

УДК 576.859.9 : 576.851.48

Сергей ТАММ

ТОЧНАЯ ЭКСЦИЗИЯ СОСТАВНЫХ ТРАНСПОЗОНОВ У *ESCHERICHIA COLI* K-12 В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Транспозоны — это мобильные генетические элементы прокариот, которые обладают целым рядом свойств, имеющих, в частности, большое значение для внутренней изменчивости генома (Хесин, 1984; Kleckner, 1981).

Среди трех известных разновидностей транспозонов, на наш взгляд, наибольший интерес представляют составные транспозоны, которые, в буквальном смысле, состоят из двух полностью или почти полностью гомологичных IS-элементов, фланкирующих в прямой или обратной ориентации уникальную часть транспозона. Для транспозонов Tn5 и Tn10 уникальная последовательность содержит, в частности, детерминанты устойчивости к антибиотикам канамицину и тетрациклину соответственно, которые фланкируются элементами IS50 и IS10 в обратной ориентации (Kleckner, 1981). Транспозон Tn9 переносит устойчивость к хлорамфениколу при прямой ориентации элементов IS1 (Kleckner, 1981).

Бактериальная клетка часто, и особенно в природных условиях, оказывается в состоянии стресса, например, в связи с резким изменением условий окружающей среды (температуры, кислотности, недостатка аминокислот и т. д.). Для адаптации к новым условиям в клетке имеется ряд т. н. глобальных индуцибельных систем (Gottesman и др., 1983), таких как система белков теплового шока, SOS-система, система адаптивного ответа клетки и др.

Поведение транспозонов в условиях стресса исследовано слабо. Однако имеется ряд интересных наблюдений об активизации транспозиции в условиях длительного хранения бактериальных штаммов при комнатной или пониженной температуре (Raleigh, Kleckner, 1984). Следует отметить, что подобные наблюдения сделаны и для низших эукариот, находящихся в условиях неоптимальных температур (Paquin, Williamson, 1984).

Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип
ЕСК 100-5	thr, leu, arg, his, rec ⁺ , rpsB, proA : Tn5
ЕСК 086-5	как ЕСК100-5, но his ⁺ recA56
ЕСК 107-5	как ЕСК100-5, но recA441 (tif), lexA51, sfiA1
ЕСК 100-10	как ЕСК100-5, но proA : Tn10
ЕСК 086-10	как ЕСК086-5, но proA : Tn10
ЕСК 107-10	как ЕСК107-5, но proA : Tn10
ЕСК 100-9	как ЕСК100-5, но proA : Tn9
ЕСК 086-9	как ЕСК086-5, но proA : Tn9
ЕСК 107-9	как ЕСК107-5, но proA : Tn9

В настоящей работе показано, что в стрессовых ситуациях, таких как длительное хранение клеток при пониженной температуре и инкубация на фоне SOS-индукции, в стационарной популяции бактерий резко возрастает доля клеток, претерпевших акт точной эксцизии элементов Tn5 или Tn10. Этот эффект слабо выражен для транспозона Tn9.

Материал и методы

Штаммы, использованные в работе, приведены в таблице. В качестве максимальной использовали среду LB (Миллер, 1976), для приготовления селективных чашек и фосфатного буфера — среду M9 (Миллер, 1976).

Результаты и обсуждение

Для оценки точной эксцизии клетки, содержащие застройки транспозонов Tn5, Tn10, Tn9 в гене *proA* выдерживали в течение длительного времени на твердой полноценной среде при температуре 4–6°C без антибиотиков. Через определенные промежутки времени определяли долю клеток с фенотипом Pro^+ в популяции исходных клеток *proA*: Tn (фенотип Pro^-).

Для этого клетки с твердой среды ресуспендировали в фосфатном буфере и высевали на селективные по пролину и полные минимальные чашки, а затем определяли отношение титров клеток соответствующих фенотипов.

Из рис. 1 и 2 видно, что в ходе длительной инкубации наблюдается постоянный рост доли клеток с фенотипом Pro^+ . Интересно, что величина этого эффекта существенно зависит от генотипа клетки. Максимальный эффект наблюдается для штамма ECK107 *recA441* (*tif*) с конститутив-

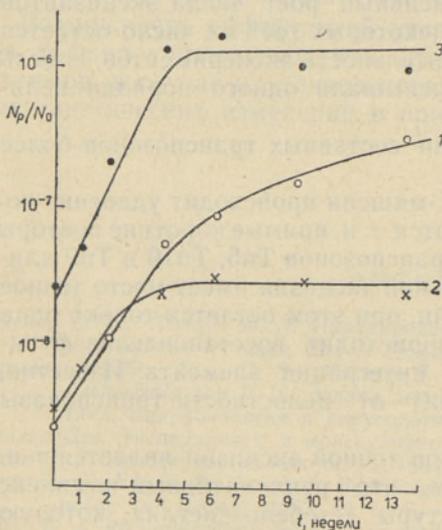


Рис. 1. Кинетика роста числа клеток с фенотипом Pro^+ (точная эксцизия) в условиях длительной инкубации штаммов при 4–6°C: 1 — ECK 100-5 (*rec+*), 2 — ECK 086-5 (*recA56*), 3 — ECK 107-5 (*tif*).

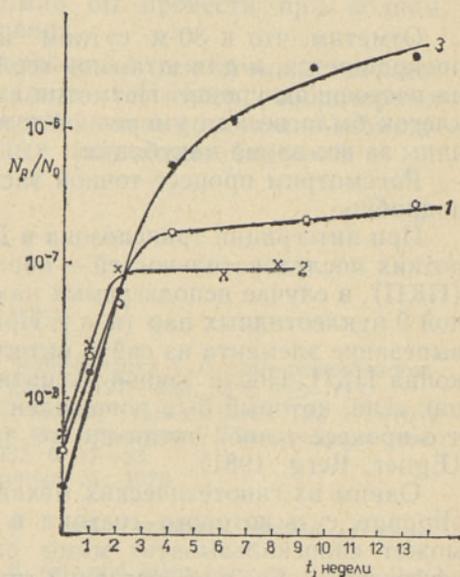


Рис. 2. Кинетика роста числа клеток с фенотипом Pro^+ (точная эксцизия) в условиях длительной инкубации штаммов при 4–6°C: 1 — ECK 100-10 (*rec+*), 2 — ECK 086-10 (*recA56*), 3 — ECK 107-10 (*tif*).

ным синтезом продукта гена *гесА*, следствием чего является постоянная индукция SOS-функций клетки. Колебания величины эффекта весьма значительны: около двух порядков величины для Tn5 и около трех для Tn10. Четко заметна тенденция роста эксцизии в описываемых условиях в ряду штаммов с генотипом: *гесА* → *гес*⁺ → *tif*.

Аналогичная серия экспериментов проведена и с транспозоном Tn9 (концевые повторы IS1 в прямой ориентации), результаты которых представлены на рис. 3. Оказалось, что статистически достоверное увеличение числа эксцизантов в ходе длительной инкубации штаммов имеет место и в этом случае, но эффект, хотя и зависит от генотипа клеток, выражен слабо.

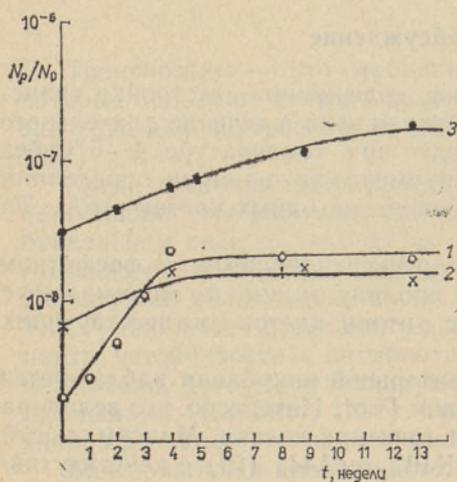


Рис. 3. Кинетика роста числа клеток с фенотипом Pго⁺ (точная эксцизия) в условиях длительной инкубации штаммов при 4–6 °С: 1 — EСК 100-9 (*гес*⁺), 2 — EСК 086-9 (*гесА*56), 3 — EСК 107-9 (*tif*).

Отметим, что к 30-м суткам интенсивный рост числа эксцизантов прекращается, а для штаммов *гесА* и некоторых *гес*⁺ их число остается на постоянном уровне. Несмотря на длительность экспериментов, гибель клеток была весьма умеренной и не превышала одного порядка величины за все время инкубации.

Рассмотрим процесс точной эксцизии составных транспозонов более подробно.

При интеграции транспозона в ДНК-мишени происходит удвоение коротких последовательностей — образуются т. н. прямые короткие повторы (ПКП), в случае используемых нами транспозонов Tn5, Tn10 и Tn9 длиной 9 нуклеотидных пар (н. п.). При точной эксцизии имеет место точное вырезание элемента из сайта интеграции, при этом остается только одна копия ПКП. После точной эксцизии происходит восстановление функции гена, который был поврежден при интеграции элемента. Известно, что процесс точной эксцизии не зависит от целостности транспозазы (Egner, Berg, 1981).

Одним из гипотетических механизмов точной эксцизии является т. н. *slippage*, суть которого состоит в том, что репликативный комплекс может «проскальзывать» мимо структуры «стебель—петля», которую эффективно образует составной транспозон (Tn5, Tn10) за счет инвертированных повторов на его концах (Berg, 1983).

В некоторых работах (Collins, 1982; Горышин и др., 1987) обсуждался и вопрос о рекомбинационной природе явления точной эксцизии. В принципе, гомологическая рекомбинация по ПКП также может привести к восстановлению нуклеотидной последовательности ДНК-мишени.

В известном противоречии с этим предположением находятся свидетельства о том, что процесс точной эксцизии может протекать и в клетках с дефектным геном *hcsA* — главным детерминантом гомологической рекомбинации (Clark, 1974). Имеются также данные о том, что наличие длинных инвертированных повторов в структуре составных транспозонов способствует эффективному протеканию процесса точной эксцизии (Foster и др., 1981). Инвертированные повторы — есть условие, необходимое для механизма «проскальзывания».

Однако точной эксцизии подвергается и составной транспозон Tn9, содержащий элементы IS1 на своих концах в прямой ориентации, что заведомо исключает механизм «проскальзывания». Кроме того, в наших экспериментах максимальный эффект наблюдается в штамме ЕСК107 с активированной SOS-системой. Известно, что в этих условиях увеличивается частота рекомбинационных обменов на единицу длины ДНК (Бреслер, Ланцов, 1978). Поэтому очевидно, что механизма «проскальзывания» недостаточно для объяснения явления точной эксцизии.

Представленные данные поддерживают сформулированные ранее представления о роли рекомбинации в процессе точной эксцизии составного транспозона.

Сравнение величины эффекта для Tn9 (рис. 3), с одной стороны, и для Tn5, Tn10 (рис. 1 и 2), с другой, свидетельствует о существенной роли инвертированных повторов для процесса точной эксцизии. Роль инвертированных повторов, очевидно, сводится к возможности образования структур «стебель—петля» или «крест» в ДНК, содержащей транспозон. Возможно, что такая структура сближает ПКП, облегчая рекомбинацию по ним. Существует и другое объяснение — в условиях длительного хранения при чрезвычайно замедленной репликации возможно более эффективное «проскальзывание» репликативного комплекса мимо «стебля» транспозона. Необходимо отметить, что сама возможность даже сильно замедленной репликации в условиях длительного хранения представляется весьма маловероятной. Однако выбор между двумя возможностями можно было бы провести при полном ингибировании репликации в этих условиях.

Возможность эффективной утери подвижных генетических элементов должна учитываться как при анализе генотипов лабораторных штаммов, в случае их длительного хранения, так и при оценке возможных генетических изменений в природных популяциях бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

- Бреслер С. Е., Ланцов В. А. Индуцированная рекомбинация у *E. coli*: рекомбиногенный эффект мутации *tii-1* // Докл. АН СССР, 1978, 238, № 3, 715—717.
- Горышина 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. Б. 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.
- Clarc, A. J. Recombination deficient mutants of *E. coli* and other bacteria // Ann. Rev. Genet., 1974, 7, 67—86.
- Collins, J., Volckaert, G., Nevers, P. Precise and nearly precise excision of symmetrical inverted repeats of Tn5; common features of *recA*-independent deletion events in *Escherichia coli* // Gene, 1982, 19, 139—146.
- 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.
- Paquin, C. E., Williamson, V. M. Temperature effects on the rate of Ty Transposition // *Science*, 1984, 226, 53—55.
- Raleigh, E. A., Kleckner, N. Multiple IS10 rearrangements in *E. coli* // *Molec. Biol.*, 1984, 173, 437—461.
- Gottesman, S., Neidhardt Frederick C. Global control systems // *Gene function in prokaryotes*. CSHL., 1983, 163—183.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонии

Поступила в редакцию
19/XII 1989

Sergei TAMM

ESCHERICHIA COLI K-12 TRANSPOSOONIDE TÄPNE EKSTSIIOON STRESSI TINGIMUSTES

On uuritud võimalust teha täpseid väljalõikeid liittransposoonide abil stressi olukorras pikaajalise madalatemperatuurilise inkubatsiooni (4—6 °C) ja SOS-funktsiooni indutseerimise korral. Ilmneb, et täpse ekstsiooni sagedus suureneb ühekuise inkubatsiooni järel 2—3 suurusjärku. Eriti tugev efekt tekib neil tüvedel, mille geenis *recA* esineb SOS-funktsiooni indutseeriv mutatsioon *tif-1*. Mutatsioon *tif-1* annab rakkudele rekombinogeense fenotüübi, mis arvatavasti ongi tugeva efekti põhjus. Kirjeldatav efekt sõltub transposoonide IS-elementide orientatsioonist. Samasuunaliselt orienteeritud IS-elementidega transposooni Tn9 puhul on efekt väike (mitte rohkem kui 1 suurusjärk).

Sergei TAMM

THE PRECISE EXCISION OF ESCHERICHIA COLI K-12 TRANSPOSONS UNDER STRESS CONDITIONS

The possibility of precise excisions using composite transposons under stress conditions — protracted incubation at low temperatures (4—6 °C) and induction of SOS function—has been investigated. It appears that the frequency of precise excision increases by 2—3 orders after a one-month incubation. Especially great effect can be observed in the stems which have the SOS function inducing mutation *tif-1* in the gene *recA*. Mutation *tif-1* provides the cells with a recombinogenous phenotype that apparently induces the great effect. The effect depends on the orientation of the IS elements of the transposons. In case of Tn9 transposon with directly orientated IS elements the effect is small (does not exceed one order).