе экспериментальной системы).

Нет сомнений, что имеет место резкое увеличение частоты точной эксцизии Tn9 , сопряженное с усиленными рекомбинационными событиями в клетке.

Аналогичный эффект описан и для транспозонов Tn5 и Tn10 , но для них это, видимо, связано с влиянием инвертированных IS-элементов на процесс точной эксцизии.

Итак, представленные данные указывают на рекомбинационный характер точной эксцизии транспозона Tn9 , что позволяет по новому взглянуть на некоторые проблемы, связанные с подвижными генетическими элементами прокариот.

- Горышин И. Ю., Тамм С. Э., Ланцов В. А. Составные транспозоны Tn5 и Tn10 у *Escherichia coli* K-12: точная эксцизия и рекомбинация // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1987, № 6, 17—23.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
- Хесин Р. Е. Непостоянство генома. М., 1984.
- Berg, D. E., Egner, C., Lowe, J. B. Mechanism of F-factor-enhanced excision of transposon Tn5 // Gene, 1983, 22, 1—7.
- Egner, C. E., Berg, D. E. Excision of transposon Tn5 is dependent on the inverted repeats but not on the transposase function of Tn5 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 459—463.
- Kleckner, N. Transposable elements in prokaryotes // Ann. Rev. Genet., 1981, 15, 341—404.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
12/IV 1989

Sergei TAMM

**ESCHERICHIA COLI K-12 TRANSPOSOONI Tn9 TÄPSE
EKSTSISIOONI REKOMBINATSIOONILINE ISELOOM**

Liittransposoonide täpset ekstsisiooni prokarüootidel on seletatud ülelibisemise mudeliga. Vastavalt sellele mudelile moodustab invertteeritud kordustega alusjada sünaptilise toime tulemusel varre ja silmusega struktuuri, millest replikatsioonikompleks üle libiseb, sünteesides transposoonita ahela. Kuid tuntakse ka selliseid transposoone, mis sisaldavad samasuunaliselt orienteeritud IS-elemente ega saa moodustada varre ja silmusega struktuure. Need transposoonid alluvad ekstsisioonile sagedusega, mis on samas suurusjärgus tavaliste transposoonide ekstsisioonisagedusega. Käesolevas töös esitatud andmed näitavad, et samasuunaliselt orienteeritud IS-elementidega transposooni Tn9 täpne ekstsisioon toimub rekombinatsiooni teel. Täpse ekstsisiooni sagedus kasvab, kui kasutada kõrgenenud rekombinatsiooniaktiivsusega tüve.

Sergei TAMM

**RECOMBINATIONAL CHARACTER OF THE PRECISE EXCISION
OF A Tn9 TRANSPOSON IN ESCHERICHIA COLI K-12**

The precise excision of composite transposons of prokaryotes has been explained by a slippage model. According to this model the long inverted repeats can form a stem-loop structure that the replicational complex slips over synthesizing a chain without transposons. There are also transposons with IS elements in direct orientation that are unable to form stem-loop structures. The excision frequencies of these transposons and of the "ordinary" ones are in the same order. The data presented in this paper show that the precise excision of the Tn9 transposon with IS elements in direct orientation takes place by a recombinational mechanism. The frequency of precise excision increases when the strains with increased recombinational activity are used.