

Т.П. ПЕРЕРВА, А.Ю. МИРЮТА, Н.Ю. МИРЮТА

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Акад. Заболотного 150, Киев, 03143, Украина
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РНК-СОДЕРЖАЩИХ БАКТЕРИОФАГОВ С КЛЕТКОЙ-ХОЗЯИНОМ: MS2-ИНДУЦИРОВАННЫЕ МУТАНТЫ *E. COLI* И ВОЗНИКНОВЕНИЕ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ БАКТЕРИОФАГА MS2



Чувствительные клетки Escherichia coli AB 259 Hfr 3000, инфицированные РНК-содержащим фагом MS2, продуцируют фаговые частицы и одновременно продолжают делиться, выщепляя чувствительные клетки, способные поддерживать новые циклы инфекции. Размножение фага в чувствительных клетках приводит к появлению фагоустойчивых форм в потомстве этих клеток. Показано, что это явление обусловлено не селекцией предсуществующих фагоустойчивых мутантов, а является результатом взаимодействия между фагом и клеткой. В отличие от обычных спонтанных или химически индуцированных мутантов E. coli, MS2-индуцированные фагоустойчивые клетки представлены генетически нестабильными формами. Во время размножения они выщепляют новые MS2-устойчивые формы с более выраженными изменениями в области, кодируемой половым фактором. Клетки двух конечных форм MS2-индуцированных мутантов продуцируют также новый тип фагов, представленных ДНК-содержащими формами, которые нейтрализуются, однако, анти-MS2 сывороткой. Выщепление этих фагов подтверждает, что генетическая субстанция РНК-содержащего бактериофага способна экспрессироваться как часть ДНК-содержащей структуры.

© Т.П. ПЕРЕРВА, А.Ю. МИРЮТА, Н.Ю. МИРЮТА, 2008

Введение

Известно, что популяции РНК-содержащих вирусов представлены не одним типом генома определенной структуры, а представляют собой гетерогенную смесь родственных геномов (квазивиды) [1]. Благодаря высокому темпу возникновения мутаций геномы квазивидовых вирусных популяций содержат одну и ту же так называемую консенсусную последовательность, которая определяет их видовую принадлежность, но отличаются друг от друга и от консенсусной последовательности одной, несколькими или множеством мутаций.

Большинство популяций РНК-содержащих вирусов (квазивидов) содержат все возможные одиночные и двойные мутации, а также в разных соотношениях тройные, четверные и т.д. мутации. Большой вклад в эти исследования внесло использование фага Q β как модели РНК-содержащего вируса.

В то же время среди всех этих исследований и полученных на их основе результатов почти полностью отсутствуют некоторые направления и явления, изучение которых также могло бы иметь существенное значение. К таким явлениям следует отнести образование новых форм в потомстве клеток, перенесших вирусную инфекцию, и возникновение новых типов вирусов за счет их взаимодействия с геномом инфицированной клетки.

На протяжении многих лет объектом нашего внимания был РНК-содержащий фаг MS2. В ряде наших работ на его модели изучалась принципиальная способность РНК-содержащих вирусов, для которых не установлена истинная лизогения, вступать во взаимодействие с хромосомой клетки-хозяина, что, как выяснилось, приводит к возникновению бактериальных мутантов плейотропного типа и новых типов вируса.

Актуальность данного направления исследований вытекает из постоянной необходимости в создании новых подходов и экспериментальных моделей для изучения процессов, идущих в инфицированной клетке и популяции инфицированных клеток. При этом особое значение имеет исследование отдаленных последствий этих процессов, которые не ограничиваются развитием какой-либо из форм инфекции, а выливаются в возникновение новых, как менее, так и более агрессивных форм, имеющих селективные преимущества по сравнению с ис-

ходными. Последнее обстоятельство приобретает особое значение в связи с регистрацией новых, ранее неизвестных инфекционных заболеваний. В настоящей работе мы приводим краткий обзор данных литературы и собственных исследований, посвященных проблеме взаимодействия РНК-содержащего бактериофага MS2 с инфицированной им клеткой-хозяином.

Особенности РНК-содержащих бактериофагов как модельной системы [2, 3]

С момента своего открытия в 1961 г. [4] РНК-содержащие бактериофаги служили модельными системами для решения различных проблем молекулярной биологии. Будучи источником гомогенной и стабильной мРНК они оказались особенно полезными при изучении регуляции генной экспрессии на уровне трансляции. Концепции полярности и контроля трансляции белками-репрессорами были разработаны именно на основании изучения фаговых РНК.

Таксономия и классификация. РНК-содержащие бактериофаги образуют семейство *Leviviridae*, разбитое на четыре основные группы в соответствии с серологическими и физико-химическими свойствами.

Лучше всех охарактеризован в группе I фаг MS2. Его ближайшими родственниками являются R17, f2, M12 и JP501 (> 90 % гомологии), фаг fг отстоит от них несколько дальше. Геномы MS2 и fг полностью секвенированы. В группе II полностью секвенированы геномы фагов GA и KU1. Прототипом группы III является Qβ, геном которого тоже полностью секвенирован. В группе IV лучше всех охарактеризован фаг SP.

Структура вириона. Каждый вирион содержит одну молекулу положительной цепочки РНК, 180 копий белка оболочки и одну копию белка созревания, или А-белка. Фаги группы III также содержат 3–14 копий совместно прочитанного (read-through) белка А1 в своем капсиде, что относится и к группе IV, из-за чего оболочка этих фагов имеет неизомерную структуру. Диаметр частичек РНК-содержащих бактериофагов составляет около 26 нм, толщина белковой оболочки — около 2,3 нм.

Инфекционный процесс. РНК-содержащие фаги инфицируют клетку путем адсорбции на F-пили и проникновения РНК вдоль них. Эти

филаментозные структуры могут иметь разное происхождение и серотипы. Прикрепление фага к белковой поверхности пили происходит с участием белка созревания А. Белок оболочки не играет никакой роли в этом процессе, в то время как двойной комплекс А-белка с одной копией РНК группы I может инфицировать клетку. У фагов группы III минимальный инфицирующий набор требует дополнительного присутствия совместно прочитанного белка А1. Вряд ли А-белок играет какую-либо другую роль, кроме обеспечения проникновения фаговой РНК в клетку, поскольку полностью очищенная от белка фаговая РНК способна генерировать инфекционное потомство в сферопластах.

Генетическая структура. Геном РНК-содержащих бактериофагов состоит из четырех генов, кодирующих белки созревания, оболочки, лизиса и репликазы. Все гены разделены межгенными участками за исключением гена белка лизиса, который в группе I (MS2) частично перекрывает гены белка оболочки и репликазы. В группе II ген белка лизиса перекрывает территорию между генами белка оболочки и репликазы, в то время как в группах III и IV он полностью включает ген белка оболочки и часть межгенной последовательности, не доходя до гена репликазы. Белок лизиса не входит в состав вириона и во время фагового синтеза включается в цитоплазматическую мембрану, вызывая ее дезорганизацию.

Экспрессия генов. Появление фаговых белков четко контролируется геномом как с точки зрения их количества, так и с точки зрения момента их появления. Контроль осуществляется за счет вторичной структуры РНК, ограничивающей связывание рибосом в областях инициации трансляции. Белок созревания нужен в небольшом количестве — одна копия на вирион, в связи с чем его трансляция поддерживается на низком уровне. Белок репликазы, необходимый в небольших количествах, синтезируется в течение первых 20 мин инфекции, после чего его синтез ингибируется белком оболочки, который присоединяется к сайту в стартовой области репликазного гена. Белок оболочки синтезируется на протяжении всего инфекционного цикла без какого-либо негативного контроля. Ген белка лизиса, так же как

и репликазы, находится под трансляционным контролем гена белка оболочки.

Репликация. Большинство данных относительно репликации были получены в системе фага Q β , но при этом имеется в виду, что принцип репликации идентичен для всех групп фагов. Попав в клетку, фаговая РНК выступает сначала в роли мессенджера (мРНК), поскольку размножение нуждается в продукте гена репликазы. После его появления фаговая субъединица соединяется с факторами клетки-хозяина, что делает возможной репликацию фаговой РНК. Ферментный комплекс, осуществляющий репликацию фаговой РНК, содержит одну субъединицу, кодируемую фагом, и три субъединицы, кодируемые клеткой-хозяином. Репликация происходит путем синтеза свободной минус-цепочки с последующим синтезом на ней плюс-цепочек. Неразделенные положительные и отрицательные цепочки не могут служить субстратом для репликазного комплекса, откуда вытекает, что последний должен различать сайты инициации на исходных и дочерних цепочках.

Филогения РНК-фагов. Согласно общему мнению все четыре группы фагов происходят из одного источника. Основанием этому мнению служат практически идентичная генетическая организация, сильное подобие репликативных комплексов, использование одних и тех же белков хозяина при репликации РНК и сходство механизмов контроля белкового синтеза. Эти свойства легче объясняются дивергентной, чем конвергентной эволюцией.

Экология. Географическое распределение РНК-фагов имеет достаточно строгий характер. В северной Японии группа II преобладает над группой III (6 : 1), но чем дальше на юг, тем соотношение это уменьшается, и уже в Юго-Восточной Азии группа II встречается редко. Это может быть связано с климатом, поскольку группа III хорошо размножается при 40 °С, а группа II – при 20 °С. Группы I и IV ближе в этом отношении к группе III. В естественных условиях жизненный цикл РНК-фагов поддерживает *E. coli*, хотя это могут делать и другие виды бактерий. В связи с тем, что РНК-колифаги и энтеровирусы занимают одни и те же зоны обитания и имеют сходную структурную организацию, а также сходную

чувствительность к факторам окружающей среды, РНК-фаги могут быть использованы как индекс-организмы для отслеживания появления патогенных энтеровирусов.

Устойчивость к бактериофагу MS2, индуцированная у *E. coli*, которая инфицирована этим фагом [5, 6]

Отправной точкой экспериментов по исследованию взаимодействия РНК-содержащих бактериофагов с клеткой-хозяином было изучение природы возникновения устойчивости к этим фагам в процессе их инфекционного цикла, особенно в условиях, не способствующих быстрому клеточному делению [7]. В ранних работах, посвященных биологии РНК-содержащих бактериофагов, такое явление даже дискутировалось с точки зрения возможности лизогении у этих фагов [8]. Однако в данном случае на этот вопрос тяжело было ответить при помощи классических тестов из-за способности донор-специфических фагов устанавливать персистентную инфекцию и секретировать зрелое потомство через клеточную стенку [9, 10]. После публикации работы Згаги [11] проблема лизогении у РНК-содержащих фагов была закрыта окончательно, а появление фагоустойчивых форм традиционно рассценивалось как результат селекции предсуществующих бактериальных мутантов [12, 13]. Вместе с тем такая трактовка не выглядит достаточно убедительной, если принять к сведению масштабы наблюдаемой фагоустойчивости.

Чтобы ответить на этот вопрос, мы разработали собственный метод исследования потомства явно чувствительной клетки, перенесшей инфекцию фагом MS2. В отличие от неинфицированных или спонтанных фагорезистентных мутантов MS2-инфицированные клетки образуют на твердой питательной среде колонии характерной формы с плотным центром и прозрачными волнистыми краями, четко отличающиеся от обычных для этого штамма колоний гладкого типа (рис. 1). Титрование компонентов таких колоний показало, что они содержат в среднем $(1-2) \cdot 10^9$ бляшкообразующих единиц и $1 \cdot 10^8$ бактерий. Образование инфекционных центров при высеве материала из волнистой колонии может идти как за счет свободного фага, так и за счет клеток, несущих в

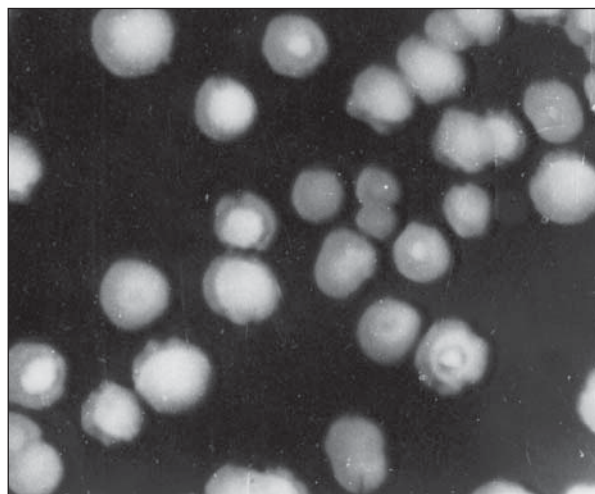


Рис. 1. Колонии *E. coli*, образованные MS2-инфицированными клетками

себе инфекционное потомство, но не успевших лизироваться в составе волнистой колонии и реализовавших эту возможность при повторном расходе на твердую среду. По аналогии с другими системами, факт одновременного размножения фага MS2 и инфицированной им клетки может быть определен как состояние носительства 1-го типа, для которого характерно выщепление клеткой чувствительного потомства, поддерживающего последующие циклы инфекции [14]. Несложные расчеты с учетом частоты спонтанных мутаций от F⁺ к F⁻ фенотипу и количества погибших клеток в составе «волнистой» колонии показали, что 98,67 % потомков инфицированной клетки остаются фагочувствительными, а остальные (1,33 %) приобретают фагоустойчивость.

Индуцированные фагом MS2 устойчивые штаммы *E. coli* стабильно сохраняют приобретенный признак в процессе пересевов. Возникновение устойчивости не сопровождается появлением внутриклеточной формы иммунитета, поскольку в наших опытах сферопласты, полученные из устойчивых культур, оказались в той же мере компетентными по отношению к фаговой РНК, что и сферопласты из исходной чувствительной культуры. Устойчивость мутантных культур обусловлена практически полной потерей ими адсорбирующей активности.

По аналогии с данными Видмера и Лебека [15, 16], изучавшими индуцированную MS2 фагоустойчивость в f1⁺R-культурах *E. coli*, мы

предполагали, что у полученных нами устойчивых штаммов также отсутствуют F-пили. Однако это предположение не подтвердилось электронно-микроскопическими исследованиями. На снимках устойчивых клеток четко видны половые пили с адсорбированными на них фаговыми частичками. Возможно, что адсорбция, наблюдаемая электронно-микроскопически, имеет обратимый характер, и блок инфицирования обусловлен отсутствием проникновения фаговой РНК в клетку.

В отличие от Видмера и Лебека [15, 16] мы не наблюдали выщепления фага проверенными устойчивыми культурами, которые дальше будем называть первичноустойчивыми, но дальнейшее изучение их показало, что они являются наиболее адекватным материалом для поиска истинных или дефектных MS2-лизогенов как клеток, хромосома которых содержит фаговый геном или его часть.

Генетическая нестабильность MS2-индуцированных мутантов *E. coli*. Производные варианты [17, 18]

Описанная в предыдущем разделе индукция фагом MS2 фагорезистентных мутантов *E. coli* логично согласуется с их свойствами, основным из которых следует считать генетическую нестабильность. В отличие от привычных спонтанных или химически индуцированных эти мутанты не являются конечной формой мутантного изменения. В ходе размножения они через ряд промежуточных мутантных форм выщепляют новые типы мутантов, у которых усугубление первичной мутации в области полового фактора и сохранение фагоустойчивости сопровождается стойко наследуемыми изменениями свойств мембран и оболочки, а также нарушением процессов роста и деления. В общем, система MS2-индуцированных мутантов включает в себя как первичную фагоустойчивую культуру, так и производные варианты, свойства которых, а также закономерность и частота выщепления описаны в настоящем разделе.

Первичноустойчивая культура. Колонии клеток первичноустойчивого мутанта идентичны колониям дикого типа. Биохимически культура также полностью соответствует исходному типу: сбрасывает до кислоты и газа глюкозу,

лактозу, маннит, мальтозу, ксилозу, дульцит, рамнозу, сорбит, арабинозу, выделяет индол и не образует сероводород. Признак MS2-устойчивости прочно сохраняется культурой в процессе пересевов. Свободного фага культура не выделяет.

Производные варианты выщеплялись из колоний первичноустойчивой культуры, были отобраны сначала по морфологии колоний на твердой среде и разбиты на три основных типа.

Зернистый тип (названный *E. coli* 23-2). Колонии часто имеют уплотненный центр и прозрачные неправильные края (рис. 2, а). При длительном хранении посевов на чашках колонии сильно разрастаются, края их приобретают совершенно неправильную ветвистую форму, часть клеток врастает в агар. Структура колоний зернистая за счет гибели части материала. Электронно-микроскопически (рис. 2, б) колонии состоят из смеси живых и погибших клеток, наполненных бесформенным, неструктурированным материалом. При этом часть мертвых клеток представлена неразделенными филаментозными формами, а часть — более короткими, чем у дикого типа, что свидетельствует о нарушении процессов роста и деления. От исходной культура биохимически отличается утратой способности сбраживать углеводы, кроме глюкозы до кислоты, и начинает слабо ферментировать сахарозу тоже до кислоты. Поскольку потеря признака касается лактозы, маннита, мальтозы, ксилозы, дульцита, рамнозы, сорбита, арабинозы, то, очевидно, ее можно объяснить не мутациями в соответствующих оперонах, а нарушением транспорта углеводов в клетку на уровне мембран. Это отклонение от нормы не сопровождается появлением ни ауксотрофности, ни термочувствительности.

Об изменении свойств мембран и оболочки мутанта свидетельствует также склонность его колоний к «ползучему» росту, проницаемость для белка лизиса, выделяемого лизирующим мутантом (см. ниже), а также повышенная чувствительность к хлороформу и лизоциму.

В отличие от первичноустойчивых клетки этого типа уже не имеют F-пили, т.е. нарушение роста и деления, а также свойства мембран и оболочки связаны у этого мутанта с событиями в половом факторе.

Лизирующий тип (названный *E. coli* Lys-23). На сплошном газоне зернистого типа лизирующие клетки образуют колонии, окруженные зоной лизиса (рис. 2, в). На газоне клеток дикого типа, при совместном с ним высеве, они растут как отдельные колонии, но без зоны лизиса. На стадии логарифмического роста в жидкой среде оптическая плотность мутантной культуры увеличивается быстрее по сравнению с исходным штаммом. Переход в стадию стационарного роста у этого мутанта происходит при более высокой плотности культуры, чем у дикого типа.

При электронно-микроскопическом исследовании (рис. 2, г) у лизирующего мутанта наблюдается отсутствие F-пили и, как правило, жгутиков, а также наличие характерных образований, по количеству соответствующих числу нуклеоидов в активно делящейся клетке *E. coli*. Характерно также увеличение размеров мутантных клеток по сравнению с диким типом и усиление тенденции к образованию цепочек и конгломератов, что объясняет быстрое оседание клеток на дно в жидких культурах.

Биохимически культура активна по отношению к глюкозе (кислота через 1 сут), мальтозе и арабинозе (кислота на 4-е сутки). Куль-

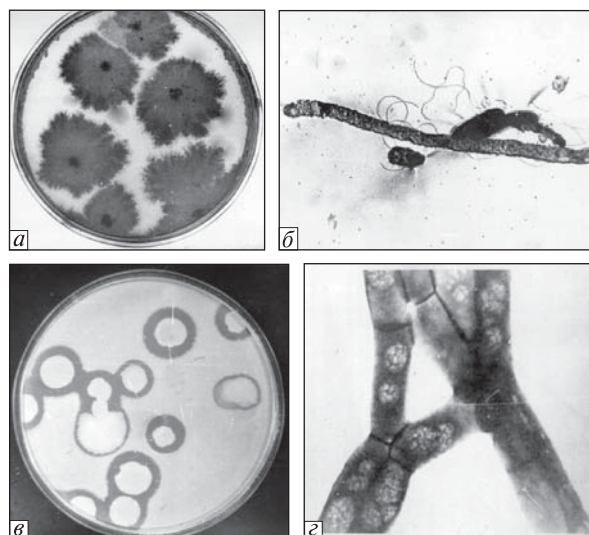


Рис. 2. Колонии и клетки MS2-индуцированных мутантов: а — колонии мутанта зернистого типа; б — клетки мутанта зернистого типа, $\times 10000$; в — колонии мутанта лизирующего типа на газоне клеток мутанта зернистого типа; г — клетки мутанта лизирующего типа, $\times 4000$

тура агглютинируется антисывороткой к протретым клеткам дикого типа в разведении 1 : 50 – 1 : 100 в отличие от клеток мутанта зернистого типа, который вообще не агглютинируется антисывороткой. Исходная культура агглютинируется этой же сывороткой в разведении 1 : 800 – 1 : 1600. По Грамму клетки окрашиваются мозаично.

Подобно мутантам зернистого типа, лизирующие мутанты не проявляют признаков ни ауксотрофности, ни термочувствительности.

Зоны лизиса вокруг колоний не связаны с индукцией фага, поскольку многократные попытки выделить его из этих зон не имели успеха. Оказалось, что появление этой зоны обусловлено синтезом вещества белковой природы – зона исчезает при обработке посевов проназой, но не ДНКазой или РНКазой. Учитывая происхождение MS2-индуцированных мутантов, можно предположить, что литическая активность представлена MS2-кодированным белком лизиса. Действительно, зоны лизиса не формировались при обработке посева антисывороткой кролика, полученной к сонифицированным рMS27-содержащим клеткам, которые накопили MS2-специфические продукты на протяжении 2–3-недельного культивирования их в жидкой среде при 20–22 °С. Обработка посевов сывороткой неиммунизированного кролика, MS2-антисывороткой, антисыворотками к MS2-неинфицированным и рMS27-бесплазмидным сонифицированным клеткам *E. coli* 3000 такого эффекта не давала. Таким образом, описанный тест позволяет предположить MS2-специфическое происхождение литической активности у мутантов лизирующего типа, т.е. синтез ими фагового белка лизиса. Вместе с тем этот признак (зона лизиса) оказался приемлемым при клонировании мутантной области MS2-индуцированного мутанта лизирующего типа (см. ниже).

Мукоидный тип. Клетки образуют колонии – крупные, мукоидные, выпуклые (рис. 3, з), которые через несколько дней хранения при комнатной температуре становятся плоскими, приобретают перламутровый блеск и иногда лизируют. В биохимическом отношении клетки соответствуют дикому типу.

Ревертабельность. Ни одна из мутантных форм не ревертирует к исходному морфологи-

ческому типу гладких колоний. К исходному типу не ревертируют также промежуточные мутантные типы, утилизирующие сахара и образующие зернистые колонии (см. ниже).

Закономерности выщепления производных вариантов

Выщепление зернистого типа. Колонии зернистого типа были обнаружены случайно среди гладких устойчивых колоний; появление их в посевах имело случайный и нерегулярный характер. В дальнейшем наше внимание привлекли некоторые гладкие устойчивые колонии, имеющие выступающие участки более слабого роста, зернистые при изучении их через лупу (рис. 3, а).

При рассеве этих зернистых выпячиваний на агаре образуются полупрозрачные зернистые колонии (рис. 3, б), клетки которых в биохимическом отношении или полностью отвечают дикому типу, или ферментируют все углеводы, в том числе и сахарозу, только до кислоты. Мутантные формы зернистого типа, ферментирующие углеводы, появляются уже в первичных посевах или в последующих посевах промежуточных форм с неравномерной частотой – от 2–3 до нескольких сотых процента.

Выщепление мутантов лизирующего типа. Выщепление происходит из клеток зернистого типа с частотой точковых мутаций и может быть отслежено при высеве большого количества клеток на чашку двухслойным методом.

Выщепление мутантов мукоидного типа. Клетки, образующие мукоидные колонии, выщепляются при формировании колоний первично-устойчивого типа, образуя на этих колониях или слегка выпуклые блестящие сектора, или петлеподобные структуры (рис. 3, в). При рассеве на чашки материала, отколотого из этих структур, мукоидные колонии (рис. 3, г) формируются без каких-либо переходных типов.

Чувствительность мутантов зернистого и лизирующего типов к некоторым колифагам. Обеднение антигенного состава, нарушение транспорта сахаров, мозаичное окрашивание по Грамму свидетельствуют о значительных нарушениях свойств клеточной стенки мутантных клеток. В связи с этим интересно было проверить чувствительность мутантов к колифагам, рецепторная специфичность которых хорошо

изучена. С этой целью был использован Ох2 фаг, специфический для белка OmpA, мутанты Ох2h10 и Ох2h12, специфические для белков OmpA и OmpC, и фаг Tulb, специфический для белка OmpC наружной мембраны *E. coli* [19]. Кроме того, был использован LamB-специфический фаг λ [20] и LPS-специфические фаги P1 и T7 [21]. Чувствительность к фагам определяли спот-тестами с использованием препаратов с титром 10^9 – 10^{10} частичек в 1 мл. В результате оказалось, что оба мутанта – зернистый и лизирующий – чувствительны к фагам Ох2, Ох2h10, Ох2h12, Tulb и P1, но не чувствительны к фагам λ и T7. К h- и hh-мутантам фага λ оба MS2-индуцированных мутанта *E. coli* оказались чувствительными. Из этих данных следует, что основная часть белков наружной мембраны мутантов зернистого и лизирующего типов сохраняют свои свойства, в то время как системы, связанные с формированием у них LPS и LamB белка, вероятно, повреждены. Что касается чувствительности зернистого и лизирующего мутантов к фагу P1, то последний имеет широкий круг хозяев и, очевидно, менее чувствителен к конформации LPS, которая может изменяться за счет потери одного или нескольких сахаров.

Клонирование мутантной области MS2-индуцированного мутанта *E. coli* и синтез фагоспецифической РНК на клеточной ДНК [22]

Имея в своем распоряжении MS2-индуцированные мутанты, мы попробовали выяснить, не обусловлены ли их свойства структурной связью фагового генома с клеточной хромосомой. Выявление такой связи могло бы пролить свет на сложные для понимания особенности взаимодействия РНК-содержащих бактериофагов с клеткой-хозяином и стать доказательством способности фага MS2 если не устанавливать истинную лизогению, то индуцировать состояние, основанное на физическом объединении фагового генома с клеточной ДНК.

В настоящем разделе описано клонирование EcoR1 фрагментов ДНК хромосомы MS2-индуцированного лизирующего мутанта кишечной палочки и показан синтез MS2-специфической РНК в клетках, трансформированных рекомбинантными плазмидами.

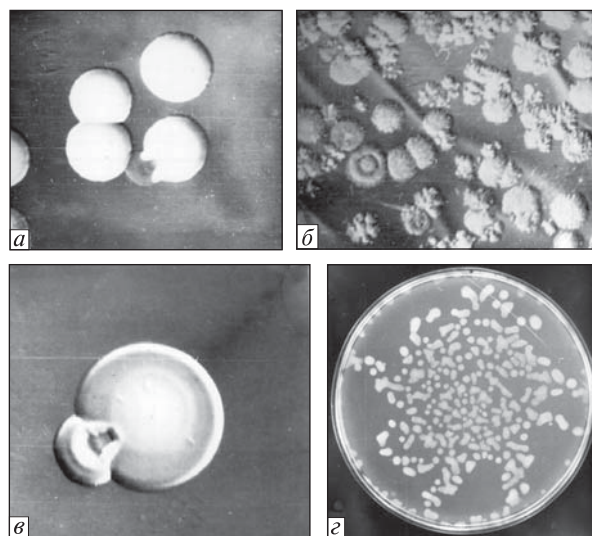


Рис. 3. Выщепление производных вариантов из колоний MS2-индуцированного первичноустойчивого мутанта *E. coli*: а – зернистые выпячивания на колониях первичноустойчивого мутанта; б – колонии, образованные клетками, высеянными из зернистых выпячиваний; в – мукоид-образующие структуры (петли) на колониях первичноустойчивого мутанта; г – колонии мутанта мукоидного типа

На данном этапе был использован мутант лизирующего типа как наиболее перспективный для получения ответов на поставленные вопросы.

Получение рекомбинантных плазмид с литическими свойствами мутанта лизирующего типа. Поскольку мутации, определяющие биологические свойства мутанта лизирующего типа, связаны с особенностями роста и деления, т.е. с областью инициации репликации, клонирование интересующей нас области клеточной ДНК проводили с использованием не способного к репликации Ap-фрагмента плазмиды pCV16, несущего ген устойчивости к ампициллину [23]. ДНК хромосомы мутанта, обработанную рестриктазой EcoR1, лигировали с изолированным Ap-фрагментом, вырезанным из плазмиды с использованием этого же фермента, и лигированной смесью трансформировали реципиентные клетки *E. coli* HB101. Сначала клоны отбирали по устойчивости к ампициллину. Теоретически полученная таким методом клонотека содержала плазмиды, включающие в себя области инициации репликации клеточной хромосомы или интегри-

рованного с ней F-фактора. Следующая задача состояла в отборе клонов, способных продуцировать литическую активность того же типа, что и исходный лизирующий мутант. С этой целью мы использовали клетки мутанта зернистого типа *E. coli* 23-2, при высеве на который лизирующий мутант образует колонии, окруженные зоной лизиса.

Отобранные по устойчивости к ампициллину клоны отсеивали в отдельные пробирки в жидкую среду и выращивали первые сутки при 37 °С, а затем на протяжении нескольких суток при комнатной температуре. Для проверки литических свойств отобранных культур материал из каждой пробирки наносили петлей на свежевысеянный газон клеток *E. coli* 23-2. Оказалось, что значительная часть Ар-устойчивых клонов (около одной трети) способна на протяжении нескольких суток накапливать литическую активность и при нанесении на тест-газон образовывать или прозрачное пятно, или зону лизиса вокруг зоны клеточного роста. Способность к накоплению литической активности у разных клонов была неодинаковой — у одних это происходило быстро и сопровож-

далось быстрым ростом клеток и быстрым их отмиранием, у других накопление литического вещества происходило более плавно, бактериальная суспензия мутнела с обычной для кишечной палочки скоростью, и отмирание клеток не отличалось интенсивностью. При работе с плазмидами первого типа наблюдались определенные трудности — низкий выход при выделении и слабоэффективная трансформация. Плазмиды второго типа легко выделялись стандартными методами, эффективно трансформировали *E. coli* HB101 и при каждой повторной трансформации позволяли получать бактериальные культуры со свойствами первичного трансформированного клона.

В связи с этим мы пользовались плазмидой рL34, принадлежащей ко второму типу. Литические свойства описываемой нами экспериментальной системы наследуются стабильно и выглядят очень четкими (рис. 4).

Судя по данным рис. 4, литические свойства, а именно специфичность к определенному хозяину клона, содержащего плазмиду, совпадают с аналогичными показателями у исходного лизирующего мутанта и отличаются от подобных свойств фага MS2. Неспособность фага MS2 лизировать зернистый мутант объясняется отсутствием у мутантных клеток F-пилей. Таким образом, биологические характеристики рекомбинантных плазмид позволяют считать, что нам удалось проклонировать участок хромосомы, определяющий фенотип лизирующего мутанта *E. coli* Lys23.

Определение наличия MS2-специфической РНК в рL34-трансформированных клетках *E. coli*

Наличие MS2-специфической РНК в рL34 трансформантах определяли методом блот-гибридизации, которую осуществляли сначала с использованием двух зондов, а именно ДНК плазмид рL34 и рCV16. Прежде всего нас интересовала рL34 как рекомбинантная плазида, литические свойства которой соответствовали литическим свойствам мутанта *E. coli* литического типа. В связи с этим было важно выяснить, содержит ли рL34 последовательность, комплементарную РНК MS2. Плазмиду рCV16 использовали как контроль. Результаты гибридизации препаратов РНК с ³²P-ДНК плазмиды рL34 приведены на рис. 5, а.

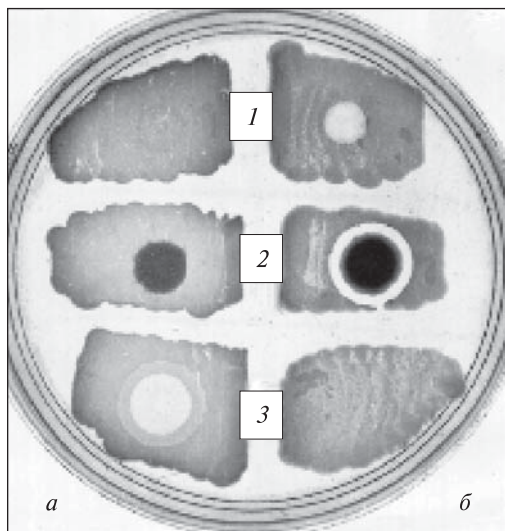


Рис. 4. Литические свойства рL34-трансформированной культуры, мутанта лизирующего типа и фага MS2 на стандартном для РНК-содержащего бактериофага хозяине *E. coli* 3000 и его мутанте зернистого типа: а — газон клеток *E. coli* 3000; б — газон клеток мутанта зернистого типа; 1 — капля бульонной культуры с плазмидой рL34; 2 — капля бульонной культуры мутанта лизирующего типа; 3 — капля суспензии фага MS2

Как можно видеть, ДНК плазмиды рL34 гибридизуется с РНК рL34-трансформированной культуры, а также с РНК контрольного штамма *E. coli* 3000. С РНК фага MS2 гибридизация отсутствует, также она отсутствует со всеми образцами РНК при использовании в качестве зонда ДНК плазмиды рCV16 (не показано). Гибридизацию ДНК рL34 с РНК контрольной культуры можно, очевидно, объяснить тем, что рL34 включила участок хромосомы мутанта *E. coli* 3000, и гибридизация происходит с РНК, гомологичной клеточному фрагменту плазмидной ДНК. Отсутствие гибридизации рL34 с РНК фага MS2 побудило нас к использованию в качестве зонда плазмиды рMS27 [24, 25], содержащей ДНК-копию РНК MS2, и фрагмента этой копии, содержащего только MS2-специфическую последовательность, свободную от векторного участка. Результаты гибридизации представлены на рис. 5, б, в. Полученные данные демонстрируют наличие гибридизации РНК MS2 и суммарной РНК рL34-трансформантов как с зондовой плазмидой рMS27, так и с отдельным фрагментом, содержащим часть ДНК-копии РНК фага MS2, свободную от векторной последовательности. Расположение сигналов совпадает, и отличаются они лишь интенсивностью. Гибридизация с РНК контрольного штамма *E. coli* 3000 отсутствует, что свидетельствует о специфичности связывания ДНК обоих зондов с РНК фага MS2 и РНК рL34-трансформированных клеток.

Приведенные в настоящем разделе результаты исследований позволяют сделать два основных вывода: 1) в клетках, трансформированных плазмидой рL34, которая включила часть хромосомы MS2-индуцированного лизирующего мутанта *E. coli* AB259 Hfr 3000, накапливается MS2-специфическая РНК; 2) ДНК плазмиды рL34 с РНК фага MS2 не гибридизуется.

Из этого следует, что генетический материал РНК-содержащего фага MS2 может вступать в прочное структурное взаимодействие с хромосомной ДНК Hfr-штамма *E. coli*. В то же время отсутствие гибридизации плазмидной ДНК с РНК MS2 позволяет допустить, что плазида содержит плюс-цепочку фаговой РНК. Возможно, что размер фагоспецифичес-

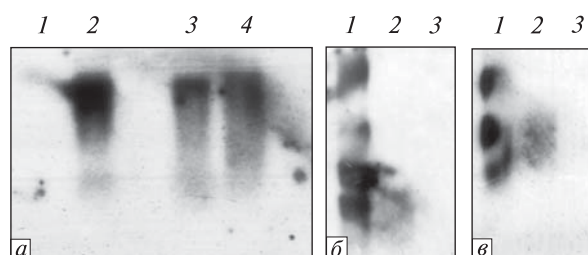


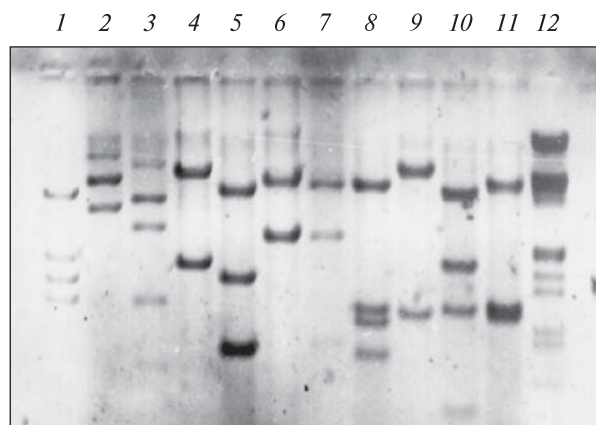
Рис. 5. Определение наличия MS2-специфической РНК в рL34-трансформантах методом блот-гибридизации: а – радиоавтограф блот-гибридизации ^{32}P -ДНК рL34 с суммарными РНК; б – радиоавтограф блот-гибридизации ^{32}P -ДНК рMS27 с суммарными РНК; в – радиоавтограф блот-гибридизации ^{32}P -ДНК фрагмента рMS27 с суммарными РНК; 1 – РНК MS2; 2 – РНК рL34-трансформированной культуры; 3, 4 – РНК *E. coli* 3000

кого генетического материала, входящего в состав клеточной и, соответственно, плазмидной ДНК, меньше размера нативной РНК, о чем можно судить по расположению положительных сигналов (рис. 5, б, в), а также по отсутствию жизнеспособного фага как в клетках лизирующего мутанта, так и в клетках плазмидосодержащих культур.

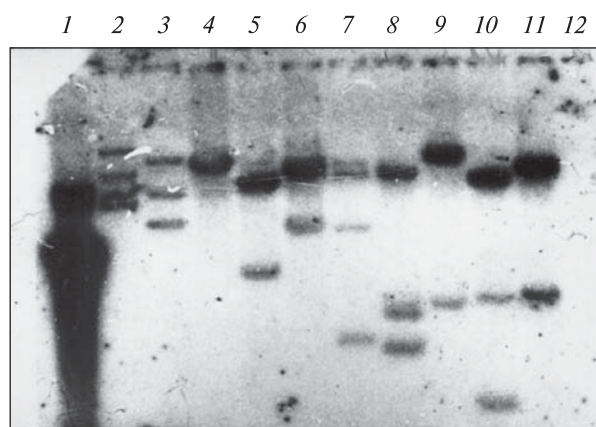
Определение размера фрагмента ДНК рекомбинантной плазмиды, содержащей MS2-специфическую последовательность, и его расположения в рекомбинантной плазмиде [26]

В предыдущем разделе был показан синтез фагоспецифической РНК на фрагменте хромосомы MS2-индуцированного мутанта *E. coli*, клонированного в составе рекомбинантной плазмиды. В настоящем разделе представлены результаты изучения клонированного фрагмента ДНК мутантной клетки с целью определения размеров MS2-специфической области, ее расположения в рекомбинантной плазмиде и наличия сайтов для некоторых широко используемых рестриктаз.

Для определения размеров фрагмента ДНК рекомбинантной плазмиды, несущей MS2-специфическую последовательность, и его локализации в рекомбинантной плазмиде использовали метод блот-гибридизации. В качестве зонда служил фрагмент ДНК-копии РНК MS2, свободный от векторной последовательности.



а



б

Электрофореграмма рекомбинантной плазмиды, рестрицированной эндонуклеазами PstI, BamHI, HindIII и EcoRI, а также блот-гибридизация полученных фрагментов с фрагментом pMS27 представлены на рис. 6, а, б.

Полученные результаты позволяют считать, что MS2-специфическая последовательность расположена, наиболее вероятно, в составе фрагмента размером 3,9 тыс. п.н., ограниченного сайтами PstI и BamHI. Расположение этого фрагмента показано на карте рекомбинантной плазмиды, приведенной на рис. 6, в.

Четкая гибридизация этого фрагмента с фрагментом ДНК-копии РНК MS2 и практически полное соответствие его размера (3,9 тыс. п.н.) длине РНК MS2 (3569 п.н.) [27] позволяют считать, что MS2-подобная последовательность, встроенная в рекомбинантную плазмиду pL34, находится в пределах этого фрагмента. Однако обращает на себя внимание то, что эта область не содержит сайтов EcoRI и SalI, обна-

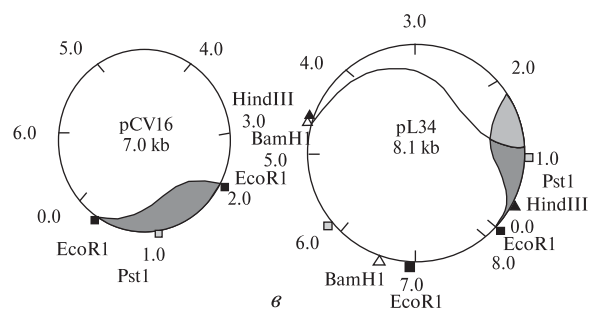


Рис. 6. Электрофореграмма ДНК плазмиды pL34 (а) и радиоавтограф, полученный в результате гибридизации соответствующего фильтра с ³²P-меченой ДНК фрагмента pMS27 (б): 1 – ДНК pMS27 + EcoRI; 2 – ДНК pL34 + PstI; 3 – ДНК pL34 + PstI + BamHI; 4 – ДНК pL34 + BamHI; 5 – ДНК pL34 + BamHI + HindIII; 6 – ДНК pL34 + HindIII; 7 – ДНК pL34 + HindIII + PstI; 8 – ДНК pL34 + PstI + EcoRI; 9 – ДНК pL34 + EcoRI; 10 – ДНК pL34 + EcoRI + BamHI; 11 – ДНК pL34 + EcoRI + HindIII; 12 – ДНК фага λ + EcoRI + HindIII (маркер); в – физическая карта плазмид pCV16 и pL34. Заштрихованная часть соответствует фрагменту, содержащему ген устойчивости к ампициллину; незаштрихованная и более широкая часть соответствует фрагменту, содержащему MS2-подобную последовательность

руженных в составе ДНК-копии РНК MS2 [28]. Поэтому участок рекомбинантной плазмиды, который по данным гибридизации соответствует MS2-последовательности, имеет, очевидно, строение более сложное, чем двухцепочечная структура. Такой вывод согласуется с полученными нами ранее данными, согласно которым меченая ДНК рекомбинантной плазмиды не гибридизуется с РНК MS2. Отсутствие гибридизации плазмидной ДНК с РНК MS2 на фоне синтеза плазмидосодержащими клетками MS2-специфической РНК и отсутствием сайтов EcoRI и SalI в пределах фрагмента 3,9 тыс. п.н. проще всего объяснить нестандартностью клонированного фрагмента, который может содержать трехцепочечную структуру, одна из цепочек которой представлена фаговой РНК.

Следует также отметить, что мы не наблюдали гибридизации при использовании в качестве зонда фрагмента pMS27, соответствующей

шего гена белка созревания А. Это обстоятельство наводит на мысль, что наша плазида не содержит соответствующей MS2-специфической области, что в свою очередь согласуется с меньшим размером MS2-специфической РНК, синтезируемой в плазмидосодержащих клетках и отсутствием в них зрелых частичек фага MS2.

ДНК-содержащие производные бактериофага MS2: биологические свойства и структура генома [29, 30]

Как было показано выше, мутантные клетки лизирующего типа, высеванные на газон клеток мутанта зернистого типа, образуют колонии, окруженные зоной лизиса. Эти зоны не содержат инфекционного фага, поскольку все попытки выделить его с использованием как F⁺, так и F⁻ штаммов оказались неудачными. Однако более продолжительные наблюдения за совместными посевами клеток дикого и мутантного типов позволили обнаружить присутствие фагов, способных инфицировать только F⁺, но не F⁻ штаммы *E. coli*. Появление этих фагов происходит с низкой частотой, и обнаружение их значительно упрощается, если мутантную культуру использовать в качестве газона, а сверху нанести каплю 24-часовой культуры *E. coli* 3000 или других образующих F-пили клеток. Использование такого приема позволяет увидеть, что область роста культуры дикого типа в зоне нанесения капли через несколько дней становится заметно прозрачнее. После нескольких пассажей на чувствительной культуре материала, взятого из области такого прозрачного пятна, оказывается, что в нем накапливается инфекционный фаг, идентичный фагу MS2 по отношению к кругу хозяев и нейтрализации MS2-антисывороткой. Такие инфекционные фаги были обнаружены при использовании в качестве газона клеток мутантов лизирующего и зернистого типов, а также клеток, несущих рекомбинантные плазмиды с клонированной в них мутантной областью MS2-индуцированного мутанта *E. coli* 3000 лизирующего типа. Следует также отметить, что фаги нового типа, которые мы дальше будем называть MS2-производными, могут быть обнаружены и в препаратах MS2 исходного типа, где они появляются с частотой 10⁻⁹–10⁻¹⁰.

Обнаружение этих фагов в препаратах MS2 стало возможным только после изучения их фенотипических признаков, в том числе отношения к понижению температуры выращивания (15–20 °С), при которых они способны образовывать негативные колонии в отличие от стандартного фага MS2. Последнее свойство и было выбрано нами в качестве селективного признака для поиска новых MS2-производных фаговых форм в препаратах исходного MS2. Константы нейтрализации для фага MS2, фагов, выщепившихся в совместных посевах F⁺ штаммов *E. coli* дикого типа с клетками мутантов лизирующего и зернистого типов, клетками-носителями рL34 плазмиды, а также фагов, обнаруженных в посевах исходного MS2, составили 285, 267, 230, 293 и 268 соответственно.

В отличие от РНК-содержащих фагов нового типа, обнаруженных в свое время в Швейцарии в Qβ и MS2-устойчивых f⁺R-культурах *E. coli* [15, 16], морфология обнаруженных нами MS2-производных фагов полностью отличается от морфологии фага MS2 как по структуре, так и по размеру. Во-первых, MS2-производные фаги содержат ДНК, а не РНК, а во-вторых, они имеют морфологию, типичную для ДНК-содержащих бактериофагов, т.е. состоят из головки и хвостового отростка (рис. 7, а, б). Головка MS2-производных фагов имеет икосаэдрическую форму с диаметром около 50 нм, а длина достаточно гибкого хвостового отростка составляет около 150–160 нм.

Несмотря на четкую специфичность адсорбции MS2-производных фагов, активных только в отношении F⁺-штаммов, электронно-микроскопические исследования не выявили их адсорбции на F-пилях, т.е. у данных фагов этот процесс имеет, очевидно, свои нестандартные особенности. MS2-производные фаги образуют большие негативные колонии с прозрачными центрами, окруженными широкими зонами полулизиса, что отличает их от негативных колоний фага MS2 (рис. 7, в). При этом негативные колонии, образованные MS2-производными фагами, невзирая на старение бактериального газона, значительно увеличивают свои размеры в течение нескольких суток за счет расширения зон полулизиса; 2–3 негативные колонии способны занять площадь всей чашки Петри.

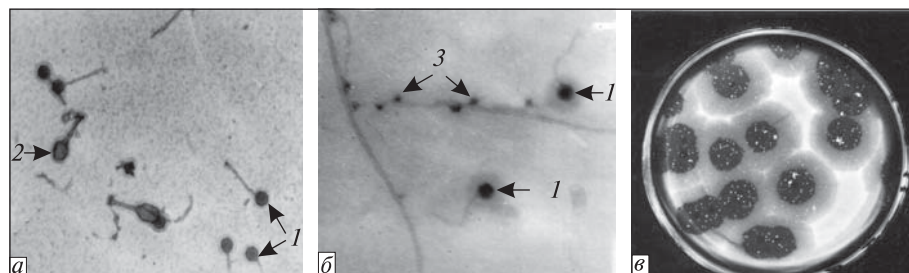


Рис. 7. Морфология частиц и негативных колоний ДНК-содержащего MS2-производного фага: электронная микроскопия частиц ДНК-содержащего MS2-производного фага (1), смешанного с фагом Т4 (2, рис. а) и фагом MS2 (3, рис. б); увеличение $\times 100000$; в – негативные колонии MS2-производных ДНК-содержащих бактериофагов

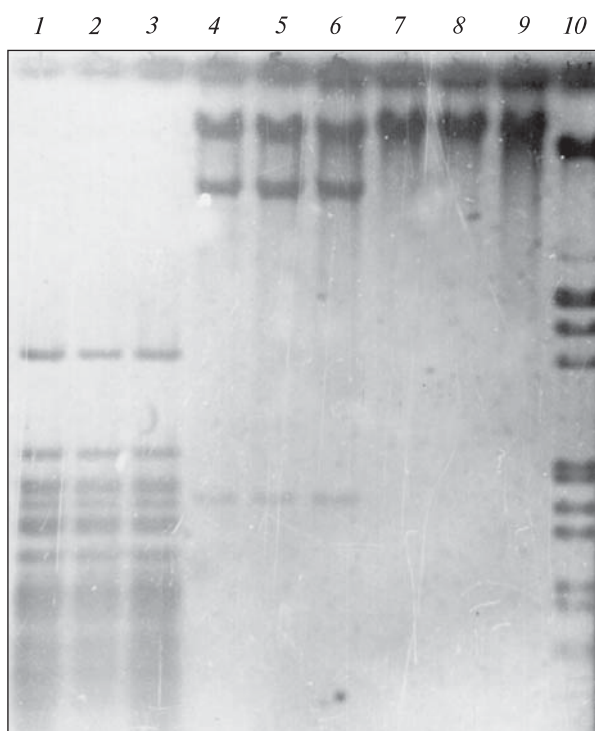


Рис. 8. Электрофореграмма ДНК, выделенных из трех MS2-производных фагов и обработанных тремя рестриктазами *Nae*III (1–3), *Pst*I (4–6) и *Bam*HI (7–9): 1, 4, 7 – ДНК фага, выщепившегося из мутанта *E. coli* лизирующего типа; 2, 5, 8 – ДНК фага, выщепившегося из мутанта *E. coli* зернистого типа; 3, 6, 9 – ДНК фага, выщепившегося из клеток, содержащих pL34; 10 – ДНК фага λ + *Eco*R1 + *Hind*III (маркер)

Следует отметить сильное подобие, а возможно, даже идентичность всех ДНК-содержащих MS2-производных фагов, независимо от того, выщепились ли они из MS2-индуцированных мутантов *E. coli*, клеток-носителей рекомбинантных плазмид, или были просто

выявлены в посевах MS2 исходного типа. Это подобие относится не только к таким параметрам, как тип нуклеиновой кислоты, морфология негативных колоний, морфология фаговой частицы и ее нейтрализация MS2-антисывороткой, но и подтверждается также данными рестрикционного анализа (рис. 8).

Физическое картирование и определение MS2-специфической области в ДНК генома MS2-производного фага [31]

В настоящем разделе описано физическое картирование фага P23-2 – одного из представителей группы MS2-производных фагов, выделенного из совместного посева *E. coli* 3000 и клеток MS2-индуцированного мутанта зернистого типа *E. coli* 23-2, а также поиск MS2-специфических последовательностей в геноме этого фага с помощью метода гибридизации.

Физическое картирование проводили на основе измерения размеров фрагментов рестрикции при простых и комбинированных обработках рестриктазами фаговой ДНК [32]. Размеры фрагментов определяли в тысячах пар нуклеотидов (п.н.). Эти же данные были использованы для определения общего размера фагового генома.

Размеры всех фрагментов рестрикции, совокупность которых позволила определить общий размер генома фага P23-2 как общую молекулярную массу этих фрагментов, приведены в табл. 1, а физическая карта фагового генома, построенная на основании измерений фрагментов рестрицированной ДНК – на рис. 9, б.

Анализ присутствия MS2-специфических последовательностей в геноме фага P23-2 проводили с использованием 32 P-меченого *Sma*I-

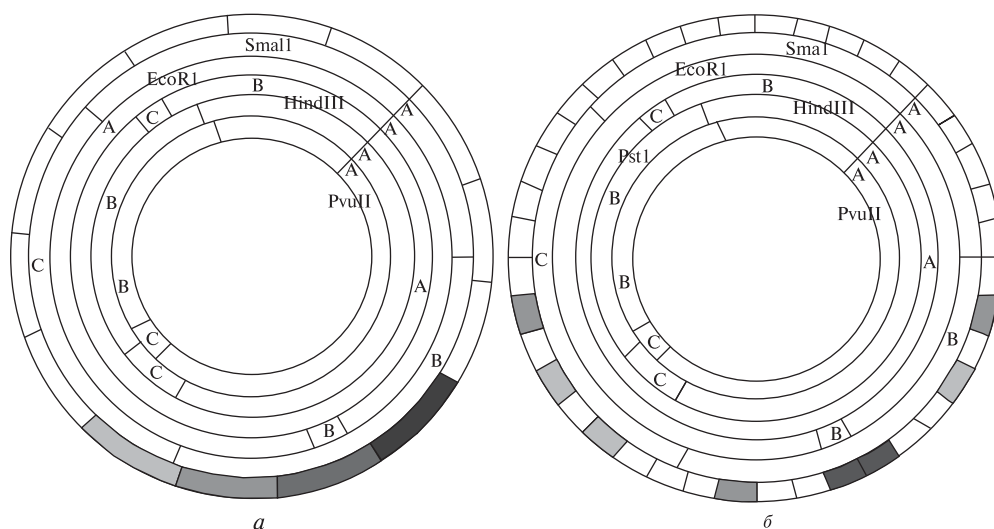


Рис. 9. Физическая карта генома MS2-производного фага P23-2 с двумя вариантами вероятного расположения MS2-специфических последовательностей: а – тандемное; б – чередование с MS2-неспецифическими фаговыми последовательностями

EcoR1 фрагмента кДНК MS2 размером 1,8 тыс. п.н., выделенного из ДНК плазмиды рMS27. Блот-гибридизация этого зонда с ДНК фага λ, P23-2 и плазмидой рMS27 показала отсутствие гибридизации с фагом λ (отрицательный контроль, маркер), наличие гибридизации практически со всеми фрагментами рMS27 + Sma1 + EcoR1 (положительный контроль, маркер) и наличие гибридизации с частью фрагментов P23-2+Sma1+EcoR1.

Размеры фрагментов P23-2, способных гибридизоваться с зондом, вычисляли по данным денситограммы и сравнивали с данными, полученными на основании электрофореграмм рестрицированных фрагментов (табл. 2).

Измерение площадей под пиками денситограммы показало, что в положительном контроле (фрагмент 1,8 тыс. п.н. в ДНК рMS27) и опытном варианте (ДНК фага P23-2 размером 40 тыс. п.н.) они составляют 3,78 и 0,52 соответственно. Количество копий зондового фрагмента кДНК MS2, присутствующих в ДНК фага P23-2, вычисляли по формуле

$$N = M_{\text{фага}} \cdot S_{\text{фага}} / M_{\text{фр}} \cdot S_{\text{фр}} \quad [33].$$

Подставив соответствующие значения, имеем $N = 40 \cdot 0,52 / 1,8 \cdot 3,78 \approx 3,3$.

Таким образом, фаг может содержать около 3–4 копий гомологичных зонду последователь-

ностей (учитывая, что в лунку вносили одинаковое количество препарата – по 1 мкг).

Сравнивая данные, приведенные в табл. 2, и расчеты, в соответствии с которыми геном исследуемого фага P23-2 содержит 3–4 копии фрагмента, гибридизующегося с участком последовательности кДНК MS2, с расположением соответствующих фрагментов на физической карте, можно сказать, что последовательности, гомологичные MS2-специфическим последовательностям, расположены в EcoR1-фраг-

Таблица 1
Размеры рестрицированных фрагментов генома фага P23-2, тыс. п.н.

Рестриктаза	Фрагмент			Суммарная молекулярная масса фрагментов (размер генома)
	A	B	C	
HindIII	30,6*	8,5	1,0	40,1
PstI	28,2*	10,6	1,5	40,3
PvuII	27,2*	10,6	2,4	40,2
EcoR1	39,6*	1,0		40,6
SmaI	15,3	12,3	12,3	39,9
BamHI	Сайт отсутствует			

* Фрагменты, размер которых был определен как сумма более мелких фрагментов, полученных после переваривания другими рестриктазами.

Таблица 2
**Результаты блот-гибридизации ДНК фага P23-2
 с SmaI-EcoRI фрагментом кДНК MS2**

Размеры фрагментов рестрикции P23-2+SmaI+EcoRI, тыс. п.н.		Долевое содержание зондовой последовательности в фрагментах рестрикции ДНК фага P23-2
по данным электрофоретических профилей	по данным денситограммы радиоавтографа	
15,3	—	—
12,3	12,8	0,34
6,6	6,0–9,5	0,41
4,8	3,4–6,0	—
1,0	1,0	0,25

менте и вокруг него и представляют собой или тандем из 3–4 копий (рис. 9, а), или чередование MS2-специфических с MS2-неспецифическими последовательностями (рис. 9, б). Второй вариант представляется более вероятным, так как структура фага в этой области не регулярна по отношению к сайтам рестрикции, на что можно было бы рассчитывать в случае тандема.

Сравнение количества и размеров рестрикционных фрагментов ДНК P23-2 (табл. 1) и фага λ [34] показывает, что электрофоретические профили рестрицированных ДНК этих объектов не совпадают ни по одной рестриктазе. Это дает основание думать, что часть генома фага P23-2, которая не гибридизуется с ДНК MS2, не имеет в основе своего происхождения ДНК профага λ . Вместе с тем нами были получены предварительные данные, согласно которым наблюдается гибридизация 32 P-меченой ДНК одного из MS2-производных бактериофагов с ДНК хромосомы *E. coli*, т.е. последняя может быть причастна к происхождению этих фагов.

Обсуждение

Описанные в работе MS2-устойчивые мутанты *E. coli* AB 259 Hfr 3000 в целом образуют систему мутантов, выщепившихся из первичного мутантного штамма через ряд промежуточных форм. Этот факт свидетельствует о наличии нестабильности в первичном мутантном локусе, что отличает упомянутую группу мутантов от обычных спонтанных или химически индуцированных мутантов. Изменение

состояния F-пилей от потери функции у первичноустойчивого мутанта до их физического исчезновения у мутантов зернистого и лизирующего типов, а также отсутствие у сегрегантов реверсий к дикому типу позволяет предположить, что выщепление всех производных форм происходит за счет возникновения делеций в мутантной области, локализованной на F-плазмиде. Расширение первичной мутации в области F-фактора сопровождается у сегрегантов повреждением функции роста — в сторону ослабления у мутантов зернистого типа и в сторону усиления у мутантов лизирующего типа. У обоих типов нарушено деление, однако если культура мутантов зернистого типа содержит много погибших филаментозных форм, то культура клеток лизирующего типа представлена однородными живыми многоядерными клетками, которые часто образуют цепочки и конгломераты.

Известно, что клеточное деление F⁺-бактерий сцеплено с репликацией F-плазмиды и что за это сцепление отвечают гены, находящиеся рядом с областью инициации репликации F-фактора [35, 36]. Мутации в этих генах приводят к угнетению деления клетки-хозяина и образованию филаментозных форм, что соответствует некоторым фенотипическим признакам описанных нами мутантов. Следует помнить, однако, что в нашей экспериментальной системе мы имеем дело не с автономной, а с интегрированной в хромосому F-плазмидой. В этом случае репликация всей хромосомы может инициироваться не с хромосомного *oriC*, а с *oriF*-плазмиды [37], и структурные изменения этой области также могут проявиться как повреждение репликации ДНК, а также роста и деления мутантных клеток. Исходя из степени нарушения роста и деления у мутанта зернистого типа, а также из количества и размера нуклеоидов у мутанта лизирующего типа, где репликация ДНК носит очень интенсивный характер и явно опережает деление клетки, структурно-функциональные отклонения мутантного *oriF* весьма значительны.

В последнее время накоплено много данных относительно роли клеточной стенки в репликации ДНК и связи репликационной мембраны со специфическими мембранными белками [38–42].

Молекулярная масса этих белков составляет по разным данным [43, 44] от 55 до 80 тыс. п.н., а основная функция заключается в образовании «мостика» между ДНК и внешней мембраной через пептидо-гликановый слой. При этом образуется специфическая структура, объединяющая наружную мембрану, муреин и ориджин репликации и регулирующая репликацию ДНК и ее связь с клеточным делением. На модели *oriC E. coli* показано, что для связи с мембранным белком область инициации должна иметь специфический участок длиной 463 п.н. [42]. Таким образом, структура ориджина репликации очень важна для формирования комплекса мембрана–ДНК. В связи с этим мутации и структурные изменения в области *oriF* MS2-индуцированных мутантов *E. coli* должны усложнить присоединение мембраны к области инициации ДНК. В свою очередь процесс приспособления клеток к этим усложнениям может сопровождаться изменениями в размещении компонентов клеточных мембран из-за неправильного расположения большой белковой молекулы, пронизывающей все слои клеточной оболочки. Системы, обеспечивающие перемещения разнонаправленных потоков субстратов и продуктов клеточного метаболизма, очень зависят от структурно-функционального состояния клеточной стенки. Ее дефекты способны дать толчок для возникновения целого комплекса отклонений от нормы, подобных тем, которые мы наблюдали в системе MS2-индуцированных мутантов *E. coli*, в том числе специфики роста и деления клеток, образования ими колоний, чувствительности клеточной стенки к разным агентам, сбоям в метаболизме углеводов и др. В связи с этим описанные в настоящей работе мутанты представляют собой прекрасную модель для изучения влияния структуры области инициации репликации на клеточную стенку, рост и деление клетки и общий клеточный метаболизм. Это направление могло бы также лечь в основу нового подхода к пониманию процессов опухолевой трансформации у высших и расширить моделирование этих процессов от низших эукариотов [45] до прокариотов.

Процесс делетирования, очевидно, имеющий место в области мутантного F-фактора, который интегрирован в хромосому MS2-ин-

дуцированных мутантов *E. coli*, проявляется не только в появлении клеточных мутантов, но и в выщеплении фагов нового типа, которые содержат ДНК, но нейтрализуются MS2-антисывороткой. Этот факт можно расценивать как доказательство того, что ДНК новообразованных фагов одета в белок оболочки MS2, а это крайне существенно для понимания механизма взаимодействия фаговых РНК с клеточной ДНК. Как показали Пикет и Пибоди [46], белок оболочки РНК-содержащих бактериофагов может упаковать любую структуру, но при одном условии – последняя должна содержать хотя бы участок фаговой РНК, к которому должен прикрепиться фаговый белок оболочки. Это обстоятельство дает основание предположить наличие цепочки РНК в мутантной области, что согласуется с данными гибридизации РНК MS2 и клеточной РНК плазмидо-содержащих клеток, описанных выше. Невзирая на отсутствие у нас прямых доказательств в пользу этого предположения, такая гипотеза объясняет исчезновение F-пилей у описанных нами производных MS2-индуцированных мутантов *E. coli* механизмами, обуславливающими возникновение делеций в областях ДНК с нестандартной структурой.

Наличие MS2-специфических участков у ДНК-содержащих MS2-производных бактериофагов было подтверждено в нашей работе методом гибридизации ДНК этих фагов с кДНК плазмиды rMS27. Вместе с тем происхождение MS2-неспецифической ДНК этих фагов остается невыясненным. Наиболее вероятным может быть предположение, что она представлена прилегающим к мутантному локусу участком хромосомы *E. coli*, в пользу чего свидетельствуют полученные нами предварительные положительные результаты гибридизации ³²P-меченой ДНК одного из MS2-производных бактериофагов с хромосомной ДНК *E. coli*.

В общем образование ДНК-содержащих бактериофагов, нейтрализующихся MS2-антисывороткой, еще раз свидетельствует о том, что на фоне хорошо известных и детально изученных процессов могут с низкой частотой происходить события, ведущие к образованию новых биологических, в данном случае вирусных форм. В отличие от ретровирусов для РНК-со-

держащих бактериофагов не описаны промежуточные ДНК-содержащие структуры, связанные с репродукцией вирусной РНК. Более того, создание кДНК MS2 *in vitro* сопровождалось искусственным присоединением poly (dA) poly (dT) линкера к РНК MS2 [24, 25], отсутствие которого делает ее непригодной для работы обратной транскриптазы. Поэтому не исключено, что в основании образования ДНК-содержащих производных фага MS2 лежат другие механизмы взаимодействия РНК с ДНК, более близкие к механизмам, описанным для прокариотов [47] или для неретровирусных РНК-содержащих вирусов высших [48, 49].

В любом случае приведенные нами данные свидетельствуют о том, что такие общебиологические проблемы, как механизмы взаимодействия РНК- и ДНК-геномов (в том числе на структурном уровне), гетерогенность вирусных популяций, образование новых форм вирусов и клеток, могут быть успешно отслежены в системе MS2-индуцированных клеточных и фаговых мутантов.

Выводы

РНК-содержащий бактериофаг MS2 способен не только селективировать предсуществующие фагоустойчивые мутанты, но и индуцирует устойчивость к самому себе в потомстве инфицированной им клетки *E. coli*. Мутации к фагоустойчивости возникают в области F-фактора, встроенного в штамме *E. coli* 3000 в хромосому бактерии. Сохраняя MS2-устойчивость, MS2-индуцированные мутанты проявляют генетическую нестабильность и выщепляют новые формы с новыми признаками. Выщепление новых типов бактериальных мутантов из первичноустойчивого мутанта связано с возникновением делеций в области F-фактора. Конечные сегреганты отличаются от дикого типа особенностями роста и деления, а также свойствами мембран и оболочки клеток, что может иметь отношение к функции инициации репликации интегрированного в хромосому F-фактора.

Мутантная область MS2-индуцированного бактериального мутанта была проклонирована в составе рекомбинантной плазмиды. Методами гибридизации с рMS27-плазмидой, несущей в своем составе кДНК MS2, и с фраг-

ментом этой кДНК показано присутствие MS2-специфической последовательности в ДНК хромосомы клеточного мутанта, а также синтез MS2-специфической РНК в клетках — носителях рекомбинантной плазмиды.

MS2-индуцированные мутанты *E. coli* 3000 секретируют ДНК-содержащие бактериофаги, которые нейтрализуются MS2-антисывороткой с той же эффективностью, что и фаг MS2. Методами рестрикции и гибридизации с ³²P-меченым фрагментом кДНК MS2 построена физическая карта одного из MS2-производных фагов и показано наличие 3–4 копий MS2-специфической последовательности в геноме этого фага.

Присутствие MS2-специфической информации в составе клонированного фрагмента ДНК MS2-индуцированных мутантов *E. coli* и в геноме ДНК-содержащих MS2-производных фагов, которые нейтрализуются MS2-антисывороткой, подтверждает возможность взаимодействия фаговой РНК с клеточной ДНК, выливающегося в образование новых клеточных и вирусных форм с абсолютно новыми свойствами.

SUMMARY. Sensitive cells of *Escherichia coli* AB 259 Hfr 3000 infected with RNA-containing phage MS2 produce phage particles and continue to divide showing segregation of sensitive cells maintaining new infection cycles. Phage multiplication in sensitive cells gives rise to phage resistant forms in their progeny. The described phenomenon has been shown to be due not to pre-existing phage-resistant cell selection but is a result of interaction of the phage and the cell. In contrast to the usual spontaneous or chemically induced *Escherichia coli* mutants MS2-induced phage-resistant cells are genetically unstable. During their reproduction they segregate new MS2-resistant types carrying more significant changes in the region coded by the sex factor. Cells belonging to two final MS2-induced mutants also produce a new type of phages; they are DNA-containing forms neutralized, however, by anti-MS2 serum. Production of such phage proves that genetic moiety of RNA-containing phage is able to be expressed as a part of the DNA structure.

РЕЗЮМЕ. Чутливі клітини *Escherichia coli* AB 259 Hfr 3000, інфіковані РНК-вмісним фагом MS2, продукують фагові часточки і одночасно продовжують ділитися, вищеплюючи чутливі клітини, здатні підтримувати нові цикли інфекції. Розмноження фага в чутливих клітинах призводить до появи фагостійких форм в потомстві цих клітин. Показано, що це явище зумовлене не селекцією преіснуючих фагостійких мутантів,

а є результатом взаємодії між фагом і клітиною. На відміну від звичайних спонтанних або хімічно індукованих мутантів *E. coli*, MS2-індуковані фагостійкі клітини представлені генетично нестабільними формами. Під час свого розмноження вони вищеплюють нові MS2-стійкі форми з більш вираженими змінами в області, кодованій статевим фактором. Клітини двох кінцевих форм MS2-індукованих мутантів продукують також новий тип фагів, представлених ДНК-вмісними формами, що нейтралізуються, однак, анти-MS2 сироваткою. Вищеплення цих фагів підтверджує, що генетична субстанція РНК-вмісного бактериофага здатна експресуватися як частина ДНК-вмісної структури.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Domingo E., Martines-Salas E., Sobrino F., Carlos J., Portela A., Ortin J., Galindes L., Peres-Brena P., Villanueva N., Najera R., VandePol S., Steinhauer D., DePolo N., Holland J. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance – a review // *Gene*. – 1985. – **40**. – P. 1–8.
- Van Duin J. Single-stranded RNA bacteriophages // *The Bacteriophages. Series The Viruses*. – New York : Plenum press, 1988. – P. 117–167.
- Van Duin J. Single-stranded RNA bacteriophages // *Encyclopedia of virology*. – London : Acad. press, 1994. – P. 1334–1339.
- Loeb T., Linder N.D. A bacteriophage containing RNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1961. – **47**, № 3. – P. 232–239.
- Перерва Т.П. Устойчивость к фагу MS2, индуцированная у *E. coli* при заражении этим фагом // *Цитология и генетика*. – 1977. – **11**, № 1. – С. 3–9.
- Pererva T.P. Induction of the phage resistance in the progeny of an bacterial cell // *Биополимеры и клетка*. – 1999. – **15**, № 1. – С. 63–66.
- Dettori R., Maccacaro G.A., Turri M. Sex-specific bacteriophages *E. coli* K12. 4. Host-specificity pattern of lysis and lethality of phage $\mu 2$ // *J. Microbiol.* – 1963. – **11**, № 1. – P. 15–43.
- Спицелман С. Внеклеточная стратегия реплицирующегося РНК-генома. Стратегия вирусного генома. – М.: Медицина, 1975. – С. 45–67.
- Hoffmann-Berling H., Maze R. Release of male-specific bacteriophages from surviving host bacteria // *Virology*. – 1964. – **22**, № 3. – P. 305–313.
- Rappaport I. Some studies of the infectious process with MS2 bacteriophage // *Biochim. biophys. acta*. – 1965. – **103**, № 3. – P. 486–499.
- Zgaga V. Lysogeny by F2 phage? // *Nature*. – 1977. – **267**, № 5614. – P. 860–862.
- Luria S.E., Delbruck M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance // *Genetics*. – 1943. – **28**, № 3. – P. 491–511.
- Lederberg J., Lederberg E.M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants // *J. Bacteriol.* – 1952. – **36**, № 3. – P. 399–406.
- Yu-Chin Hsu. Propagation of elimination of viral infection of carrier cells // *Bact. Rev.* – 1968. – **32**, Pt. 1. – P. 387–399.
- Widmer H.R., Lebec G. Der Einfluss von RNS-Phagen auf Konjugations faktoren // *Pathol. Microbiol.* – 1974. – **40**, № 3/4. – P. 153–154.
- Widmer H.R., Lebec G. Weitere Ergebnisse zur Wechselwirkung zwischen RNS-Phagen and R-Faktoren // *Pathol. Microbiol.* – 1974. – **41**, № 3/4. – P. 194–195.
- Перерва Т.П., Малюта С.С. Система MS2-индуцированных мутантов *E. coli* по F-фактору // *Молекуляр. биология*. – 1984. – Вып. 38. – С. 81–90.
- Pererva T.P. Some properties of MS2-induced bacterial mutants // *Биополимеры и клетка*. – 1998. – **14**, № 3. – С. 231–237.
- Morona R., Tomassen J., Henning U. Demonstration of bacteriophage receptor site on the *Escherichia coli* K12 outer membrane protein OmpC by use of protease // *Eur. J. Biochem.* – 1985. – **150**. – P. 161–169.
- Randall-Hazelbauer L., Schwartz M. Isolation of bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1973. – **116**. – P. 1436–1446.
- Lindberg A.A. Bacteriophage receptors // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1973. – **27**. – P. 207–241.
- Перерва Т.П., Мирюта Н.Ю., Мирюта А.Ю. Лизогения у фага MS2. Синтез фагоспецифической РНК на клеточной ДНК // *Биополимеры и клетка*. – 1993. – **9**, № 1. – С. 45–50.
- Копылова-Свиридова Т.Н., Фодор И., Баев А.А. Новые векторные плазмиды для селекции рекомбинантных клонов *E. coli* // *Докл. АН СССР*. – 1979. – **245**, № 5. – С. 1250–1253.
- Devos R., Van Emmelo J., Contreras R., Fiers W. Construction and characterization of a plasmid containing a nearly full-size DMA copy of bacteriophage MS2 RNA // *J. Mol. Biol.* – 1979. – **128**, № 4. – P. 595–619.
- Devos R., Contreras R., Van Emmelo J.T., Fiers W. Identification of the translocable element IS1 in a molecular chimera constructed with plasmid pBR322 DNA into which a bacteriophage MS2 copy was inserted by the poly (dA) poly (dT) linker method // *J. Mol. Biol.* – 1979. – **128**, № 4. – P. 621–632.
- Pererva T.P., Miriuta N.Yu., Miriuta A.Yu. et al. Lysogeny by MS2 phage. Analysis of a recombinant plasmid containing MS2 RNA-like sequence // *Биополимеры и клетка*. – 1995. – **11**, № 1. – С. 61–65.
- Fiers W., Contreras R., Duerinck F., Haegeman G., Iserentant D., Merreguert J., Min Jou W., Molemans F., Raeymaekers A., Van den Berghe A., Volckaert G., Isehaert M. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA // *Nature*. – 1976. – **260**. – P. 500–507.
- Berkhout B., Van Duin J. Mechanism of translational

- and coupling between coat protein and replicase gene of RNA bacteriophage MS2 // Nucl. Acids Res. — 1985. — **13**, № 19. — P. 6955–6967.
29. Перерва Т.П., Мирюта А.Ю., Вудмаска М.И., Алексеев И.П. Лизогения у фага MS2. Экспрессия MS2-специфической информации сегрегантами нестабильных трансдуцирующих фагов P1 и λ // Биополимеры и клетка. — 1996. — **12**, № 4. — С. 73–82.
 30. Pererva T.P. DNA-containing phages neutralizing with anti-MS2 serum // Биополимеры и клетка. — 1998. — **14**, № 6. — С. 549–552.
 31. Мирюта Н.Ю., Мирюта Г.Ю., Перерва Т.П. Фізичне картування геному MS2-похідного ДНК-вмісного фага P23-2 та виявлення в ньому MS2-специфічних послідовностей // Біополімери і клітина. — 2001. — **17**, № 3. — С. 225–229.
 32. Fitch W.M., Smith T.F., Ralph W.W. Mapping the order of DNA restriction fragments // Gene. — 1983. — **22**, № 1. — P. 19–29.
 33. Burrington M.G., Seehater J., Downer D.N., Colter J.S. Rescue of BKV-transformed hamster, rat and mouse cells: correlation with levels of nonintegrated viral DNA // Virology. — 1984. — **138**, № 1. — P. 168–173.
 34. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. — М.: Мир, 1984. — 176 с.
 35. Miki T., Yoshioka K., Horiuchi T. Control of cell division by sex factor in *Escherichia coli*. I. The 42,84–43,6 F segment couples cell division of the host bacteria with replication of plasmid DNA // J. Mol. Biol. — 1984. — **174**. — P. 606–625.
 36. Miki T., Chang Z.-T., Horiuchi T. Control of cell division by sex factor in *Escherichia coli*. II. Identification of genes for inhibitor protein and trigger protein on the 42,84–43,6 F segment // J. Mol. Biol. — 1984. — **174**. — P. 627–646.
 37. Chandler M., Silver L., Koth G., Caro L. Chromosomal replication in an Hfr strain of *Escherichia coli* // J. Mol. Biol. — 1976. — **104**. — P. 517–523.
 38. Sparks R.B., Helinski D.R. Association of cellular membrane of *E.coli* minicells and the origins/terminus region of replication of plasmid ColE1 DNA // Nature. — 1979. — **277**, № 5697. — P. 572–575.
 39. Nicoiaidis A.A., Holland I.B. Evidence for the specific association of the chromosomal origin with outer membrane fractions isolated from *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1978. — **135**, № 1. — P. 178–189.
 40. Ogden G.B., Pratt M.J., Schaechter M. The replicative origin of the *E. coli* chromosome binds to cell membranes only when semimethylated // Cell. — 1988. — **54**. — P. 127–135.
 41. Nanninga N. Cytokinesis in prokaryotes and eukaryotes: common principles and different solutions // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2001. — **65**, № 2. — P. 319–333.
 42. Bartosik A.A., Jagura-Burdry G. Bacterial chromosome segregation // Acta biochim. pol. — 2005. — **52**, № 1. — P. 1–34.
 43. Gudas L.J., James R., Pardeo A.R. Evidence for the involvement of an outer membrane protein in DNA initiation // J. Biol. Chem. — 1976. — **251**, № 11. — P. 3470–3479.
 44. Kusano T., Steinmetz D., Hendrickson C., Murchie J., King M., Benson A., Shaechter M. Direct evidence for specific binding of the replicative origin of the *Escherichia coli* chromosome to the membrane // J. Bacteriol. — 1984. — **158**, № 1. — P. 313–316.
 45. Zhu J., Brun C., Kurooka H., Ganagida M., Huberman J.A. Identification and characterization of a complex chromosomal replication origin in *Schizosaccharomyces pombe* // Chromosoma. — 1992. — **102**. — P. 7–16.
 46. Picket J.J., Pibody D.S. Encapsulation of heterologous RNAs by bacteriophage MS2 coat protein // Nucl. Acids Res. — 1993. — **21**. — P. 4621–4626.
 47. Inouye S., Inouye M. Bacterial reverse transcriptase // Reverse transcriptase / Eds A.M. Skalka and S.P. Goff. — Cold Spring Harbour Lab. Press, 1993. — 492 p.
 48. Weiss R.A., Kellam P. Illicit viral DNA // Nature. — 1997. — **390**, № 6657. — P. 235–236.
 49. Klenerman P., Hengartner H., Zinkernagel R.M. A non-retroviral RNA virus persists in DNA form // Nature. — 1997. — **390**, № 6657. — P. 298–301.

Поступила 4.07.06