

Сергей ТАММ

## РЕКОМБИНАЦИОННАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ТОЧНОЙ ЭКСЦИЗИИ ТРАНСПОЗОНА Tn5 У *ESCHERICHIA COLI* K-12

Транспозоны — это подвижные генетические элементы, которые благодаря своей структуре способны перемещаться в генетическом материале из одного сайта в другой с помощью сайтспецифической рекомбинации.

Все известные транспозоны могут быть подразделены на три группы: элементы семейства Tn3; бактериофаг Mu и ему подобные; элементы IS и составные транспозоны (Kleckner, 1981). Последние состоят из двух модулей IS, образующих длинные инвертированные повторы, и фланкируют уникальную последовательность элемента.

Составной транспозон Tn5 содержит модули IS50. Уникальная часть его включает, в частности, последовательность, кодирующую устойчивость к канамицину (Reznikoff, 1982). Этот транспозон не отличается строгой специфичностью застройки. При встраивании в ДНК его транспозона производит смещенный разрез в девять нуклеотидных пар (НП), так что транспозон оказывается фланкированным прямыми повторами в 9 НП ДНК-мишени. Эти прямые повторы являются важным элементом, который принимает участие в таком процессе, как точная эксцизия транспозона.

Различают три вида эксцизии: точную, неточную и точную после неточной (Foster и др., 1981).

В ходе точной эксцизии происходит полное исключение транспозона (с одним прямым повтором), сопровождаемое восстановлением функции гена, утраченной из-за застройки в него транспозона. Она в принципе маловероятна, имеет сложную генетическую детерминированность, свидетельствующую о существовании нескольких молекулярных механизмов, лежащих в ее основе (Lundblad, Kleckner, 1985).

К настоящему времени в литературе общепринята модель «прокальзывания» (Egner, Berg, 1981), предполагающая «перескок» репликативного комплекса с одного прямого повтора на другой, в момент расплетания ДНК, когда транспозон может складываться в структуру стебель—петля (стебель образуют IS-элементы, а петлю — уникальная часть транспозона).

Весомым аргументом в пользу этой модели послужили наблюдения Д. Е. Берга и др. (Berg и др., 1983), показавшие, что многократное усиление эксцизии транспозона Tn5 из состава плазмиды F' связано со взаимной конъюгацией доноров F'. Действительно, при конъюгации донор передает лишь одну нить ДНК с 5'-конца (Rupp, Ihler, 1968), что должно способствовать образованию структуры стебель—петля. В настоящей работе приводятся данные, подтверждающие, что в повышении частоты эксцизии кроме конъюгационной существенную роль может играть и рекомбинационная составляющая.

### Материал и методика

Штаммы представлены в табл. 1.

Среды. Для выращивания клеток и конъюгации использовали максимальную среду LB и минимальную среду M9 (Миллер, 1976).

## Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип
MR30	$\Delta(\text{proAB-lac}) \text{ rec}^+$
MR30-T	MR30, но $\text{his}::\text{Tn10}$
AB1157	$\text{his}, \text{thr}, \text{leu}, \text{proA}, \text{argE}, \text{rec}^+, \text{gpsB}$
ЕСК086	как AB1157, но $\text{his}^+ \text{ recA56}$
ЕСК107	как AB1157, но $\text{rec A441 (tif)}$
	$\text{lexA51}, \text{sfiAI}$
ЕСК079	как ЕСК086, но $\text{gps}^+$
ЕСК077	как AB1157, но $\text{gps}^+$
ЕСК100-5	как AB1157, но $\text{proA}::\text{Tn5}$
ЕСК107-5	как ЕСК107, но $\text{proA}::\text{Tn5}$
ЕСК100-510	как AB1157, но $\text{proA}::\text{Tn5}, \text{Tn10}$
ЕСК107-510	как ЕСК107, но $\text{proA}::\text{Tn5}, \text{Tn10}$
HfrP4x-5	$\text{metB}, \text{proA}::\text{Tn5}$

Конъюгацию проводили по стандартной методике (Миллер, 1976), придерживаясь соотношения: 1 донор на 2 реципиента. Точную эксцизию определяли по восстановлению фенотипа  $\text{Pro}^+$ , утраченного при интеграции транспозона в ген  $\text{proA}$ . Для предотвращения вторичной конъюгации в селективные минимальные чашки добавляли додецилсульфат натрия до концентрации  $4 \cdot 10^{-2} \%$ .

При сравнении вероятностей эксцизии соблюдали условия стандартного выращивания клеток в течение заданного числа генераций.

## Результаты и обсуждение

Частота эксцизии транспозона  $\text{Tn5}$  из состава фактора  $F'$ , как видно, зависит от генетического фона донорного штамма (табл. 2). Фактор  $F'$ , несущий одну и ту же инсерцию  $\text{proA}::\text{Tn5}$ , помещали в штаммы с разной активностью рекомбинационной системы. Штамм MR30 содержит протяженную делецию, совпадающую с тем хромосомным материалом, который несет фактор  $F'$ . В этом случае, несмотря на целостность системы  $\text{Rec}$ , гомологическая рекомбинация в интересующей нас области невозможна.

Таблица 2

Частоты точной эксцизии транспозона  $\text{Tn5}$  из сайта  $\text{proA}::\text{Tn5}$ , локализованного на факторе  $F'$  в штаммах с различным генетическим фоном\*

Штаммы	Генотип, влияющий на рекомбинацию	Частота эксцизии
MR30	$\Delta(\text{proAB-lac}), \text{rec}^+$	$(6,9 \pm 1,5) \cdot 10^{-8}$
ЕСК079	$\text{recA56}$	$(6,0 \pm 1) \cdot 10^{-8}$
ЕСК077	$\text{rec}^+$	$(3,4 \pm 1,2) \cdot 10^{-7}$
ЕСК107	$\text{recA441 (tif)}, \text{lexA51}, \text{sfiAI}$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$

\* Частоту эксцизии определяли по трем измерениям как  $N_p/N_0$ , где  $N_p$  — число клеток, приобретших фенотип  $\text{Pro}^+$ ;  $N_0$  — общее число клеток.

Штамм ЕСК077 имеет нормальную рекомбинационную активность (*rec*<sup>+</sup>), а ЕСК107 — увеличенную активность за счет мутации *rec* А441 (*tif*), придающей клеткам рекомбиногенный фенотип (табл. 1). Наконец, штамм ЕСК079 имеет повреждение *rec* А56 в главном гене гомологической рекомбинации, что полностью инактивирует ее.

Из данных табл. 2 видно, что имеет место статически достоверное увеличение частоты эксцизии Тп5, сопряженное с разрешенными или усиленными рекомбинационными событиями в клетке.

Частоты точной эксцизии транспозона Тп5 после скрещивания донора F'ргоА: : Тп5 с реципиентами, обладающими различным рекомбинационным генетическим фоном, очень близки (табл. 3). Это связано с тем, что главный вклад в эксцизию в данном случае дают события, развивающиеся в ходе конъюгационной передачи плазмиды F' с интегрированным транспозоном.

Таблица 3

Частоты точной эксцизии транспозона Тп5 из сайта ргоА: : Тп5, локализованного на факторе F' после конъюгации с реципиентами, содержащими различные мутации *rec*\*.

Донор	Реципиент	Частота эксцизии после конъюгации
F'ргоА: : Тп5/MR30	MR30-T	$(2,3 \pm 1) \cdot 10^{-6}$
"	AB1157	$(2,1 \pm 1,5) \cdot 10^{-6}$
"	ЕСК086	$(3,5 \pm 1,5) \cdot 10^{-6}$
"	ЕСК107	$(4,9 \pm 2,2) \cdot 10^{-6}$

\* Частоту эксцизии после конъюгации определяли как отношение  $N_p/N_0$  (по трем измерениям), где  $N_p$  — число сексдуктантов с фенотипом Pго<sup>+</sup>;  $N_0$  — число сексдуктантов Km<sup>r</sup>.

Итак, при точной эксцизии транспозона Тп5 существенной может оказаться как конъюгационная, так и рекомбинационная составляющие эксцизии. Нами предложена экспериментальная система, в которой роль рекомбинации выявляется наиболее четко. Доноры HfrP4x, содержащие одну и ту же инсерцию ргоА: : Тп5 на хромосоме, скрещивали с двумя реципиентами, различающимися по активности *Rec*-системы. Штамм ЕСК107, производный от ДМ1187, нарабатывает особую рекомбиногенную форму белка *RecA*, приводящую к заметному увеличению частоты рекомбинационных обменов на единицу длины ДНК.

Результаты экспериментов представлены в табл. 4.

Таблица 4

Частоты точной эксцизии после скрещивания донора HfrP4x-5 с различными реципиентами\*

Реципиент	Основной генотип	Частота точной эксцизии после конъюгации
ЕСК100-5	<i>rec</i> <sup>+</sup>	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$
ЕСК107-5	<i>rec</i> А441 ( <i>tif</i> )	$(4 \pm 2) \cdot 10^{-5}$
ЕСК100-510	<i>rec</i> <sup>+</sup>	$(7 \pm 1) \cdot 10^{-7}$
ЕСК107-510	<i>rec</i> А441 ( <i>tif</i> )	$(1,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$

\* Частота точной эксцизии после конъюгации с HfrP4x-5 определялась как  $N_{ep}/N_e$  (по трем измерениям), где  $N_{ep}$  — число рекомбинатов с фенотипом Leu<sup>+</sup> Pго<sup>+</sup>;  $N_e$  — число рекомбинатов Leu<sup>+</sup>.

Как видно, в случае реципиента ЕСК107 с активированной Rec-системой, происходит 20—30-кратное увеличение частоты точной эксцизии. По всей видимости, в экспериментах с донором Hfg мы имеем дело с иным механизмом точной эксцизии, нежели в случае фактора F', для которого была сформулирована модель «проскальзывания». Действительно, если предположить, что особая форма белка RecA, вырабатываемая штаммом ЕСК107, приводит к более эффективному образованию структуры стебель—петля (что, в конечном счете, привело бы к увеличению частоты точной эксцизии), то это должно послужить резкому увеличению частоты точной эксцизии и в случае скрещивания доноров F' со штаммом ЕСК107.

Можно предположить, что перестройка структуры ДНК, происходящая в ходе синаптического взаимодействия донорного и реципиентного материала, приводит к ситуации, когда точная эксцизия оказывается более вероятной. И действительно, в случае штамма ЕСК107 область, содержащая транспозон, чаще попадает под действие комплекса рекомбинационных ферментов.

Итак, представленные данные доказывают существование «рекомбинационной» составляющей точной эксцизии, которая может приводить к перераспределению подвижных генетических элементов в геноме в ходе процессов обмена генетическим материалом.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.  
 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.  
 Foster, T. J., Lundblad, V., Hanley-way, S., Halling, S. M., Kleckner, N. // Three Tn10 associated excision events: Relationship to transposition and role of direct and inverted repeats // *Cell*, 1981, 23, 215—227.  
 Kleckner, N. Transposable elements in prokaryotes // *Ann. Rev. Genet.*, 1981, 15, 341—404.  
 Lundblad, V., Kleckner, N. Mismatch repair mutations of *Escherichia coli* K-12 enhance transposon excision // *Genetics*, 1985, 109, 3—19.  
 Reznikoff, W. S. Tn5 transposition and its regulation // *Cell*, 1982, 31, 307—308.  
 Rupp, W. D., Yhler, G. Strand selection during bacterial conjugation // *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1968, 33, 647—656.

Институт экспериментальной биологии  
 Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
 12/IV 1989

Sergei TAMM

#### E. COLI K-12 LIITTRANSPOSOONI Tn5 TÄPSE EKSTSIIOONI REKOMBINATSIOONILINE KOMPONENT

On esitatud andmed, mis osutavad rekombinatsioonilise komponendi olemasolule liittransposooni Tn5 täpsel ekstsioonil, ning määratud transposooni Tn5 täpse ekstsiooni sagedused saidist proA: :Tn5 erineva geneetilise fooniga tüvedel. Rec-süsteemi aktiivsusega seotud täpse ekstsiooni sageduse suurenemine on statistiliselt usaldusväärne. Seda on näidatud juhtumil, kui said proA: :Tn5 lokaliseerub F'-faktoril, aga ka juhtumil, kui rekombinatsioon toimub pärast Hfr-doonori ristamist erinevate retsipientidega (said proA: :Tn5 lokaliseerub kromosoomil).

**A RECOMBINATIONAL COMPONENT DURING THE PRECISE  
EXCISION OF A Tn5 TRANSPOSON IN *ESCHERICHIA COLI* K-12**

The data indicating the existence of a recombinational component during the precise excision of a Tn5 transposon are presented. The frequencies of precise excision of the Tn5 transposon from a proA: :Tn5 site have been determined for the strains that differ in their genetic background. The increase in the frequencies of precise excision appear to be connected with the enhancement of the activity of a host cell Rec-system. It is revealed in the case of localization of the proA: :Tn5 site on F'-factor or after the Hfr donor mating with recipients of different recombinational backgrounds.