

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* К АМИНОКИСЛОТНЫМ АНТИМЕТАБОЛИТАМ. 1. ПОИСК ГЕНОВ, ОТЛИЧНЫХ ОТ МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ ГЛИФОСАТА

*Показано, что из 50 глифосатустойчивых мутантов, полученных с помощью N-метил-N-нитро-нитрозогуанидина, 36 передавали признак глифосатустойчивости реципиентам и являются мутантами лишь по одному гену. Ни у одного мутанта не изменено проникновение глифосата в клетку и ни у одного не обнаружено ускорения реассоциации ДНК, свидетельствующего об амплификации гена, кодирующего мишень действия глифосата. Полученные мутации локализованы в четырех локусах хромосомы E. coli, далеко отстоящих друг от друга и от гена-мишени.*

**Введение.** Использование антиметаболитов — соединений, имитирующих природные молекулы клетки, но химически от них отличающихся, дает возможность обнаружения особо активных веществ, способных избирательно изменить ход того или иного процесса в клетке и таким образом повлиять на ее жизнеспособность. В связи с этим они представляют интерес как для научных исследований, так и различных прикладных областей — от сельского хозяйства до химиотерапии злокачественных заболеваний человека. Так, в настоящее время в сельском хозяйстве успешно применяют гербициды нового поколения высокоизбирательного действия, которые являют собой аминокислотные антиметаболиты [1, 2]. В химиотерапии рака используется аналог предшественника синтеза ДНК 5-фторурацил, останавливающий процесс репликации [3], аналог эстрогена тамоксифен — в адъювантной терапии рака молочной железы [4]. Длительная практика целевого применения антиметаболитов показала, что часто эффективность их действия снижается из-за возникновения устойчивых клеток. В настоящее время генетические механизмы такой устойчивости лучше всего изучены в случае аминокислотных антиметаболитов, в частности, аналога глицина глифосата, используемого как коммерческий гербицид раундап [1, 2].

Известно, что ген *aroA*, расположенный на 21-й мин карты хромосомы *E. coli*, кодирует один из ферментов шикиматного пути синтеза, который и является мишенью действия глифосата [1, 2]. В случае амплификации либо мутирования этого гена в соответствующем месте, делающем мишень нечувствительной к данному ингибитору, клетка приобретает свойство глифосатустойчивости. Вероятность изменений в клетке по этому гену невысока (порядка  $10^{-6}$ ). Вместе с тем, возможность возникновения клонов, устойчивых к глифосату, после обработки клеток мутагеном составляет  $10^{-4}$  [12]. Означает ли это, что мутации и в каких-то других генах способны обусловить фенотип глифосатустойчивости? Возможность идентификации каждого гена генома клеток *E. coli* позволяет ответить на этот вопрос. Цель настоящего исследования состояла в получении коллекции глифосатустойчивых мутантов, выявлении числа мутировавших генов и особенностей устойчивости к аналогам аминокислот, локализации этих генов в геноме и установлении их рецессивно-доминантных отношений.

**Материалы и методы.** Штаммы бактерий и плазмиды. В работе использованы донорский и реципиентный штаммы процесса конъюгации: HfrC (прототроф) и AB1157F<sup>-</sup> thr-1, Thi-1, lac y-1, mtl-1, xyl5, galK2, pro A2 arg E3, str31, tsx33, sup 37, leu 6, ara, his 4G, полученные от д-ра В. А. Ланцова (Ин-т ядер. исследований, Гатчина, Россия). В трансформационных опытах использовали штамм HB101 и плазмиду pUC19.

Мутагенез донорских клеток HfrC *in vivo* с помощью N-метил-N-нитро-нитрозогуанидина (ННЖ) и конъюгационный перенос мутировавших генов в реципиентные клетки осуществляли классическими методами [5]; селекцию глифосатустойчивых клеток — в условиях минимальной среды, содержащей 0,5 мМ глифосат. (Использован препарат, выпускаемый фирмой «Sigma» (США), а также коммерческий препарат, любезно предоставленный В. А. Швартау, Ин-т физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев.)

Опыты по измерению вхождения радиоактивных аминокислот в мутантные клетки проводили, как в работе [7].

Величины Cot<sub>1/2</sub> ДНК полученных глифосатустойчивых мутантов измеряли стандартным методом с помощью фракционирования одно- и двухцепочечных молекул ДНК с использованием центрифугирования кристаллов гидроксипатита в 0,12 и 0,48 М Na-фосфатном буфере [8].

Клонирование фрагментов ДНК глифосатустойчивых мутантов, частично гидролизованной с помощью Sau3A и сшитой с векторной ДНК pUC19 по BamHI-сайту, выполняли стандартно с использованием HB101 клеток, высеваемых на минимальную среду с глифосатом с учетом всех ауксотрофных маркеров реципиента [9].

**Результаты и обсуждение.** Поскольку вероятность возникновения глифосатустойчивых клонов клеток *E. coli* гораздо выше таковой мутирования гена *aroA*, нас привлекла возможность выявления числа генов, обуславливающих фенотип такой устойчивости, и локализации этих генов в геноме, что особенно необходимо, если эти гены окажутся по своей природе рецессивными. Для этого мы использовали метод прерываемого конъюгационного переноса генов из мутировавших клеток донора, приобретших устойчивость к глифосату, в нормальные чувствительные клетки реципиента. Для удобства поиска генов, отличающихся от *aroA*, мы выбрали в качестве донора штамм HfrC, у которого ген *aroA* расположен в самом конце участка переноса хромосомы реципиентным клеткам.

Клетки HfrC, стандартно обработанные ННЖ, высевали на минимальные чашки, содержащие 0,5 мМ глифосат. Выросшие колонии устойчивых клеток пассировали трижды, чередуя селективные и неселективные условия. Таким образом была получена коллекция из 50 мутантов, устойчивых к глифосату. Мутанты не отличались по скорости роста в селективных и неселективных условиях, за исключением мутанта 7. При пассировании реверсии мутантов не обнаружено.

При изучении особенности роста полученных мутантов на селективных средах, содержащих увеличивающиеся количества глифосата, было показано, что из 50 мутантов 40 выдерживали концентрации глифосата, увеличенные по сравнению с концентрацией первичной селекции в 2 раза, и 30 — даже в 3 раза.

Для того чтобы проверить, не связан ли фенотип глифосатустойчивости с неспособностью антиметаболита проникать в клетки мутантных клеток, мы изучили вхождение <sup>14</sup>C-аланина в клетки мутантов в присутствии глифосата. Известно, что аланин и глицин составляют одну группу проникновения аминокислот в клетки *E. coli* [6]. Если глифосат как аналог глицина относится также к этой группе, то «холодный» глифосат резко снизит радиоактивность клеток, контактирующих с <sup>14</sup>C-аланином. Такой результат демонстрирует рис. 1. Поскольку глифосат активно конкурировал с <sup>14</sup>C-аланином и, следовательно, он составляет одну группу проникновения с этой аминокислотой, то анализ вхождения <sup>14</sup>C-аланина в клетки полученных глифосатустойчивых му-

тантов позволяет выявить мутанты по проникновению этого соединения в клетки. Когда мы сравнили величины радиоактивности клеток 50 полученных глифосатустойчивых мутантов после их контакта с  $^{14}\text{C}$ -аланином в течение 0 и 60 мин [7], то трехкратные измерения, проведенные для каждого мутанта, не выявили мутантов, неспособных проводить глифосат внутрь клеток. (Данные по измерению радиоактивности клеток каждого мутанта не приводятся из-за их громоздкости.)

Более того, оказалось, что среди полученных 50 глифосатустойчивых мутантов 12 обладали способностью перекрестной устойчивости,

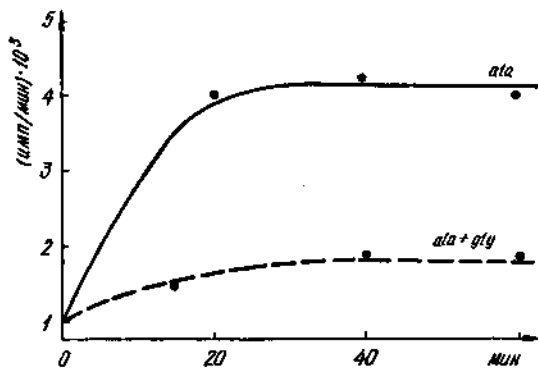
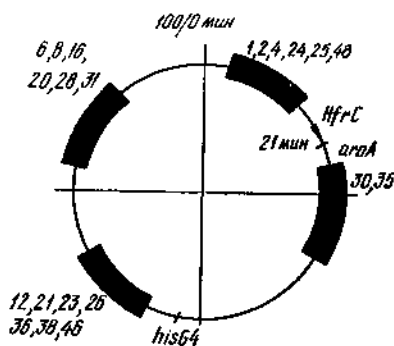


Рис. 1. Влияние «холодного» глифосата на вхождение в клетки *E. coli*  $^{14}\text{C}$ -аланина

Рис. 2. Локализация мутаций, сообщаемых клеткам *E. coli* глифосатустойчивость, на хромосомной карте (цифрами обозначены номера изученных глифосатустойчивых мутантов)



т. е. способностью роста клеток одновременно на аналогах различных аминокислот, а именно: 5-метилтриптофане (5 МТ), S-2-амино-этил-L-цистеине (АЭЦ), фторфенилаланине (ФФе) в концентрациях 1 мМ.

Чтобы определить, какое число генов, претерпевающих соответствующую мутацию, отвечает за фенотип глифосатустойчивости и в каких местах генома располагаются такие гены, мы осуществили передачу признака глифосатустойчивости от полученных мутантов клеткам реципиента АВ 1157 в течение 5 ч конъюгации. Для всех 50 мутантов сравнивали выходы эксконъюгатов по двум маркерам — *hisG4* и *gly<sup>r</sup>*: если число *gly<sup>r</sup>* эксконъюгатов сопоставимо с числом эксконъюгатов по одному гену *hisG4*, то ясно, что фенотип *gly<sup>r</sup>* связан с передачей лишь одного гена, несущего соответствующую мутацию. Изученные доноры по способности передачи этих двух маркеров распались на три группы: активной, умеренной и неактивной передачи. Это свидетельствует о том, что у 36 *gly<sup>r</sup>*-мутантов *HfrC* из полученных 50 передача признака глифосатустойчивости связана лишь с одним геном, и современные методы манипуляций с молекулами ДНК позволяют идентифицировать каждый такой ген в клетках *E. coli*.

Что касается 14 мутантов, утративших свойство передачи хромосомы, то у половины из них мы изучили скорость реассоциации ДНК и измерили процент ренатурации молекул ДНК при значении  $\text{Cot}_{1/2}$ , характерном для нормальных клеток *E. coli*. Проводя эту работу, мы исходили из того, что если в изучаемых мутантах произошло амплификация по гену *aroA*, то процент ренатурации молекул ДНК при подобных значениях  $\text{Cot}_{1/2}$  может быть выше, чем 50 %, учитывая, что в процесс амплификации вовлекаются фрагменты размером 10—20 тыс. п. н. и число копий амплифицированного материала составляет 20—30 [10]. (Мы воспользовались показателем  $\text{Cot}_{1/2}$  для изучения амплификации, влияющей на этот показатель, в связи с отсутствием у нас зонда гена *aroA*.) Измерение скорости ренатурации ДНК изучаемых глифосатустойчивых мутантов при значениях скорости  $\text{Cot}_{1/2}$  ни в одном из случаев не выявило ускорения реассоциации, характерного для генной амплификации, напротив, в случае мутанта 7 отме-

чено замедление этого процесса. Таким образом, у 43 исследованных мутантов не наблюдалось генной амплификации, обуславливающей устойчивости к антимаболиту.

Обнаружив, что у 36 глифосатустойчивых мутантов донора HfrC признак глифосатустойчивости связан лишь с одним геном, мы провели крупномасштабное картирование этих мутантов, разделив кольцевую карту хромосомы *E. coli* на четыре сектора так, чтобы ген *aroA* в реципиентную клетку не передавался или передавался в последнюю очередь. На рис. 2 показана локализация мутаций, обуславливающих признак глифосатустойчивости клеток *E. coli*. Из этого рисунка видно, что изученные мутанты группируются по четырем локусам, три из них характеризуются приблизительно одинаковой представленностью, четвертый — «задевается» мутациями более редко. Ясно, что идентификация генов, лежащих в этих областях, и мутации в этих генах, приводящие к устойчивости клетки к глифосату, представляют интерес. В зависимости от природы указанных генов можно использовать два различных приема для их идентификации. Если ген доминантен, можно применять технику клонирования [9], если рецессивен, то следует, напротив, вводить в мутантные клетки фрагменты геномной ДНК с дикой аллелью такого гена, превращающей клетку из устойчивой снова в чувствительную [11]. В настоящее время мы продолжаем работу с отдельными мутантами, определяя доминантные и рецессивные гены, сообщающие клеткам фенотип глифосатустойчивости.

Таким образом, генетическое изучение 50 *glu*<sup>r</sup>-мутантов, полученных с помощью ННЖ, показало, что эта устойчивость наиболее вероятно связана с мутированием лишь одного какого-то гена (у 36 мутантов из 50) и такой ген может располагаться в четырех локусах генома *E. coli*, картирующихся далеко друг от друга и от локуса гена *aroA*, кодирующего молекулу — мишень действия глифосата. В случае 43 мутантов не обнаружено явления генной амплификации, приводящей к антимаболической устойчивости. Среди 50 мутантов не выявлено ни одного с измененной способностью проводить глифосат внутрь клетки.

О. И. Черепенко, О. І. Карпенко, С. С. Малюта

#### ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ КЛІТИН *ESCHERICHIA COLI* ДО АМІНОКІСЛОТНИХ АНТИМЕТАБОЛІТІВ. І. ПОШУК ГЕНІВ, ВІДМІННИХ ВІД МІШЕНІ ДІЇ ГЛІФОСАТУ

##### Резюме

Показано, що з 50 гліфосатстійких мутантів, отриманих за допомогою N-метил-N-нітро-нітрозогуанідину, 36 передавали ознаку гліфосатстійкості реципієнтам і є мутантами лише за одним геном. У жодного з них не змінена проникність гліфосату до клітини і в жодного не виявлено прискорення реасоціації ДНК, яке б свідчило про ампліфікацію гена, кодуєного мішень дії гліфосату. Одержані мутації локалізовані у чотирьох локусах хромосоми *E. coli*, що знаходяться далеко один від одного і від гена мішені.

E. I. Cherepenko, O. I. Karpenko, S. S. Maluta

#### GENETIC MECHANISMS OF *ESCHERICHIA COLI* CELL RESISTANCE TO AMINO ACID ANTIMETABOLITES. I. SEARCH FOR GENES OTHER THAN GLYPHOSATE TARGET GENE

##### Summary

Conjugation donor Hfr C prototrophic cells were treated with NNG and glyphosate resistant cells were selected. Out of 50 mutants obtained 36 transferred the trait of glyphosate resistance to recipient cells showing that only a single gene was mutated. No changes in glyphosate penetration into mutant cells studied were shown. No changes in  $Cot_{1/2}$  of mutant DNA were found which could be if pronounced amplification of *aroA* locus occurred. Mutants obtained were shown to be localized at 4 located far from each other and from *aroA* gene.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kishore G., Shah D.* Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides // *Ann. Rev. Biochem.*—1988.—57.— P. 627—663.
2. *Черепенко Е. И., Малуго С. С.* О новых возможностях детоксикации гербицидов в растениях и окружающей среде // *Успехи соврем. биологии.*—1990.—110.— С. 461—474.
3. *Rowledge T. M.* New directions for gene therapy // *Science.*—1993.— N 9.— 10.— P. 48a—48b.
4. *Wolf D., Langan-Fahey S., Parker C. et al.* Investigation of the mechanism of tamoxifen-stimulated breast tumor growth with nonisomerizable analogues of tamoxifen and metabolites // *J. Nat. Cancer Inst.*—1993.—85.— P. 806—812.
5. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.—436 с.
6. *Lombardi F., Kaback H.* Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles // *J. Biol. Chem.*—1972.—247.— P. 7844—7857.
7. *Cosloy S. D.* Serine transfer system in *E. coli* K-12 // *J. Bacteriol.*—1973.—114.— P. 679—684.
8. *Britten R., Graham D., Neufeld B.* Analysis of repeating DNA sequences by reassociation // *Meth. Enzymol.*—1974.—29.— P. 363—418.
9. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—443 с.
10. *Tlsty T., Albertini A., Miller J.* Gene amplification in the Lac region of *E. coli* chromosome // *Cell.*—1984.—37.— P. 217—224.
11. *Kohara Yu., Akiyama K., Isono K.* The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library // *Cell.*—1987.—50.— P. 495—508.
12. *Comai L., Sen L., Stalker D.* An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate // *Science.*—1983.—221.— P. 370—371.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев

Получено 03.02.94