

в 8-ми книгах

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

Под редакцией Н.С.Егорова  
В.Д.Самуилова

В.Г.Дебабов  
В.А.Лившиц

СОВРЕМЕННЫЕ  
МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ  
ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ  
МИКРООРГАНИЗМОВ

---



Москва «Высшая школа» 1988

БК 30.6  
Б 63  
УДК 574.6

Рецензенты:

кафедра микробиологии Казанского ордена Ленина и ордена Трудового Красного Знамени государственного университета им. В. И. Ульянова-Ленина (зав. кафедрой — проф. И. Б. Лещинская) и д-р биол. наук, проф. В. Н. Гершанович (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР)

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебного пособия для студентов биологических специальностей высших учебных заведений

Учебное издание

**БИОТЕХНОЛОГИЯ. В 8-ми кн.**

**Владимир Георгиевич Дебабов, Виталий Аркадьевич Лившиц**

**К н и г а 2**

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ  
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Заведующий редакцией *А. Г. Гаврилов*. Редактор *М. М. Пенкина*. Младшие редакторы *И. М. Павлова, Е. И. Попова*. Художественный редактор *Т. А. Коленкова*. Художник *С. Ю. Вериченко*. Технический редактор *Н. А. Битюкова*. Корректор *Г. И. Кострикова*.

ИБ № 6666

Изл. № Е-562. Сдано в набор 22.05.87. Подписано в печать 04.09.87. Т—18447. Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бум. офсетная № 1. Гарнитура литературная. Печать офсетная. Объем 13 усл. печ. л. 26,5 усл. кр.-отт 14,58 уч. изд. л. Тираж 30 000 экз. Заказ № 670. Цена 55 коп.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14. Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97

**Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн./Под ред. Б 63 Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 2. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов/ В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. — М.: Высш. шк., 1988. — 208 с.: ил.**

Излагаются основные сведения о методах реорганизации генома микроорганизмов с целью получения штаммов для микробиологической промышленности. Рассматриваются общие механизмы регуляции метаболизма микробной клетки. Описаны современные генетические методы работы с промышленными микроорганизмами и методы генетической инженерии. Приводятся примеры создания современными методами штаммов продуцентов первичных метаболитов и интерферонов человека.

Б 291000000(430900000) — 269  
001(01) — 88 224 — 87

БК 30.6 + 28.07  
605

© Издательство «Высшая школа», 1988

# ПРЕДИСЛОВИЕ

---

В настоящее время все большее значение приобретают производственные процессы, основанные на деятельности живых организмов. Современная биотехнология прямо или косвенно связана с генетикой и геной инженерией микроорганизмов. Во-первых, сами микроорганизмы являются составной частью биотехнологических процессов, таких, как биосинтез антибиотиков, ферментов, аминокислот, микробиологическое производство белков человека (интерферонов, гормонов и др.). Во-вторых, даже перенос генов в растительные и животные клетки осуществляется с помощью первичного клонирования их в составе микроорганизмов.

В последние годы появились обзоры, сборники статей и книги советских авторов, а также переводная литература, где рассматриваются успехи и некоторые перспективы развития биотехнологии, излагаются методы геной инженерии. Однако в отечественной литературе фактически отсутствуют учебные пособия, где бы излагались современные методы получения штаммов микроорганизмов для промышленности — современные методы селекции микроорганизмов. Цель данного пособия, которое входит в серию «Биотехнология», — восполнить этот пробел.

Задачей селекционной работы является реорганизация генома микробной клетки с целью переориентации путей биосинтеза в нужном направлении. Поэтому в книге даны современные представления о путях регуляции метаболической активности микробной клетки — объекта манипуляции селекционера. Рассмотрены вопросы мутагенеза и выделения мутантов, пути генетического обмена, излагаются основы геной инженерии, т. е. средства реорганизации генома. В последней части пособия приводятся примеры создания штаммов микроорганизмов — продуцентов биологически активных соединений — с использованием современных подходов. В силу ограниченного объема книги и необозримого поля деятельности современной микробиологии и биотехнологии в ней не могут быть отражены все области практической селекции. Цель пособия — иллюстрация принципов, возможностей и тенденций развития современной селекции.

Авторы выражают благодарность проф. И. Б. Лещинской и проф. В. Н. Гершановичу за ценные замечания, направленные на улучшение книги, и Е. В. Славинской за помощь в ее оформлении.

*Авторы*

# ВВЕДЕНИЕ

---

Микроорганизмы — бактерии, дрожжи и мицелиальные грибы — это удивительно совершенные творения природы. Микробная клетка в состоянии жить и размножаться, используя в качестве источника питания часто только один-единственный органический субстрат и минеральные соли. Бактерии способны жить в аэробных и анаэробных условиях при температурах, близких к 0 и +80°C. Совершенный, точно регулируемый метаболизм микробной клетки позволяет ей расти и делиться с огромной скоростью. Так, деление бактерий *Escherichia coli* (кишечная палочка) при росте на полноценной среде происходит каждые 30 мин.

Вся жизнедеятельность, все механизмы микроорганизма запрограммированы на безостановочный рост и деление до тех пор, пока окружающая среда дает хотя бы минимальные для этого условия. Важно отметить, что все процессы в бактериальной клетке подчинены строгим правилам экономии и ни один из первичных метаболитов не образуется сверх строго необходимых для роста количеств. Если сравнить клетку с машиной, то это очень совершенная машина, имеющая коэффициент полезного действия до 70% (превращение углерода субстрата в углерод клеточной биомассы).

Перечисленные уникальные свойства микробной клетки делают возможным эффективное применение микроорганизмов в хозяйственной деятельности человека. С древнейших времен человечество использовало дрожжи для хлебопечения, виноделия, пивоварения; бактерии — для получения кисломолочных продуктов.

Однако только с середины прошлого века, после классических работ Луи Пастера, микробиология, в том числе и промышленная микробиология, выделилась в самостоятельную науку. Сформировались понятия о «чистой культуре» микроорганизмов, т. е. популяции однородных особей, начали развиваться работы по изучению биохимии и физиологии микроорганизмов. С начала 40-х годов нашего века микроорганизмы становятся объектом генетических исследований. Получение биохимических мутантов на нейросторе (клональный анализ) и доказательство справедливости мутационных закономерностей для бактерий кишечной

палочки (С. Лурия, М. Дельбрюк), открытие материального носителя наследственности — дезоксирибонуклеиновой кислоты (О. Эйвери, К. Мак-Леод, М. Маккарти) послужили основой бурного развития молекулярной биологии и генетики.

В связи с запросами промышленности получила развитие прикладная генетика микроорганизмов, именуемая иначе *селекцией микроорганизмов*.

В настоящее время во многих странах мира, в том числе в СССР, создана и быстро развивается микробиологическая промышленность. Продуктами этой промышленности являются антибиотики, аминокислоты и нуклеозиды, ферменты, биологические средства борьбы с насекомыми, кормовой белок, витамины, этиловый и бутиловый спирты, ацетон, полисахариды, бактериоазотфиксаторы, бактерии-биодегранты вредных веществ и т. д. В последние годы микробиологические процессы нашли применение при добыче металлов из бедных руд, для увеличения выхода нефти из пластов. Разработка методологии генной инженерии позволила наладить микробиологическое производство ценных белков человека и сельскохозяйственных животных (интерфероны, гормоны и др.), нового поколения вакцин.

Как уже говорилось, микробная клетка — это «совершенная машина». Однако для большинства промышленных задач генетическая программа клетки должна быть перестроена таким образом, чтобы направить биосинтетический потенциал клетки на производство необходимого продукта, а не на непрерывное самовоспроизводство. Даже в тех случаях, когда ставится цель простого получения биомассы (кормовой белок), могут потребоваться изменения свойств, улучшающие технологические параметры процесса, повышающие конверсию субстрата в продукт и т. д.

Вопросами совершенствования промышленных микроорганизмов традиционно занимаются микробиологи-селекционеры. Слово «селекция» (от лат. *selectio*) означает отбор. Действительно, на протяжении длительного времени и в наши дни для недостаточно изученных с точки зрения генетики микроорганизмов единственным способом их улучшения является индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор лучших вариантов (штаммов). Метод чрезвычайно трудоемок, так как отбор, как правило, проводится без детального знания путей биосинтеза. Селекционные работы такого рода могут занимать многие годы. Тем не менее практические результаты часто бывают очень значительными. Так, многолетняя селекция штаммов-продуцентов пенициллина позволила поднять активность от 100 до 40 000 ед/мл. Задача создания высокопродуктивных штаммов намного упрощается, если экспериментатор имеет достаточно знаний о путях биосинтеза того или иного метаболита и имеются способы генетического обмена у исследуемого микроорганизма, позволяющие собрать в одном штамме все полезные мутации и элиминировать все вредные. Развитие методологии генной инженерии, дающей

возможности изолировать и изменить отдельные гены, намного расширило возможности реорганизации геномов микроорганизмов.

В настоящее время наши знания об организации генома бактериальной клетки, содержащей около 5 тыс. генов, достаточно полны. Для *E. coli*, наиболее изученного микроорганизма, известно уже около 2500 генов. Познаны молекулярные механизмы репликации ДНК, транскрипции и трансляции, регуляции активности генов. Тенденцией сегодняшнего дня является сознательное конструирование штаммов микроорганизмов с заданными свойствами с использованием фундаментальных данных молекулярной биологии, генетики, геной инженерии. Собственно говоря, применение названных подходов в сочетании с приемами классической селекции и составляет суть современной селекции микроорганизмов.

Настоящая книга должна дать общее представление о современной селекции микроорганизмов, составляющей важнейшую часть биотехнологии.



РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА  
В МИКРОБНОЙ КЛЕТКЕ

---

В процессе роста и жизнедеятельности в микробной клетке осуществляется огромное число катализируемых ферментами реакций. Если клетку поместить в среду, содержащую высокомолекулярное соединение, например крахмал, а также аммоний и минеральные соли, то она должна сначала гидролизовать крахмал до глюкозы, обеспечить доставку глюкозы внутрь клетки, расщепить ее на двух- и трехуглеродные соединения, ввести эти небольшие молекулы в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), с тем чтобы обеспечить себя энергией и промежуточными соединениями. Промежуточные соединения, образованные в ЦТК и в других реакциях, должны превратиться в строительные блоки, такие, как 20 аминокислот, 4 рибонуклеотида, 4 дезоксирибонуклеотида, около 10 витаминов, жирные кислоты, сахара, гексозамины. Строительные блоки, в свою очередь, должны трансформироваться приблизительно в 2000 белков, ДНК, три типа РНК, полисахариды, мукопептиды, коферменты и липиды. Эти молекулы используются затем для образования клеточных структур, таких, как ядро, рибосомы, мембрана, клеточная стенка, митохондрии, жгутики. Продукт этого множества реакций — новая клетка.

Для успешной борьбы за существование в природе необходимо, чтобы процесс роста был быстрым и эффективным. Несомненно, что прекращение образования каких-либо конечных продуктов метаболизма, когда потребность в них временно отпала или когда они накопились в достаточных количествах, выгодна для организма. Экспериментально установлено, что при максимальной скорости синтеза того или иного фермента доля этого фермента в общем белке клетки может достигь 5—8%. Совершенно очевидно, что если из тысяч ферментов, которые клетка потенциально способна синтезировать, хотя бы несколько будут образовываться с такой максимальной скоростью, то рост клетки замедлится и нормальное функционирование и даже само выживание ее станет невозможным. Поэтому микроорганизмы должны обладать способностью управлять процессами биосинтеза, а так-

же вносить качественные преобразования в работу метаболического аппарата в ответ на изменение условий среды. Для осуществления этих функций у них развились и наследственно закрепились сложные и тонкие регуляторные механизмы, которые обеспечивают экономность метаболических процессов и высокий уровень их координации. Селекция микроорганизмов, создание новых штаммов для микробиологической промышленности часто направлены на усиление образования того или иного продукта или даже синтез нового продукта, несвойственного данному организму. Решение этих задач так или иначе связано с изменением регуляторных механизмов клетки. Некоторые из этих механизмов будут описаны в настоящей главе.

## § 1. Регуляция активности ферментов

В клетке изменение скорости катализируемых ферментами биохимических реакций может происходить по крайней мере двумя путями. Существует быстрый (действующий в течение секунд или минут) механизм регуляции ферментативной активности, который зависит от изменения каталитической активности индивидуальных молекул фермента. Имеется также несколько более медленный (действующий в течение многих минут или часов) механизм, лимитируемый количеством фермента, которое определяется скоростью процессов его синтеза и распада. Оба эти механизма обычно действуют при посредстве низкомолекулярных соединений, образующихся в клетке как промежуточные метаболиты или проникающие в нее из окружающей среды. В обоих механизмах используется важнейший принцип управления — *принцип обратной связи*. Прежде чем перейти к рассмотрению того, как этот принцип реализуется в регуляции активности ферментов, напомним несколько общих механизмов изменения скорости ферментативных реакций.

Самый простой способ регуляции любого метаболического пути может быть основан на доступности субстрата, а также кофактора. Уменьшение концентрации субстрата приводит к снижению скорости потока веществ через данный метаболический путь. С другой стороны, увеличение концентрации субстрата будет стимулировать метаболический путь. Необходимо подчеркнуть, что, каковы бы ни были другие факторы регуляции ферментативной активности, доступность субстрата надо рассматривать как потенциальный механизм регуляции любого метаболического пути. В селекции продуцентов различных метаболитов генетические манипуляции, направленные на увеличение концентрации предшественников, нередко являются эффективным средством повышения выхода целевого продукта.

Аналогичную роль может играть и повышение концентрации кофакторов.

В обратимых реакциях эффективное удаление продукта увеличивает скорость его образования из субстрата. Не исключено,

что специфические участки некоторых метаболических путей контролируются с помощью такого механизма. В этом случае повышение эффективности удаления промежуточного продукта путем, например, увеличения скорости последующей неравновесной реакции будет стимулировать весь метаболический путь. Для увеличения скорости реакции можно, например, амплифицировать ген, контролирующий синтез соответствующего фермента.

Наиболее гибким и широко распространенным способом контроля метаболизма в клетке является регуляция активности ферментов по принципу обратной связи.

Процессы биосинтеза многих незаменимых или так называемых первичных метаболитов характеризуются тем, что конечный продукт данного биосинтетического пути при повышении его концентрации подавляет активность первого фермента этого пути. В результате такого подавления соответствующий процесс биосинтеза останавливается — конечный продукт, а также промежуточные продукты, участвующие в его образовании, не накапливаются в клетке. Таким образом, интенсивность процесса биосинтеза зависит от скорости потребления конечного продукта. Этот механизм автоматической регуляции называют подавлением под действием конечного продукта или *ретроингибированием*.

Первое указание на существование такого механизма было получено в 1953 г. А. Новиком и Л. Сцилардом при изучении метаболизма триптофана у *E. coli*. Заключительный этап биосинтеза триптофана состоит из следующих катализируемых ферментами стадий:



Было обнаружено, что накопление индолглицерофосфата (ИГФ) у мутанта *E. coli* с нарушенным биосинтезом триптофана резко тормозится, если триптофан добавить в среду. И это происходит несмотря на то, что в клетках имеются все ферменты, необходимые для синтеза этого предшественника триптофана. Уже в то время возникло предположение, что триптофан ингибирует каталитическую функцию какого-то фермента на пути образования ИГФ.

Позднее было установлено, что чувствительным к триптофану ферментом является анранилатсинтетазы. В эстрактах из клеток *E. coli*, содержащих этот фермент, а также его субстраты — хоризмат и глутамин, образование анранилата прекращается, как только в реакционную смесь добавляют триптофан. Допол-

нительные опыты показали, что активность анранилатсинтетазы подавляется только триптофаном и не подавляется никакими другими метаболитами клетки.

Это высокоспецифическое подавление активности первого фермента заключительного этапа пути биосинтеза триптофана обеспечивает строгую и очень гибкую регуляцию новообразования этой аминокислоты в зависимости от скорости включения ее в белок и присутствия в ростовой среде.

Многочисленные эксперименты по включению меченых соединений в макромолекулы показали, что в процессе роста бактерии преимущественно используют добавленные аминокислоты, пурины и пиримидины и что эти соединения оказывают ингибирующее действие на свой собственный синтез из молекул-предшественников. Очевидно, что регуляция активности ферментов с помощью ретроингибирования является общей особенностью метаболизма.

Исследования механизма подавления под действием конечного продукта, проведенные *in vitro* с использованием очищенных ферментов, показали, что ингибитор образует комплекс с ферментом. При этом он связывается со специфическим участком, который имеет высокое сродство к ингибитору и полностью отличается от активного центра фермента. Этот участок Ж. Моно, Ж. Шанжэ и Ф. Жакоб назвали *аллостерическим участком* или *аллостерическим центром* (от греч. «аллос» — другой, «стерeos» — пространственный), а ферменты, имеющие аллостерический центр, — *аллостерическими ферментами*.

Аллостерические ферменты представляют собой олигомеры; они состоят из двух, четырех, шести (или более) идентичных или различных субъединиц, способных взаимодействовать друг с другом. Связывание ингибитора искажает трехмерную структуру фермента; это искажение передается активному центру и вызывает подавление активности фермента. Следовательно, некоторые метаболиты обладают способностью передавать информацию (обычно путем изменения концентрации) ключевым ферментам о состоянии обмена веществ в клетке, в частности сигнализировать о необходимости прекращения дальнейшего функционирования данного метаболического пути.

При мутационном повреждении аллостерического центра процесс биосинтеза не будет более подавляться конечным продуктом и последний начнет выделяться в среду. Для отбора таких мутантов используют структурные аналоги метаболитов. Например, 5-метилтриптофан, аналог триптофана, так же как и триптофан, подавляет анранилатсинтетазу, но не заменяет триптофан в белке и поэтому задерживает рост бактерий. Некоторые мутанты, устойчивые к этому аналогу, действительно выделяют триптофан в среду, и анранилатсинтаза у них не чувствительна к ингибирующему действию триптофана и 5-метилтриптофана.

Получение мутантов, устойчивых к аналогам метаболитов,

часто используют в селекции продуцентов аминокислот, нуклеотидов и витаминов.

В некоторых случаях связывание определенных соединений с аллостерическим центром приводит не к подавлению активности фермента, а к ее увеличению. Например, активность аспарат-транскарбамоилазы (АТКазы), которая катализирует первую реакцию биосинтеза пиримидинов, подавляется одним из конечных продуктов этого биосинтетического пути — цитидинтрифосфатом (ЦТФ) и активируется аденозинтрифосфатом (АТФ). Это, кстати, обеспечивает координацию синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Интересно отметить, что в АТКазе активный центр и аллостерический участок расположены в разных субъединицах. Это однозначно доказывает, что они не тождественны, и служит убедительной иллюстрацией концепции аллостерической регуляции. Установлено также, что активатор фермента (АТФ) и его ингибитор (ЦТФ) связываются с одним и тем же участком.

Для общего обозначения регуляторных молекул, которые ингибируют или активируют аллостерические ферменты, используют термин *аллостерические эффекторы*. Поскольку аллостерические эффекторы не должны обладать структурным сходством с субстратом фермента, метаболиты, образуемые в одном пути биосинтеза, могут запускать или тормозить биосинтез различных неродственных метаболитов. Тем самым обеспечивается координация различных метаболических процессов.

Итак, при аллостерической регуляции активность фермента изменяется в результате конформационных изменений его структуры, индуцированных присоединением небольшой молекулы эффектора. Этот переход аллостерического фермента из одного состояния в другое не сопровождается образованием ковалентной химической связи. В последние годы стало известно о важной роли еще одного способа регуляции метаболизма: изменения активности ферментов в результате ковалентной модификации их структуры. В некоторых случаях активная и неактивная формы фермента различаются числом содержащихся в них аминокислотных остатков. Переход из одной формы в другую осуществляется в результате ограниченного протеолиза. Это высокоспецифический необратимый процесс, который может инициировать физиологическую функцию путем превращения белка-предшественника в его активную форму. С другой стороны, ограниченный протеолиз может служить механизмом, обеспечивающим прекращение какой-либо биологической активности.

Активные и неактивные формы фермента могут различаться также наличием или отсутствием каких-либо химических групп, ковалентно связанных с белком. Взаимный переход фермента из одной формы в другую достигается путем фосфорилирования — дефосфорилирования (ферменты метаболизма гликогена эукариотических клеток), аденилирования — деаденилирования (глутаминсинтетаза *E. coli*), ацетилирования — деацетилирова-

ния (цитратлиаза *Rhodopseudomonas*). Обычно ферменты, катализирующие ковалентную модификацию, сами аллостерически регулируются, поэтому ковалентную модификацию можно рассматривать как одно из проявлений аллостерической регуляции.

В последующих разделах этой главы некоторые из приведенных примеров будут рассмотрены более подробно.

## § 2. Индукция и репрессия синтеза ферментов

Из тысяч ферментов, которые растущие микробные клетки способны синтезировать, некоторые образуются постоянно и независимо от состава питательной среды. Примером таких *конститутивных ферментов* являются ферменты гликолиза, превращающие глюкозу в пируват.

Другие ферменты, *адаптивные*, или *индуцибельные*, образуются только тогда, когда их субстраты (или структурные аналоги субстратов) присутствуют в среде. Так, клетки *E. coli*, растущие на среде с глюкозой, содержат только следовые количества ферментов метаболизма лактозы и многих других субстратов, которые они способны усваивать. Однако если те же клетки перенести в среду, содержащую в качестве единственного источника углерода лактозу, то уже через 1—2 мин можно зафиксировать повышение активности  $\beta$ -галактозидазы. Этот фермент гидролизует лактозу на *D*-галактозу и *D*-глюкозу. В течение последующего непродолжительного промежутка времени (от 20 до 180 мин в зависимости от условий роста) активность  $\beta$ -галактозидазы увеличивается в 1000 раз по сравнению с исходным уровнем.

*Индукция фермента* — это относительное увеличение скорости синтеза фермента в ответ на появление химического соединения — индуктора.

Аналоги субстратов часто являются превосходными индукторами, не будучи субстратами для индуцируемых ферментов. К примеру, для  $\beta$ -галактозидазы таким соединением является изопропил- $\beta$ -тио-*D*-галактозид (ИПТГ) — неметаболизируемый аналог лактозы. С другой стороны, некоторые субстраты не могут быть индукторами; иногда индуктором является продукт реакции, катализируемой индуцируемым ферментом. В частности, лактоза (1-4-О- $\beta$ -*D*-галактопиранозил-*D*-глюкоза), прежде чем выступить в роли индуктора, сначала должна превратиться под действием  $\beta$ -галактозидазы в свой изомер — аллолактозу (1-6-О- $\beta$ -*D*-галактопиранозил-*D*-глюкозу). Индуктором ферментов, участвующих в катаболизме нуклеозидов у *E. coli*, является дезоксирибозо-5-фосфат, который представляет собой промежуточный продукт катаболизма нуклеозидов.

Метаболизм многих субстратов, которые оказываются единственными источниками углерода или азота в питательной среде, связан с необходимостью их транспорта в клетку. Поступление лактозы в клетки *E. coli* обеспечивает специальный ферментопо-

добный белок — галактозидпермеаза, синтез которого индуцируется одновременно с  $\beta$ -галактозидазой в результате так называемой *координированной индукции*. Галактоза, образующаяся под действием  $\beta$ -галактозидазы, в свою очередь, может индуцировать координированный синтез ряда ферментов, превращающих ее в глюкозо-1-фосфат. Однако образование этих ферментов не связано во времени с появлением  $\beta$ -галактозидазы и галактозидпермеазы. Таким образом, полное усвоение лактозы происходит в результате *последовательной индукции* ферментов, превращающих ее в метаболиты, которые могут быть непосредственно использованы клеткой.

В 1953 г. впервые было обнаружено, что образование триптофансинтетазы, которая катализирует последний этап биосинтеза триптофана, специфически подавляется, если бактерии получают экзогенный триптофан. В последующие годы были получены многочисленные данные, свидетельствующие о том, что добавление в ростовую среду соединения, которое является конечным продуктом какого-либо биосинтетического пути, наряду с подавлением активности первого фермента этого пути вызывает **замедление или остановку синтеза всех ферментов соответствующего пути**. Это явление, прямо противоположное индукции, называется *репрессией* ферментов или, точнее, *координированной репрессией* ферментов. Ферменты, синтез которых подавляется конечным продуктом, могут быть *дерепрессированы*, т. е. скорость их синтеза может быть увеличена, если внутриклеточная концентрация конечного продукта падает до очень низкого уровня.

Механизмы индукции и репрессии предохраняют клетку от напрасной траты аминокислот и энергии на образование ненужных в данных условиях ферментов, однако, когда появляется необходимость, эти ферменты могут быстро синтезироваться.

С помощью репрессии регулируется синтез аминокислот, пуринов, пиримидинов, витаминов и других первичных метаболитов. Следовательно, регуляция биосинтетических путей по принципу обратной связи осуществляется двумя способами: с помощью ретроингибирования и репрессии.

Были проведены специальные опыты для выяснения вопроса о соотношении между этими регуляторными механизмами. Показано, что если к культуре *E. coli*, растущей на глюкозоминеральной среде, добавить низкие концентрации (от 1 до 10 мкг/мл) аргинина, то репрессия ферментов пути биосинтеза аргинина не происходит, а весь экзогенный аргинин усваивается. Очевидно, что в этих условиях действует механизм ретроингибирования, который компенсирует увеличение концентрации аргинина уменьшением собственного синтеза этой аминокислоты. Однако при добавлении аргинина в концентрации более 10 мкг/мл он используется не полностью и можно наблюдать репрессию ферментов пути биосинтеза аргинина. Ретроингибирование, следовательно, можно рассматривать как способ быстрого и тонкого регулирования биосинтеза малых молекул, тогда как репрессия осуществляет более медленное и грубое регулирование, главным образом с целью экономии синтеза белка. Оба эти механизма при совместном действии дополняют друг друга, обеспечивая максимальную экономию всех клеточных ресурсов.

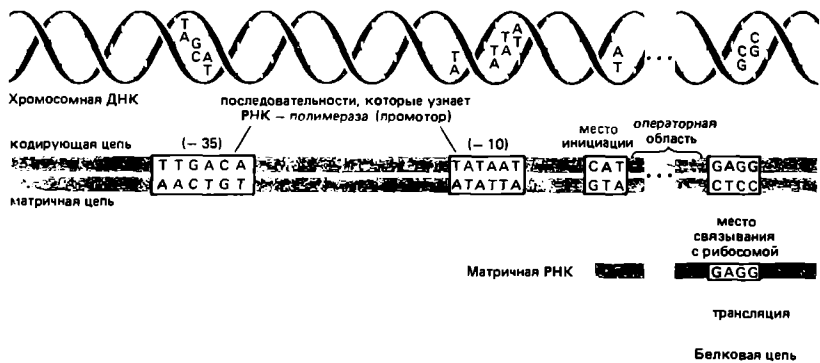


Рис. 1. Этапы реализации генетической

Какие процессы лежат в основе индукции и репрессии ферментов? Ответ на этот вопрос был получен в результате молекулярно-генетических исследований, выполненных в основном на *E. coli*.

Известно, что вся генетическая информация для синтеза белка содержится в хромосоме (молекуле ДНК) и что эта информация реализуется в результате последовательных процессов транскрипции и трансляции. При этом сначала на соответствующем гене (участке молекулы ДНК) синтезируется информационная, или матричная, РНК (мРНК). Она служит матрицей для синтеза белка (полипептида) в процессе трансляции (рис. 1). Таким образом, процесс транскрипции представляет собой непосредственное проявление активности отдельных генов.

В 1961 г. Ф. Жакоб и Ж. Моно на основании генетического и биохимического изучения усвоения лактозы клетками *E. coli* К 12 предложили гипотезу о регуляции активности генов у бактерий, получившую широкую известность как «модель оперона». Согласно этой модели, на хромосоме имеется по крайней мере четыре компонента системы регуляции: структурный ген (или гены, контролируемые связанные биохимические функции), ген-регулятор, оператор и промотор, которые составляют оперон (рис. 2). Ген-регулятор (R) определяет структуру белка-репрессора.

Этот белок способен связываться с оператором (O), который контролирует функционирование прилежащих структурных генов ( $S_1, S_2, S_3$ ). Промотор (P) является начальным участком для связывания РНК-полимеразы — фермента, который катализирует транскрипцию ДНК в мРНК. Если белок-репрессор связан с оператором, то РНК-полимераза не может перемещаться (или присоединиться) к промотору и мРНК, которые комплементарны последовательности генов  $S_1, S_2$  и  $S_3$ , не образуются (рис. 2, а). Следовательно, соответствующие ферменты также не синтезируются.





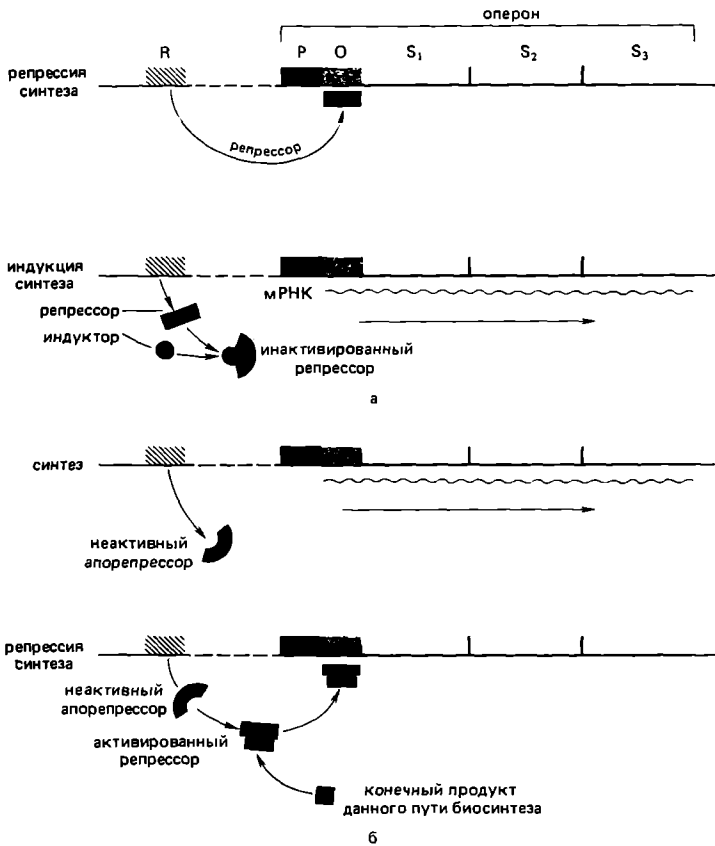


Рис. 2. Генетическая регуляция индукции и репрессии ферментов: а — координированная индукция; б — координированная репрессия ферментов

чение конститутивных мутантов имеет важное значение в селекции промышленных штаммов микроорганизмов.

Модель оперона применима и для репрессии ферментов. Только здесь продукт гена R является неактивным репрессором (апорепрессором), который сам по себе не способен взаимодействовать с оператором, но который может активироваться конечным продуктом (корепрессором) с образованием активного репрессора (рис. 2, б).

Уже говорилось о том, что можно получить мутанты *E. coli*, устойчивые к ингибирующему действию аналога триптофана — 5-метилтриптофана. У некоторых из этих мутантов нарушено ретроингибирование антранилатсинтетазы. У других — ферменты пути биосинтеза триптофана оказались координированно депрессированы. Генетический анализ показал, что существует два класса таких конструктивных мутантов. У одних мутация

повреждает ген *trpR*-регулятор триптофанового оперона, который расположен на хромосоме на значительном расстоянии от контролируемых им генов *trpEDCBA*. Мутанты *trpR* являются конститутивными либо в результате полного отсутствия репрессора, либо вследствие того, что репрессор не может быть активирован триптофаном. Второй класс мутантов, конститутивно синтезирующих ферменты пути биосинтеза триптофана, обусловлен мутациями, которые локализируются рядом с геном *trp E* и, очевидно, затрагивают операторный участок.

Репрессор (апорепрессор) триптофанового оперона был частично очищен, и механизм его действия изучен *in vitro*. Показано, что репрессор переходит в активную форму, связывая триптофан. Этот комплекс репрессор-корепрессор подавляет инициацию транскрипции, конкурируя с РНК-полимеразой за место связывания на промоторе.

Таким образом, индукция и репрессия представляют собой два сходных механизма регуляции транскрипции и различие между ними заключается в природе репрессора.

Следует отметить, что объединение генов, ответственных за образование ферментов одного метаболического пути, в единый оперон не является непременным условием для регуляции их с помощью репрессии или индукции. У *E. coli* гены, кодирующие ферменты биосинтеза аргинина, находятся в различных участках хромосомы, но все они контролируются одним и тем же регуляторным геном, образуя *регулон*. Другой пример регулона — это совокупность генов, кодирующих около двух десятков белков и ферментов, которые индуцируются в клетке в ответ на воздействия, повреждающие ДНК, — так называемый SOS-регулон. Все они регулируются одним репрессором — продуктом гена *lex A*.

Опероны и регулоны, контролируемые связанные физиологические функции, обнаружены почти у всех генетически изученных видов бактерий.

В случае индукции и репрессии исследователь имеет дело с так называемой негативной регуляцией выражения генов. Существует также механизм позитивной регуляции — активация действия генов, которая осуществляется с помощью аллостерических регуляторных белков. Наиболее известные и хорошо изученные примеры такого рода регуляции — это регуляция катаболизма арабинозы и синтеза щелочной фосфатазы у *E. coli*.

Продукт регуляторного гена, *araC*, контролирующего арабинозный оперон, может находиться как в состоянии репрессора, так и в состоянии активатора. В форме репрессора он присоединяется к оператору и блокирует транскрипцию структурных генов. Соединяясь с индуктором оперона, арабинозой, белок-регулятор переходит в форму активатора и, взаимодействуя с промоторным участком (инициатором), стимулирует транскрипцию оперона.

Интересно, что продукт гена *araC* репрессирует свой соб-

ственный синтез независимо от присутствия в среде арабинозы, т. е. имеет место негативная ауторегуляция экспрессии этого гена.

Щелочная фосфатаза позволяет клеткам получать фосфат за счет гидролиза органического фосфата. Неорганический фосфат среды в комплексе с продуктом гена-регулятора репрессирует синтез щелочной фосфатазы. Однако в отсутствие неорганического фосфата продукт гена-регулятора является необходимым активатором синтеза щелочной фосфатазы. Этот регуляторный механизм обеспечивает высокую чувствительность синтеза щелочной фосфатазы к присутствию неорганического фосфата, который превращает активатор синтеза фермента в репрессор.

Таким образом, имеется большое разнообразие механизмов регуляции действия генов и, вероятно, не существует даже двух оперонов, которые регулировались бы одинаково.

Важным регуляторным элементом, присутшим всем оперонам, является промотор, т. е. участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, чтобы начать синтез РНК. Свойствами промотора может быть обусловлена низкая эффективность транскрипции одних генов или, наоборот, интенсивная транскрипция других, а также потребность в специальных факторах для инициации транскрипции. Известно, например, что ген-регулятор лактозного оперона транскрибируется, по-видимому, всего один раз в течение генерации и количество молекул репрессора не превышает 10 на клетку. В то же время рибосомальные гены, составляющие не более 1% от всего генома *E. coli*, обеспечивают до 40% одномоментного синтеза всей РНК в клетке.

Мутации могут изменять свойство промоторов, и в результате выражение соответствующих оперонов может повышаться или понижаться. Так, для выделения репрессора лактозного оперона использован мутант *E. coli* с измененным промотором гена-регулятора, который интенсивно синтезировал этот белок.

Свойства промоторов проявляются в процессе их взаимодействия с РНК-полимеразой. Этот фермент играет важнейшую роль в регуляции транскрипции.

### **§ 3. РНК-полимераза и регуляция транскрипции у бактерий**

Итак, в основе механизма регуляции транскрипции, открытого Ж. Моно и Ф. Жакобом, лежит принцип оперонной организации ДНК, в которой кроме генов, кодирующих аминокислотные последовательности белков, имеются регуляторные, не кодирующие участки. Один или несколько структурных генов вместе с прилегающими к ним регуляторными участками образуют элементарную единицу транскрипции — оперон. Совокупность всех регуляторных участков, определяющих эффективность транскрипции, часто называют *регуляторной областью* или *промоторной зоной*.

В настоящее время расшифрована нуклеотидная последова-

тельность регуляторных зон многих оперонов, определена структура промоторов, операторов, а также участков, связывающих другие регуляторные белки. Эти исследования в основном подтвердили данные, полученные в генетических экспериментах, и в то же время значительно расширили и углубили представления о механизмах регуляции транскрипции.

Сравнение нуклеотидных последовательностей промоторных зон многих оперонов показало наличие сходных структур («консервативных участков» или «канонических последовательностей») в районах «10» и «35» нуклеотидов, предшествующих стартовой точке транскрипции (районы «-10» и «-35» нуклеотидов). По-видимому, именно с этими участками и связывается РНК-полимераза (см. рис. 1). Кроме того, в некоторых случаях важное значение имеет нуклеотидная последовательность, непосредственно примыкающая к стартовой точке.

Как уже отмечалось, огромную роль в регуляции транскрипции играют белки-регуляторы. Обычно это лишённые каталитической активности аллостерические белки, способные взаимодействовать с низкомолекулярными эффекторами и контролировать выражение определенных оперонов. Белки-регуляторы связываются с нуклеотидами промоторной зоны, которые предшествуют промотору, или перекрываются с ним и активируют или подавляют транскрипцию.

Следует подчеркнуть, что не существует строгой границы между регуляторными белками и аллостерическими ферментами. Есть много данных, свидетельствующих о том, что в пути биосинтеза пуринов у дрожжей первый фермент на этапе превращения инозиновой кислоты (ИМФ) в аденозинмонофосфат (АМФ), аденилсукцинатсинтетаза, контролирует образование ранних ферментов пути биосинтеза ИМФ, т. е. является также репрессором. Однако наибольшее значение в регуляции транскрипции имеет сочетание ферментативных и регуляторных свойств у самого фермента транскрипции — ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

В клетках бактерий имеется только один тип РНК-полимеразы, осуществляющий матричный синтез всех видов РНК. Это крупный белок с молекулярной массой около 500 000 Д, имеющий сложную субъединичную структуру. Его ядро (core), которое также называют минимальным ферментом, построено из четырех полипептидов: двух идентичных  $\alpha$ -субъединиц,  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц. Полная РНК-полимераза содержит еще одну субъединицу, которую называют  $\sigma$  (сигма)-фактором.

Процесс синтеза РНК можно разделить на несколько стадий:

1. Связывание РНК-полимеразы с ДНК и активация матрицы, в результате чего фермент находит промоторы и осуществляет, по-видимому, локальное расплетение двойной спирали ДНК.
2. Начало синтеза, или инициация, которая заключается в образовании первой межнуклеотидной связи.
3. Рост цепи РНК, или элонгация, — синтез цепи РНК в

результате последовательного присоединения нуклеотидных звеньев.

4. Терминация — завершение синтеза цепи РНК и освобождение продукта и фермента из комплекса с матрицей.

Связывание РНК-полимеразы с ДНК может происходить и в отсутствие субстратов — нуклеозидтрифосфатов (НТФ). В определенных условиях фермент образует прочные комплексы с промоторными участками, расположенными в начале оперонов. В таком комплексе, по-видимому, происходит локальное раскручивание двойной спирали ДНК, в результате чего основания матрицы становятся доступными для комплементарного копирования. Поэтому такие комплексы получили название «открытых». Разные промоторы сильно различаются по скорости открывания, и этим определяется их эффективность: чем выше скорость открывания промоторов, тем больше молекул РНК с него синтезируется.

Узнавание промоторов возможно лишь при наличии в составе РНК-полимеразы сигма-фактора, белка с молекулярной массой 70 000 Д, который играет каталитическую роль в этом процессе. Поскольку сам сигма-фактор не связывается с ДНК, он действует, по-видимому, как аллостерический эффектор, изменяя конформацию минимального фермента, в результате чего он приобретает способность узнавать промоторы и связываться с ними. После инициации и присоединения нескольких нуклеотидов сигма-фактор отделяется от РНК-полимеразы.

Образовав открытый комплекс с ДНК, РНК-полимераза способна инициировать цепь РНК за счет соединения двух НТФ. При этом первый НТФ, которым обычно является АТФ или ГТФ (иногда ЦТФ), входит в состав цепи целиком, а второй присоединяется к 3'-гидроксилу первого с освобождением пирофосфата. Поскольку РНК-полимераза способна осуществить соединение двух НТФ, в ней должно быть по крайней мере два центра их связывания. Для максимальной скорости образования первой межнуклеотидной связи требуются более высокие концентрации иницирующих НТФ, чем НТФ, включающихся в цепь вторыми.

Прекращение синтеза РНК происходит в результате появления терминирующего сигнала, информация о котором записана в структуре ДНК (см. рис. 1). Предполагается, что РНК, синтезированная на концевых участках оперонов, способна образовать специфическую вторичную структуру — так называемую терминаторную шпильку, с участием которой происходит отсоединение РНК-полимеразы от матрицы.

У *E. coli* некоторые терминирующие сигналы узнаются РНК-полимеразой без помощи каких-либо дополнительных факторов. Остановка синтеза РНК в других случаях требует присутствия специального белкового фактора терминации Rho, который, видимо, взаимодействует непосредственно с РНК-полимеразой, повышая ее способность реагировать на терминирующий сигнал.

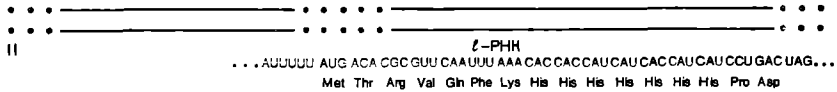
Регуляция транскрипции может осуществляться на разных стадиях и разными способами. Наиболее важны начальная и конеч-

ная стадии, поскольку изменение транскрипционной активности оперонов не сопровождается существенным изменением скорости синтеза цепей РНК. Критическим этапом для начала транскрипции является отрывание промоторов, поэтому естественно, что регуляторные белки, взаимодействующие с промоторной зоной, мешают или, наоборот, помогают РНК-полимеразе расплетать двойную спираль ДНК. Как уже было отмечено, эффективность этого процесса определяется структурой промоторов, а также зависит от свойств РНК-полимеразы, в частности от наличия в ней сигма-фактора. Следовательно, регуляция транскрипции на начальных ее этапах может осуществляться не только через взаимодействие регуляторных белков с ДНК, но и за счет их взаимодействия непосредственно с РНК-полимеразой. Кроме того, с ферментом транскрипции могут связываться, изменяя его свойства, и низкомолекулярные эффекторы.

Число обнаруживаемых у бактерий белковых и низкомолекулярных факторов, влияющих на эффективность транскрипции различных генов, постоянно увеличивается. Выявлено участие в регуляции активности РНК-полимеразы белковых факторов трансляции, формилметионил-тРНК и гуанозинтетрафосфата, которые обеспечивают сопряжение процессов синтеза РНК и белка, активируя или подавляя выражение определенных генов. Кроме основного сигма-фактора найдены дополнительные сигмасубъединицы, способные переключать транскрипцию с одних групп генов на другие, очевидно, за счет изменения узнающих свойств РНК-полимеразы.

По аналогии с регуляцией активности отдельных оперонов, роль сигналов, определяющих необходимость транскрипции новых групп или классов оперонов в зависимости от условий среды и фазы клеточного цикла, обычно выполняют специальные метаболиты. Они могут прямо взаимодействовать как аллостерические эффекторы с белковыми факторами транскрипции (а также с самой РНК-полимеразой) или же контролировать их синтез. Необходимость в такого рода переключении возникает при резком изменении условий среды (тепловой шок, дефицит источников углерода и азота, аминокислотное голодание), а также в процессе дифференцировки бактериальной клетки, например при спорообразовании.

Хорошо известно, что при недостатке питательных веществ или при накоплении в среде избытка продуктов обмена бактерии семейства *Bacillaceae* начинают образовывать эндоспоры. Этот сложный процесс протекает в несколько стадий. В его регуляцию вовлечены сотни генов бактерии, рассредоточенных по всей хромосоме и организованных в десятки оперонов. С началом споруляции активируется транскрипция значительной части хромосомы, которая была не активна при экспоненциальном росте клеток, и происходит подавление многих других, ранее активных генов. У *Bacillus subtilis* получены и исследованы разнообразные мутанты, процесс споруляции которых блокирован на той или



иной стадии. В результате установлено, что гены, участвующие в спорогенезе, объединены в группы оперонов («споруланы»), которые последовательно активируются и репрессированы на разных стадиях этого процесса, так что активация каждой группы генов необходима для включения последующего спорулана.

В регуляции процесса споруляции ключевую роль играет РНК-полимераза. Можно получить устойчивые к рифампицину мутанты *Bac. subtilis*, мутационное повреждение РНК-полимеразы у которых блокирует споруляцию на самых разных стадиях. Обнаружено также, что в процессе споруляции изменяется полипептидный состав этого фермента. На определенных стадиях вместо обычного сигма-фактора появляются новые субъединицы, которые, очевидно, являются сигмаподобными факторами, специфичными для споруляции. Они отсутствуют в составе РНК-полимеразы тех мутантов, у которых споруляция блокирована на предыдущих стадиях. Имеются также данные, что у мутантов по РНК-полимеразе, не способных к споруляции, фермент изменен таким образом, что эти сигмаподобные полипептиды не могут с ним связываться.

Механизмы, запускающие процесс споруляции, до конца не изучены. Возможно, что в этом принимают участие низкомолекулярные эффекторы, воздействующие непосредственно на РНК-полимеразу вегетативных клеток. В процессе спорообразования в клетках накапливаются необычные фосфорилированные нуклеотиды — аденозинтетра-, пента- и гексафосфаты. Они могут действовать подобно гуанозинтетрафосфату, который, как будет показано ниже, изменяет характер транскрипции многих генов. Установлено также, что специфические ингибиторы синтеза АМФ и ГМФ индуцируют споруляцию у *Bac. subtilis*. Внутриклеточная концентрация этих нуклеотидов, отражающая энергетическое состояние клетки, также может влиять на эффективность транскрипции разных оперонов.

Интенсивность транскрипции определенных структурных генов может зависеть от эффективности ее терминации и, в частности, от того, как часто РНК-полимераза прекращает синтез РНК, не дойдя до этих генов. Сравнительно недавно обнаружено, что во многих оперонах *E. coli*, контролируемых биосинтезом аминокислот, между промотором и первым структурным геном имеется терминирующая последовательность и в определенных условиях происходит образование терминирующего сигнала, ослабляющего интенсивность транскрипции (рис. 3). Это явление





1. Trp-оперон  
Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Trp Trp Arg Ser Thr

2. His-оперон  
Met Thr Arg Val Gln Phe Lys His His His His His His Pro Asp

3. Ile-оперон  
Met Thr Ala Leu Leu Arg Val Ile Ser Leu Val Val Ile Ser Val Val Val Ile Ile Ile Pro Pro Cys Gly Ala Ala Leu Gly Lys Ala

4. Phe-оперон  
Met Lys His Ile Pro Phe Phe Phe Ala Phe Phe Phe Thr Phe Pro

5. Thr-оперон  
Met Lys Arg Ile Ser Thr Thr Ile Thr Thr Thr Ile Thr Thr Gly Asn Gly Ala Gly

Рис. 4. Структура I-пептидов некоторых аминокислотных оперонов энтеробактерий. Подчеркнуты аминокислоты, регулирующие экспрессию соответствующих оперонов

зон этих оперонов позволили сформулировать гипотезу о механизме аттенуации. Эти исследования показали, что участок между промотором и первым структурным геном аминокислотных оперонов не только транскрибируется с образованием так называемой лидерной РНК (I-РНК), но, по-видимому, и транслируется в лидерный полипептид. При этом оказалось, что I-РНК обязательно содержит несколько кодонов тех аминокислот, синтез которых контролируется данным опероном. К примеру, в I-РНК триптофанового оперона содержится два расположенных один за другим кодона для триптофана, а в гистидиновом опероне в I-РНК имеется целый блок из семи кодонов для гистидина (рис. 3). Указанные кодоны находятся перед аттенуатором. Предполагается, что в сопряженных процессах транскрипции и трансляции дефицит соответствующих аминоацил-tРНК вызывает задержку рибосом на этих кодонах и тем самым препятствует образованию терминаторной шпильки. В этих условиях РНК-полимераза достигает структурных генов оперона, т. е. происходит деаттенуация. Когда же фонд аминоацил-tРНК в клетке высок, беспрепятственная трансляция образующейся I-РНК приводит к формированию терминатора и остановке транскрипции.

На рис. 4 показана структура I-пептидов некоторых аминокислотных оперонов энтеробактерий.

Следовательно, по мере снижения внутриклеточного фонда аминокислот собственный синтез будет стимулироваться в результате снятия ретроингибирования, депрессии и деаттенуации.

#### § 4. Аминокислотный контроль метаболизма и функции гуанозинтетрафосфата

Состав микробных клеток обнаруживает закономерные колебания в зависимости от скорости роста культуры. Когда бактериальная культура, растущая на одной среде, переносится в другую среду, обеспечивающую более быстрый рост, скорость обра-

зования РНК в клетках увеличивается уже через минуту и в течение последующего периода адаптации может даже превысить конечный уровень, который устанавливается затем на новой среде. Скорость синтеза белка увеличивается только после того, как повысится содержание рибосом в цитоплазме, т. е. синтезируется достаточное количество рибосомальной РНК (рРНК). С другой стороны, при переносе клеток с полноценной среды на минимальную или при лишении их какой-либо необходимой аминокислоты одновременно с замедлением скорости роста наблюдается резкое и преимущественное уменьшение синтеза стабильных типов РНК (рРНК и тРНК — транспортных РНК).

Механизм, координирующий процессы синтеза белка и нуклеиновых кислот, известен под наименованием *строгого аминокислотного контроля синтеза РНК*. У *E. coli* этот механизм зависит от функции гена *relA*.

У штаммов дикого типа,  $Rel^+$  (т. е. со строгим аминокислотным контролем синтеза РНК), лишение клеток необходимой им аминокислоты быстро останавливает не только синтез белка, но и дальнейшее образование РНК. Оказалось, что решающее значение имеет отсутствие в клетках полного комплекта аминоацил-тРНК, т. е. активированных аминокислот. Так, синтез РНК прекращается, например, при тепловой инактивации мутантных температурочувствительных аминоацил-тРНК-синтетаз. У мутантов  $Rel^-$  (так называемых штаммов с «ослабленным аминокислотным контролем синтеза РНК») в аналогичных условиях образование РНК продолжается еще некоторое время после остановки синтеза белка.

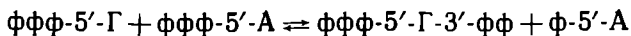
При аминокислотном голодании штаммов дикого типа кроме синтеза РНК подавляются также дыхание, образование некоторых продуктов гликолиза, синтез нуклеотидов и липидов, ингибируется включение различных экзогенных метаболитов, стимулируется протеолиз. Поскольку прямая блокада РНК-полимеразной реакции не приводит к такому множественному изменению метаболизма, это изменение, очевидно, не является следствием подавления синтеза РНК.

Было обнаружено (M. Cashel, J. Gallant, 1969), что в клетках штамма *E. coli* дикого типа ( $Rel^+$ ) в отсутствие необходимой аминокислоты образуется два фосфорилированных соединения, которые в дальнейшем были идентифицированы как гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфат (ффГфф) и гуанозин-5'-трифосфат-3'-дифосфат (фффГфф). В тех же условиях в клетках мутантов  $RelA^-$  накопления этих гуанозинполифосфатов не происходит. В связи с этим было высказано предположение, что указанные соединения являются теми внутриклеточными компонентами, от которых зависит перестройка метаболизма клеток *E. coli* («строгий контроль») в условиях аминокислотного голодания.

В течение последующих лет были получены многочисленные данные, подтверждающие предположение о регуляторной роли одного из нуклеотидов — фффГфф (гуанозинтетрафосфата) —

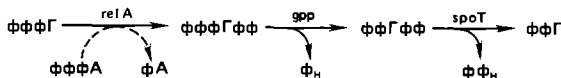
не только в транскрипции генов рРНК, но и в совокупности изменений, характерных для строгого контроля.

Основной путь образования ффГфф в клетках *E. coli* связан с функционированием рибосом. Когда в акцепторный участок (А-участок) рибосомы, транслирующей мРНК, попадает неацилированная тРНК, антикодон которой комплементарен кодону матрицы, это активирует связанный с рибосомой белковый фактор — фактор строгого контроля — продукт гена *relA*. Фактор строгого контроля представляет собой пирофосфаттрансферазу, которая катализирует перенос пирофосфорильной группы АТФ в 3'-ОН группу рибозы ГТФ согласно реакции



Таким образом, в клетке обычно сначала синтезируется фффГфф, из которого путем гидролиза образуется ффГфф.

Схема превращений фффГфф и ффГфф у *E. coli* выглядит следующим образом:



Ген *gpp* определяет синтез 5'-нуклеотидазы, специфически гидролизующей фффГфф до ффГфф. Клетки мутанта *Gpp<sup>-</sup>* накапливают при дефиците аминоксил-тРНК приблизительно равные количества обоих гуанозинполифосфатов. Это связано с тем, что помимо гена *gpp* в деградации фффГфф принимает участие ген *spoT*: при сочетании мутаций *gpp* и *spoT* стабильность фффГфф возрастает вдвое по сравнению с одиночной *gpp*-мутацией.

Гидролиз фффГфф катализирует продукт гена *spoT* — 3'-пирофосфатгидролаза. Этот белок, по-видимому, также связан с рибосомами. Интересно, что неацилированные тРНК подавляют его активность, т. е. в голодающих по аминокислотам клетках не только стимулируется синтез ффГфф, но и прекращается его деградация.

Установлено также, что стабильность ффГфф повышается при углеродном и азотном голодании, причем в этих условиях накопление нуклеотида происходит даже в клетках мутантов *RelA<sup>-</sup>*.

Вероятно, кроме синтеза на рибосомах, связанного с дефицитом аминоксил-тРНК, в клетках бактерий имеется еще один путь образования гуанозинтетрафосфата. Так, увеличение внутриклеточной концентрации ффГфф у *E. coli* наблюдается при частичном или полном дефиците источников энергии (при исчерпании глюкозы, замене ее на медленнее ассимилируемый субстрат или при внесении в среду α-метилглюкозида — неметаболизируемого аналога глюкозы). И в этих случаях гуанозинтетрафосфат накапливается в клетках как *Rel<sup>+</sup>*, так и *Rel<sup>-</sup>*-штаммов независимо от содержания неацилированных тРНК. Это ставит под сомнение их роль как единственного сигнала, активирующего синтез ффГфф.

Действительно, в клетках у *Bac. brevis*, *Bac. stearothermophilus* и у некоторых актиномицетов удалось обнаружить фактор, обеспечивающий синтез ффГфф независимо от рибосом. Подобно фактору строгого контроля из *E. coli*, он катализирует

перенос пироглосфата с АТФ на ГТФ. Причём у *Bac. stearotherophilus* этот рибосомонезависимый фактор присутствует в клетках наряду с рибосомозависимым.

Пока неизвестно, что служит сигналом для активации рибосомонезависимого фермента. Однако, поскольку АТФ в высокой концентрации ингибирует его активность, не исключено, что снижение уровня АТФ, которое происходит в условиях, подавляющих клеточную энергетику, играет роль пускового механизма.

Не ясно также, какой фермент у *E. coli* обеспечивает подъем уровня ффГфф при недостатке источников энергии. Возможно, что это продукт гена *gelX*. Мутанты по этому гену отличаются чрезвычайно низким базальным уровнем гуанозинтетрафосфата. К тому же они не способны отвечать увеличением концентрации этого нуклеотида на перенос из среды с глюкозой в среду с сукцинатом. Поэтому можно думать, что в условиях энергетического голода именно продукт гена *gelX* участвует в синтезе ффГфф у *RelA*<sup>-</sup>-мутантов *E. coli*.

Имеются многочисленные данные о том, что при дефиците источника энергии подавляется деградация гуанозинтетрафосфата. Оказалось, что реакция, катализируемая продуктом гена *srcT*, энергозависима — она активируется АТФ, причём для активации необходим гидролиз АТФ. Замедление распада ффГфф можно вызвать разобшителем окислительного фосфорилирования — 2,4-динитрофенолом и ингибиторами транспорта электронов — цианидами и азидами.

Дополнительные опыты показали, что для активации 3'-пироглосфатгидролазы необходим не сам АТФ, а поддерживаемый с его участием мембранный потенциал. Распад ффГфф тормозят любые агенты, снижающие мембранный потенциал, даже если при этом не затрагивается уровень АТФ. Механизм влияния трансмембранного потенциала на деградацию гуанозинтетрафосфата неизвестен. Однако в связи с энергозависимостью этого процесса становится понятным его замедление как при недостатке глюкозы в среде, так и при дефиците серина, который участвует в углеводном обмене бактерий.

Накопление гуанозинтетрафосфата у фотосинтезирующей бактерии *Rhodospseudomonas spheroides* и цианобактерии *Anacystis nidulans* при переносе их со света в темноту, по-видимому, также связано с подавлением его деградации.

Таким образом, увеличение концентрации ффГфф в клетках бактерий вызывается как ускорением его синтеза, так и замедлением его распада.

**Одна из основных функций ффГфф состоит в регуляции транскрипции бактериального генома.** Этот нуклеотид связывается с РНК-полимеразой и изменяет ее сродство к промоторам различных генов. В результате выражение одних генов уменьшается, а других — усиливается, соответственно контроль выражения этих генов оказывается негативным или позитивным.

Прекращение синтеза рРНК при дефиците необходимых аминокислот было первым из известных в настоящее время проявлений строгого контроля клеточного метаболизма. На основании корреляции между синтезом рРНК и внутриклеточной концентрацией ффГфф М. Кейшел и Дж. Голлант предположили, что гуанозинтетрафосфат является негативным регулятором транскрипции генов рРНК. Это предположение подтверждается ре-

зультатами, полученными при изучении влияния ффГфф на синтез рРНК *in vitro*. В этих экспериментах показано, что ффГфф подавляет инициацию транскрипции рРНК, не допуская образования первой межнуклеотидной связи.

Биологический смысл подавления синтеза рРНК при дефиците аминоацил-тРНК стал понятен, когда выяснилось, что синтез тРНК, рибосомных белков и факторов элонгации трансляции также находится под строгим контролем. В частности, при дефиците аминоацил-тРНК дифференциальная скорость синтеза рибосомных белков резко уменьшается в RelA<sup>+</sup>-клетках, но остается практически неизменной в RelA<sup>-</sup>-клетках. Было установлено, что специфическое подавление синтеза рибосомных белков является результатом понижения транскрипции соответствующих генов, которое обусловлено накоплением гуанозинтетрафосфата.

Таким образом, при дефиците аминоацил-тРНК рибосомы клеток *E. coli* вместо синтеза белка вовлекаются в интенсивный синтез ффГфф. Этот нуклеотид регулирует образование компонентов белоксинтезирующего аппарата в соответствии с наличием субстрата — аминоацил-тРНК.

При переносе клеток *E. coli* с бульона на минимальную среду рост RelA<sup>-</sup>-мутантов возобновляется значительно позже, чем рост RelA<sup>+</sup>-клеток. Замедленная адаптация RelA<sup>-</sup>-штаммов наблюдается также после замены среды, обогащенной всеми 20 аминокислотами, на среду без аминокислот. Эти факты указывают на то, что мутация в гене *relA* нарушает способность клеток активировать выражение оперонов биосинтеза аминокислот и увеличивать синтез соответствующих ферментов, необходимых для роста в новых условиях. Действительно, при переносе клеток RelA<sup>-</sup> с богатых сред на минимальные в них практически не возрастает активность триптофансинтетазы, гистидинолфосфатфосфатазы, гомосериндегидрогеназы, треониндезаминазы и других ферментов биосинтеза аминокислот, что, очевидно, является причиной задержки роста.

В опытах *in vitro* было установлено, что ффГфф стимулирует выражение триптофанового, гистидинового, изолейцин-валинового, треонинового и других аминокислотных оперонов. Причем в ряде случаев показано, что этот нуклеотид активирует транскрипцию, но не влияет на трансляцию мРНК. Таким образом, ффГфф следует рассматривать в качестве позитивного регулятора выражения аминокислотных оперонов (J. Stephens и др., 1975).

От внутриклеточного содержания гуанозинтетрафосфата зависит не только новообразование, но и активность ферментных систем. Показано, что ффГфф угнетает ИМФ-дегидрогеназу и аденилсукцинатсинтетазу — первые ферменты путей биосинтеза нуклеотидов гуанина и аденина из общего предшественника — инозинмонофосфата. Кроме того, ффГфф подавляет активность фосфорибозилтрансферазы, которые осуществляют перенос азотистых оснований внутрь клетки сопряженно с их фосфорибо-

зилированием. Вероятно, все это способствует уменьшению концентрации НТФ в клетках, что целесообразно в условиях подавления синтеза рРНК.

Под негативным контролем гуанозинтетрафосфата находится синтез важнейших компонентов клеточной мембраны и клеточной стенки: фосфолипидов, липополисахаридов и пептидогликана. В ряде случаев прямо показано, что ффГфф подавляет активность соответствующих ферментов.

Изменение структуры клеточной стенки и клеточных мембран может, в свою очередь, влиять на функционирование целого ряда транспортных систем и протекание других процессов, которые сами по себе могут быть не чувствительны к ффГфф. Существует целый ряд данных, свидетельствующих о том, что во время дефицита аминоксил-тРНК изменяется способность одних соединений проникать внутрь клеток, а других — выходить наружу. Так,  $RelA^-$ -клетки в этих условиях начинают выделять в среду глутаминовую кислоту, но зато более эффективно, чем клетки штамма дикого типа, транспортируют внутрь аналог глюкозы  $\alpha$ -метил-глюкозид, полиамины спермидин и путресцин, а также антибиотик стрептомицин. С этим последним обстоятельством связан тот факт, что при аминокислотном голодании  $RelA^-$ -клетки более чувствительны к летальному действию этого антибиотика, чем  $RelA^+$ -клетки.

**Важной особенностью метаболизма бактерий при дефиците аминокислот является изменение скорости распада клеточных белков.** У штаммов *E. coli* дикого типа ( $RelA^+$ ) скорость протеолиза в этих условиях коррелирует с содержанием ффГфф в клетках и снижается одновременно с уменьшением концентрации гуанозинтетрафосфата. В  $RelA^-$ -клетках скорость протеолиза не меняется.

При нарушении энергетического метаболизма, когда гуанозинтетрафосфат накапливается независимо от аллельного состояния гена *relA*, протеолиз ускоряется как в  $RelA^+$ -, так и в  $RelA^-$ -клетках. Действие ффГфф, по-видимому, связано с тем, что он активирует определенные протеолитические системы.

Таким образом, под влиянием гуанозинтетрафосфата происходит координированное изменение клеточного метаболизма, которое имеет приспособительный характер.

Успехи в изучении метаболизма и функции ффГфф у *E. coli* стимулировали поиски аналогичных соединений у других организмов. У подавляющего большинства прокариот — представителей семейства *Bacillaceae*, *Rhizobiaceae*, энтеробактерий, цианобактерий, фототрофных бактерий, стебельковых бактерий, миксобактерий и актиномицетов (в том числе у продуцентов антибиотиков — *Streptomyces griseus*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galilaeus*) обнаружены ффГфф и ффГфф, а у некоторых из них и аденозинполифосфаты (ффФАфф и ффАфф). Правда, не у всех прокариот накопление гуанозинполифосфатов наблюдается в тех же условиях, что у *E. coli*. Например, у диморфной бактерии *Caulobacter crescentus* оно отмечено лишь при дефиците источников азота в целом и не наблюдается при нехватке одной из незаменимых аминокислот. Интересно, что у миксобактерий и у *Bac. subtilis* подъем уровня гуанозинполифосфатов служит обязательным условием последующей споруляции. А у некоторых актиномицетов

нуклеозидполифосфаты, по-видимому, участвуют в запуске синтеза антибиотиков. Однако при всем разнообразии конкретных функций этих соединений у представителей разных групп прокариот их существенная роль в адаптации организмов к неблагоприятным условиям среды не вызывает сомнений.

В клетках низших эукариот также обнаружены нуклеозидполифосфаты у *Saccharomyces cerevisiae* ффГфф, а также аденозинполифосфаты накапливаются при тепловом шоке (см. ниже) и непосредственно перед началом спорообразования.

У некоторых видов грибов найдены необычные фосфорилированные динуклеотиды, содержащие два гуанозиновых остатка, ГфффГ и ГффффГ, которые накапливаются в период вегетативного роста и выделяются в среду непосредственно перед началом споруляции. Эти дигуанозинполифосфаты оказались эффективными ДНК-зависимых РНК-полимераз I, II и III, которые осуществляют у грибов транскрипцию разных классов генов.

В процессе селекции и конструирования штаммов — продуцентов биологически активных соединений — необходимо учитывать роль гуанозинполифосфатов в регуляции метаболизма. Стимулирующее действие ффГфф на экспрессию аминокислотных оперонов проявляется в позитивном влиянии дикого аллеля гена *relA* на сверхсинтез аминокислот, в частности треонина у *E. coli* (М. М. Гусятинер и др., 1978). В некоторых случаях дополнительный эффект в том же направлении оказывает мутация *spoT*. С другой стороны, можно ожидать, что пуриновые нуклеотиды и их производные, синтез которых подавляется гуанозинтетрафосфатом, будут более эффективно продуцироваться мутантами  $RelA^-$

При получении штаммов — продуцентов чужеродных белков — большое значение имеет подавление протеолиза (см. гл. 3), который стимулируется ффГфф. Поэтому генетические факторы и физиологические условия, ограничивающие накопление этого нуклеотида, будут стабилизировать чужеродные полипептиды и повышать их выход.

Многие биологически активные вещества, которые относятся к числу так называемых вторичных метаболитов, образуются при истощении основных питательных компонентов среды, т. е. в условиях, повышающих концентрацию в клетках нуклеозидполифосфатов. Поэтому детальное изучение механизма действия этих соединений и генетического контроля их биосинтеза и распада представляет большой интерес для селекции соответствующих продуцентов.

## **§ 5. Катаболическая репрессия и циклический 3', 5'-аденозинмонофосфат**

В природных условиях в среде одновременно может находиться несколько субстратов, которые микробная клетка способна усваивать в качестве источников углерода и энергии. Это однако не приводит к синтезу всех ферментов, необходимых для их катаболизма. Сначала образуются ферменты, обеспечивающие утилизацию наилучшего субстрата, который поддерживает наиболее высокую скорость роста. Для многих микроорганизмов



таким субстратом является глюкоза, и в клетке имеются специальные механизмы, направленные на первоочередное ее усвоение. Глюкоза может влиять на утилизацию других субстратов, вызывая у микроорганизмов катаболитную репрессию, транзистентную репрессию, исключение индуктора и катаболитное ингибирование.

Термин *катаболитная репрессия*, предложенный Б. Магасаником, используется для обозначения явления, которое долгое время называлось «глюкозным эффектом» и которое было обнаружено еще в начале века. Оно заключается в том, что глюкоза или другие быстро ассимилируемые субстраты вызывают более или менее сильную, но постоянную репрессию катаболических ферментов. Магасаник постулировал, что катаболиты, образующиеся из глюкозы, накапливаются в клетках и подавляют синтез ферментов, активность которых могла бы увеличить и без того уже большой внутриклеточный пул этих соединений.

*Транзистентная репрессия* проявляется в том, что при добавлении глюкозы к культуре бактерий, растущей на источнике углерода и энергии, который ассимилируется медленнее глюкозы, происходит резкое подавление синтеза соответствующего катаболического фермента. Это подавление длится короткое время (до одной клеточной генерации), затем синтез фермента возобновляется с низкой скоростью, характерной для роста в присутствии глюкозы. Важной особенностью транзистентной репрессии является то, что она может быть вызвана неметаболизируемыми аналогами глюкозы.

*Исключением индуктора* называют явление, которое состоит в том, что глюкоза препятствует поступлению субстрата-индуктора в клетку.

Наконец, *катаболитное ингибирование* — это подавление активности некоторых ферментов быстро образующимися продуктами катаболизма.

Катаболитной репрессией и исключением индуктора обусловлена диауксия — двухфазный рост бактерий в среде, содержащей в качестве источника углерода и энергии какую-либо пару соединений, например глюкозу и лактозу. В этих условиях сначала усваивается глюкоза, обеспечивающая более высокую скорость роста, и после ее исчерпания начинает использоваться лактоза.

При исследовании природы катаболитной репрессии было показано, что у *E. coli* глюкоза подавляет синтез  $\beta$ -галактозидазы и галактозидпермеазы на уровне транскрипции *lac*-оперона. В связи с этим предполагалось, что действие катаболитов опосредовано белковым фактором, который напоминает репрессор и угнетает транскрипцию всех так называемых катаболит-чувствительных генов (оперонов). Однако многочисленные попытки идентифицировать катаболит или катаболиты-эффекторы катаболитной репрессии долгое время оставались безуспешными.

В 1965 г. было обнаружено, что добавление глюкозы к клеткам *E. coli* приводит к быстрому снижению внутриклеточной кон-

центрации циклического 3',5'-аденозинмонофосфата (цАМФ) и накоплению его в среде роста. После удаления глюкозы содержание цАМФ в клетках восстанавливается. Эти эксперименты проводились на нерастущих клетках. Позднее было показано, что в растущих клетках глюкоза вызывает не экскрецию цАМФ в среду, а подавление его синтеза. Можно было предположить, что снижение уровня цАМФ и вызывает кatabолическую репрессию. Такое предположение стало еще более обоснованным, когда выяснилось, что репрессирующее действие глюкозы на синтез ферментов можно частично снять добавлением экзогенного цАМФ.

Синтез цАМФ катализирует фермент аденилатциклаза согласно реакции



Если образование целого ряда индуцибельных ферментов зависит от этого нуклеотида, то мутанты по аденилатциклазе не смогут усваивать источники углевода и энергии, кatabолизм которых обеспечивается соответствующими ферментами. Действительно, были выделены мутанты, не способные одновременно ферментировать лактозу, мальтозу, арабинозу, маннит, сорбит и другие соединения. Оказалось, что существует два класса такого рода мутантов. У одних под влиянием экзогенного цАМФ усвоение всех перечисленных сахаров восстанавливалось, у других этот нуклеотид не вызывал никакого действия. У мутантов первого класса (Суа) резко снижена активность аденилатциклазы. Мутанты второго класса (Сгр) синтезировали цАМФ в избыточном количестве, однако у них отсутствовал или был поврежден белковый фактор, который взаимодействует с цАМФ и необходим для активации этим нуклеотидом синтеза кatabолических ферментов. Этот белок был назван БАК — белок-активатор кatabолических генов (английское сокращение CAP — catabolite gene activator protein); другое название — белок-рецептор цАМФ (английское сокращение CRP — cyclic AMP receptor protein).

Можно получить мутации в промоторе lac-оперона, которые снижают чувствительность оперона к кatabолической репрессии, а также к стимулирующему действию цАМФ. В связи с этим возникло предположение, что цАМФ и БАК действуют на уровне промоторов соответствующих генов. Сам по себе БАК с низкой эффективностью и неспецифически связывается с ДНК. Добавление цАМФ приводит к повышению сродства БАК к ДНК и преимущественному связыванию его с промоторами. Таким образом, цАМФ выступает в роли аллостерического эффектора этого регуляторного белка.

БАК, активированный цАМФ, связывается на участке промотора lac-оперона перед РНК-полимеразой, по-видимому, контактирует с ней и обеспечивает образование открытого комплекса, необходимого для инициации транскрипции. При этом репрессия оперона многократно стимулируется.

Однако указанный механизм действия комплекса цАМФ—БАК не является единственным и наиболее распространенным в регуляции экспрессии катаболических оперонов даже у *E. coli*. Усвоение арабинозы клетками *E. coli*, как уже отмечалось, связано с активацией транскрипции ага-оперона продуктом регуляторного гена агаС и сильно зависит от присутствия неповрежденных генов суа и сгр. Оказалось, что комплекс цАМФ—БАК стимулирует выражение самого гена агаС, по-видимому, связываясь на промоторном участке этого гена непосредственно с РНК-полимеразой. Влияние же цАМФ—БАК на экспрессию ага-оперона осуществляется через взаимодействие этого комплекса с продуктом гена агаС. Известны мутации в гене агаС, которые делают белок АгаС не зависимым от цАМФ—БАК. Соответствующие мутанты способны усваивать арабинозу, даже если у них повреждены гены суа и сгр. Следовательно, в норме белок АгаС активируется индуктором (арабинозой) и комплексом цАМФ—БАК.

Сходная ситуация наблюдается в системе усвоения мальтозы клетками *E. coli* — mal-регулоне. mal-Регулон состоит из трех оперонов: malPQ, malKlamV и malEFG, — которые позитивно регулируются продуктом гена malT. Глюкоза в разной степени подавляет выражение каждого из этих оперонов. По-видимому, основное действие глюкозы связано с тем, что она ингибирует поступление мальтозы в клетку или же активирует выброс ее из клетки (исключение индуктора).

Кроме того, имеет значение снижение внутриклеточной концентрации цАМФ. Комплекс цАМФ—БАК влияет на экспрессию гена malT и, по-видимому, активирует MalT-белок. Можно получить мутации, увеличивающие экспрессию malT-гена, в результате которых эффективное выражение одного из оперонов — malPQ — становится возможным в клетках Суа<sup>-</sup> или Сгр<sup>-</sup>.

Таким образом, в системах с позитивной регуляцией отсутствие комплекса цАМФ—БАК может быть компенсировано мутациями, модифицирующими регуляторный белок или повышающими его содержание в клетке.

Характерной особенностью экспрессии генов у бактерий является феномен полярности, т. е. пониженной транскрипции генов, дистальных к промотору. В некоторых оперонах количество продуктов дистальных генов может составить всего 1—2% от количества продуктов проксимальных генов. Это снижение транскрипции вызывает rho-фактор. Оказалось, что комплекс цАМФ—БАК проявляет антитерминирующее действие: Показано, что степень естественной полярности в присутствии этого комплекса значительно снижается. Следовательно, роль комплекса цАМФ—БАК в активации экспрессии оперонов заключается не только в стимуляции инициации транскрипции, но и в противодействии терминции транскрипции. Например, основной эффект глюкозы на экспрессию gal-оперона связан с исключением индуктора, а действие цАМФ—БАК заключается в стимуляции экспрессии генов, дистальных к промотору (A. Ullman, D. Danchin, 1980).

Активируя выражение одних оперонов, комплекс цАМФ—БАК подавляет экспрессию других. Это показано, в частности, для гена суа, который, следовательно, подвержен негативной ауторегуляции, а также для гена отpA, кодирующего белок наружной клеточной мембраны.

Комплекс цАМФ—БАК влияет на синтез компонентов клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. С этим связано изменение состава белков наружной мембраны и морфологии клеток, нарушение образования жгутиков, ворсинок, фаговых рецепторов у мутантов Суа и Сгр. Это, в свою очередь, сказыва-

ется на процессе клеточного деления, повышает чувствительность клеток к детергентам и понижает чувствительность к антибиотикам и некоторым другим соединениям, а также к фаговой инфекции. Изменяя цитоплазматическую мембрану, цАМФ и БАК влияют на синтез и функционирование связанных с ней белков, таких, как АТФ-аза, цитохромы, ферменты ЦТК и др.

Следует отметить, что, хотя цАМФ обнаружен в клетках большинства исследованных прокариотических и эукариотических микроорганизмов, он не всегда имеет отношение к катаболитной репрессии. У некоторых бактерий, жизненный цикл которых характеризуется чередованием стадий с различной морфологией клеток, например у *Arthrobacter crystallopoeticus* и *Mycococcus xantus*, цАМФ играет какую-то роль в морфогенезе. В ряде случаев, например у псевдомонад, его функции пока не известны.

Внутриклеточная концентрация цАМФ может регулироваться тремя способами: нуклеотид может экскретироваться из клетки в среду; может разрушаться с помощью фермента цАМФ-фосфодиэстеразы; наконец, скорость его синтеза может контролироваться подавлением (или стимуляцией) активности аденилатциклазы или изменением содержания этого фермента в клетке.

Экскреция цАМФ является энергозависимым процессом и, как уже отмечалось, стимулируется легко усвояемыми углеводами. Очевидно, этот процесс имеет некоторое значение в проявлении катаболитной репрессии.

Роль цАМФ-фосфодиэстеразы до конца не выяснена. Хотя клетки *E. coli* и *Salmonella typhimurium*, дефектные по этому ферменту, содержат больше цАМФ (или накапливают его больше в культуральной жидкости), нет никаких данных, что различные источники углерода и энергии как-то влияют на эффективность деградации этого нуклеотида.

Синтез цАМФ аденилаткиназой связан с функционированием фосфоенолпируватзависимой фосфотрансферазой системы транспорта углеводов (ФТС). Эта система обеспечивает транспорт внутрь клетки и одновременное фосфорилирование ряда углеводов (ФТС-углеводов). Кроме того, она участвует в регуляции синтеза и активности ряда транспортных систем, с помощью которых осуществляется поступление в клетку субстратов, отличных от ФТС-углеводов, а также аденилаткиназы. Центральная роль в этой регуляции принадлежит белковому фактору  $\text{III}^{\text{ГЛК}}$ , который совместно с мембранным белком  $\text{II}^{\text{ГЛК}}$  участвует в транспорте глюкозы и  $\alpha$ -метилглюкозида с помощью ФТС (M. Saier et al., 1983). Фактор  $\text{III}^{\text{ГЛК}}$  может существовать в двух формах: фосфорилированной и нефосфорилированной. Фосфорилирование фактора  $\text{III}^{\text{ГЛК}}$  фосфоенолпируватом (ФЕП) катализируется двумя белками ФТС: ферментом I и белком НРг, которые также участвуют в фосфорилировании всех ФТС-углеводов. В нефосфорилированной форме фактор  $\text{III}^{\text{ГЛК}}$  является ингибитором транспортных систем других углеводов, в том числе мальтозы, лактозы, мелибиозы и глицерина. Показано, что он может непосред-

ственно взаимодействовать с соответствующими пермеазами и подавлять их активность. Фосфорилированная форма фактора  $\text{III}^{\text{Г.лк}}$ , фосфо- $\text{III}^{\text{Г.лк}}$ , активирует аденилаткиназу. Следовательно, когда в клетках низкий уровень фосфо- $\text{III}^{\text{Г.лк}}$  (например, при наличии в среде ФТС-углеводов), внутриклеточная концентрация цАМФ низкая и транспорт других субстратов (индукторов) будет подавлен. Именно благодаря этому механизму и происходит предпочтительное усвоение ФТС-углеводов и, в частности, глюкозы. Таким образом, компонент ФТС — многофункциональный белок  $\text{III}^{\text{Г.лк}}$  — прямо участвует в исключении индуктора и катаболитной репрессии.

Однако в клетке существуют и другие факторы, влияющие на активность аденилаткиназы. Так, в анаэробных условиях факультативно-анаэробные бактерии теряют чувствительность к катаболитной репрессии и при этом увеличивается скорость синтеза цАМФ. Известно, что переход к анаэробнозю связан с понижением эффективности образования АТФ. Фактически и при других условиях роста концентрация цАМФ в клетках изменяется в обратной зависимости от количества АТФ, т. е. катаболитная репрессия связана с энергетическим состоянием клетки. Поэтому возможно, что в регуляции синтеза и активности аденилаткиназы участвуют адениннуклеотиды.

Предполагается также, что активность этого фермента зависит от трансмембранного электрохимического потенциала ионов водорода ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ). Именно поэтому в анаэробных условиях или в присутствии разобщителей окислительного фосфорилирования, когда этот потенциал снижается, бактерии теряют чувствительность к катаболитной репрессии (Г Бурд и др., 1983).

В последние годы центральная роль цАМФ в явлении катаболитной репрессии ставится под сомнение (А. Ullman et al., 1983). Например, у делеционных мутантов *S. ty*, не способных к образованию цАМФ, несущих мутацию в гене *сgr*, которая активирует БАК независимо от цАМФ, глюкоза подавляет синтез  $\beta$ -галактозидазы. Это подавление также прекращается в анаэробных условиях. Следовательно, кроме цАМФ в клетке существуют и другие эффекторы катаболитной репрессии. С другой стороны, этот результат показывает, что энергетическое состояние клетки может регулировать катаболитную репрессию независимо от цАМФ.

Не обязательным для проявления репрессии оказался и БАК. Так, у двойных мутантов *E. coli*, дефектных по БАК и фактору терминации транскрипции  $\text{Rho}$ , которые в связи с мутацией в гене *сgr* не способны катаболизировать многие субстраты, можно получить псевдоревертанты. Их появление связано с мутацией в гене *groB*, кодирующем  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы. У таких тройных мутантов синтез катаболитических ферментов восстанавливается, но они по-прежнему подвержены катаболитной репрессии. Очевидно, комплекс цАМФ — БАК не является единственным регулятором активности катаболитических оперонов.

Следует отметить, что вышеописанные псевдоревертанты не возникали в клетках  $\text{Rho}^+$ . По-видимому, фактор терминации транскрипции как-то участвует в регуляции катаболитических оперонов. Это согласуется с представлением о том, что действие комплекса цАМФ — БАК связано с его влиянием на терминацию транскрипции.

Наконец, необходимо подчеркнуть, что катаболитная репрессия наблюдается у некоторых микроорганизмов, например у *Vac. megaterium*, в клетках которых цАМФ не синтезируется. С другой стороны, у облигатных аэробов, таких,

как *Pseudomonas aeruginosa*, предпочтительно использующих в качестве источников углерода и энергии органические кислоты, описана катаболитная репрессия этими соединениями, которая, однако, никак не связана с цАМФ.

Все эти факты заставили исследователей осуществить новый поиск эффектов катаболитной репрессии.

А. Ульман с соавторами (А. Ullman et al., 1976) выделили из водных экстрактов клеток *E. coli*, выращенных в присутствии глюкозы, фактор, который они назвали *катаболитным модулятором* (catabolite modulator factor, CMF). Это низкомолекулярное соединение, устойчивое к нагреванию и действию кислот и щелочей, природа которого остается пока неизвестной. Катаболитный модулятор эффективно подавляет синтез катаболических ферментов, причем цАМФ только частично снимает это подавление.

В связи с этим авторы вновь возвращаются к идее о том, что катаболитная репрессия связана с негативной регуляцией активности катаболических оперонов и опосредована специфическим метаболитом (или классом специфических метаболитов), накапливаемым в клетках в условиях, ведущих к развитию катаболитной репрессии. Этот метаболит-посредник действует на уровне инициации транскрипции и подавляет выражение катаболических оперонов. Комплекс цАМФ — БАК, связываясь с РНК-полимеразой, препятствует его действию и тем самым повышает эффективность транскрипции. Таким образом, проявление катаболитной репрессии будет зависеть как от концентрации метаболита-посредника, так и от содержания в клетке цАМФ.

Предполагается также, что этот посредник подавляет аденилаткиназу. Поэтому катаболитная репрессия — это не следствие низкой концентрации цАМФ, а скорее низкая концентрация цАМФ есть результат катаболитной репрессии.

Таким образом, вопрос о механизмах катаболитной репрессии нельзя считать окончательно решенным.

Явление катаболитной репрессии играет важную роль в промышленной микробиологии. Синтез многих ферментов и антибиотиков подвержен репрессии легко усваиваемыми субстратами. Поэтому получение мутаций, сообщаящих клеткам устойчивость к катаболитной репрессии, имеет большое практическое значение. Новые возможности открывает генетическая инженерия, которая в принципе позволяет заменять регуляторные области катаболических оперонов на эффективные промоторы, нечувствительные к катаболитной репрессии.

## § 6. Регуляция усвоения азотсодержащих соединений

Микроорганизмы используют в качестве единственного источника азота аммиак (точнее, ионы аммония  $\text{NH}_4^+$ ) или различные азотсодержащие соединения. Диапазон таких соединений чрезвычайно широк. В некоторых случаях даже один и тот же вид, например *Klebsiella pneumoniae*, может усваивать как атмосферный азот  $\text{N}_2$ , так и сложные органические молекулы, такие, как гистидин, пролин, аргинин. В результате ферментативных реакций из этих соединений образуется аммиак, который сам по себе используется предпочтительно. Способность к усвоению того или иного субстрата в качестве источника азота зависит от вида микроорганизма.

Ключевыми соединениями в биосинтезе азотсодержащих веществ являются глутамин, глутамат и аспартат. Глутамат и аспартат — родоначальники двух семейств аминокислот, а также

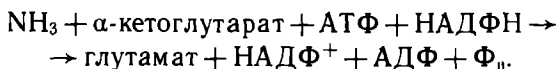
доноры аминокрупп во многих реакциях. Во всех других случаях донором азота в клетке служит глутамин.

Глутамин, глутамат и аспаргат могут превращаться друг в друга в результате следующих реакций:

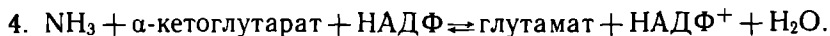
1. Глутамат +  $\text{NH}_3$  + АТФ  $\rightarrow$  глутамин + АДФ +  $\Phi_{\text{H}}$ .
2. Глутамин +  $\alpha$ -кетоглутарат + НАДФН  $\rightarrow$  2 глутамат + НАДФ $^+$
3. Глутамат + оксалоацетат  $\rightleftharpoons$  аспаргат +  $\alpha$ -кетоглутарат.

Ферменты, катализирующие эти реакции, обнаружены у всех микроорганизмов, способных усваивать аммиак в качестве единственного источника азота.

В результате реакции 1, катализируемой глутаминсинтетазой (ГС), аммиак включается в амидную группу глутамина, т. е. переводится в органическую форму. Дальнейшее его использование в клетке зависит от осуществления реакции 2, катализируемой глутаматсинтетазой. Последний фермент, часто называемый также глутамин- $\alpha$ -оксoglутаратаминотрансфераза (ГОГАТ), катализирует восстановительный перенос амидогруппы глутамина на  $\alpha$ -кетоглутарат. Суммарное действие реакций 1 и 2 можно записать следующим образом:



Указанные две реакции являются единственными, которые обеспечивают усвоение аммиака и синтез глутамата такими микроорганизмами, как, например, *Bac. subtilis* или *Methylophilus methylotrophus*. У энтеробактерий этот путь образования глутамата обычно функционирует в том случае, когда содержание аммиака в среде не превышает 0,1 мМ или когда он образуется ферментативно из других источников азота. Кроме того, микроорганизмы могут использовать аммиак для синтеза глутамата с помощью реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой (ГДГ):



Однако у ряда энтеробактерий реакция 4 осуществляется в направлении образования глутамата только при концентрации аммиака в среде выше 0,1 мМ. Поэтому мутанты, у которых отсутствует глутаматсинтетаза, не растут на средах, содержащих более низкие его концентрации. Кроме того, они не способны усваивать в качестве источников азота другие азотсодержащие соединения.

Мутанты, дефектные по глутаминсинтетазе, всегда нуждаются в глутамине для роста. В то же время единичные мутации не могут вызвать потребность в аспаргате, поскольку реакция 3 может осуществляться несколькими трансаминазами.

Следует отметить, что в результате катализируемого этими ферментами переноса аминокруппы с глутамата на соответствующие  $\alpha$ -кетокислоты в клетке может образоваться более де-

сяти различных аминокислот. Будучи обратимой реакцией, переаминирование служит также начальным этапом их катаболизма.

Реакция 1, катализируемая глутаминсинтетазой, занимает центральное место в азотном метаболизме микроорганизмов. Амидная группа образующегося глутамина служит донором азота при синтезе триптофана, гистидина, АМФ, ЦТФ, глюкозамин-6-фосфата и карбамоилфосфата. Кроме того,  $\alpha$ -аминогруппа глутамина используется для синтеза глицина и аланина, осуществляемого при участии специфических трансминаз. Поэтому глутаминсинтетаза как первый фермент сильно разветвленного пути, ведущего к образованию широкого круга различных метаболитов, является первичной мишенью для регуляторных воздействий. Механизм регуляции активности этого фермента у *E. coli* необычайно сложен (В. Shapiro, E. Stadtman, 1970; Н. Holzer et al., 1967). Показано, что *in vitro* фермент ингибируется всеми восемью конечными продуктами метаболизма глутамина. **Каждый из них вызывает** (даже в насыщающей концентрации) **лишь частичное ингибирование, однако действие ингибиторов является аддитивным.** Поэтому в условиях избытка всех восьми конечных продуктов наблюдается почти полное ингибирование глутаминсинтетазы. Установление этого феномена, получившего название *кумулятивного ретроингибирования*, позволило сделать три вывода: каждый ингибитор связывается с ферментом на определенном участке; все ингибиторы могут связываться одновременно; связывание одного ингибитора не влияет на связывание других ингибиторов. Действительно, прямые исследования связывания АМФ и триптофана показали, что глутаминсинтетаза может присоединить 12 молекул каждого из этих соединений. Эти данные вполне соответствуют структуре фермента, который построен из 12 идентичных субъединиц с молекулярной массой 50 000Д.

Оказалось также, что глутаминсинтетаза может быть модифицирована в результате ковалентного присоединения АМФ к тирозильному остатку каждой субъединицы. Эта модификация снижает каталитическую активность фермента, так что аденилирование всех 12 субъединиц приводит, по существу, к полной его инактивации. Однако такое превращение происходит только в экстремальных условиях, например когда клетки выращивают в среде, содержащей бедный источник углерода и энергии и избыток аммиака и глутамина. Обычно же глутаминсинтетаза находится в промежуточных состояниях аденилирования, т. е. представлена гибридными молекулами, в которых модифицированы лишь некоторые из 12 субъединиц.

При переносе *E. coli* из среды, богатой аммиаком, в среду, содержащую низкие концентрации этого соединения, в результате процесса деаденилирования происходит быстрая реактивация глутаминсинтетазы.

Такой циклический переход ферментов, катализирующих ключевые стадии метаболизма, из модифицированных форм в немодифицированные представляет собой исключительно эффективный механизм обратимого изменения их актив-



ности. Поскольку реакции модификации и восстановления немодифицированной формы катализируются разными ферментами и осуществляются при действии одного фермента на другой, они образуют каскады, или каскадные (т. е. ступенчатые) системы регуляции. Эти каскады часто действуют как метаболические интегрирующие механизмы, способные отвечать на изменение концентраций различных метаболитов соответствующим изменением активности обратимо модифицируемого фермента. При этом они могут реагировать на очень небольшое изменение содержания аллостерического эффектора, обеспечивая тем самым усиление сигнала и увеличение скорости ответной реакции (Р. В. Chock et al., 1980).

Если обратимо модифицируемый фермент одного каскада служит модифицирующим ферментом другого каскада, то эти два каскада оказываются сопряженными и образуют бициклический каскад. Именно такой бициклический каскад и регулирует активность глутаминсинтетазы у *E. coli* и родственных бактерий. Один цикл здесь связан с аденилированием и деаденилированием глутаминсинтетазы, а другой — с уридилацией и деуридилацией регуляторного белка  $P_{II}$  (рис. 5).

Обратимую ковалентную модификацию глутаминсинтетазы катализирует аденилилтрансфераза (АТаз). Она представляет собой бифункциональный полипептид с автономными каталитическими участками для реакций аденилирования и деаденилирования. Обе эти реакции стимулируются белком  $P_{II}$  — продуктом гена *glnV*. Причем в своей немодифицированной форме этот белок, взаимодействуя с АТазой, повышает скорость аденилирования, а в уридилированной форме,  $P_{II}$ -УМФ, стимулирует деаденилирование.

В реакции аденилирования субстратами служат глутаминсинтетаза и АТФ, активаторами — белок  $P_{II}$  и глутамин, а ингибитором —  $\alpha$ -кетоглутарат. Для реакции деаденилирования абсолютно необходимы  $P_{II}$ -УМФ, а также АТФ и  $\alpha$ -кетоглутарат. Глутамин выступает здесь как ингибитор.

Белок  $P_{II}$  состоит из четырех идентичных субъединиц. Превращение  $P_{II}$  в  $P_{II}$ -УМФ происходит в результате катализируемого специфической уридилтрансферазой (УТазой) ковалентного присоединения УМФ к тирозильным остаткам каждой из субъединиц. Деуридилация катализируется уридилотщепляющим ферментом. Обе эти активности содержатся в одном полипептиде, продукте гена *glnD*. Для превращения  $P_{II}$  в  $P_{II}$ -УМФ необходим УТФ, а также АТФ и  $\alpha$ -кетоглутарат. Глутамин, а также неорганический фосфат эту реакцию ингибируют.

Теоретический анализ показывает, что среднее число  $n$  аденилированных субъединиц на молекулу глутаминсинтетазы определяется 18 параметрами. Важнейшие из них — это концентрации  $\alpha$ -кетоглутарата, глутамин, УТФ, АТФ и  $P_{II}$ . Отношение глутамин/ $\alpha$ -кетоглутарат можно рассматривать как чувствительный показатель обеспеченности клетки азотом. При избытке аммиака будет происходить образование глутамин из  $\alpha$ -кетоглутарата (реакции 4 и 1). В результате увеличения отношения глутамин/ $\alpha$ -кетоглутарат глутаминсинтетаза аденилируется. В условиях азотного голодания отношение глутамин/ $\alpha$ -кетоглутарат снижается и может произойти полное деаденилирование (т. е. активация) глутаминсинтетазы. Это создает условия для эффективного использования даже небольших количеств доступного  $NH_4^+$  (реакции 1 и 2).

Влияние УТФ (стимуляция деаденилирования и увеличение глутаминсинтетазной активности) противоположно ингибирующему действию одного из конечных продуктов — ЦТФ. Это обеспечивает сбалансированный синтез указанных нуклеозидтрифосфатов.

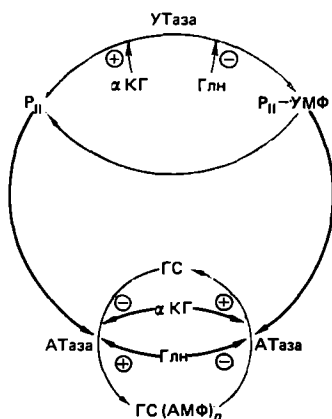


Рис. 5. Бициклическая каскадная система регуляции активности ГС:

(+) — аллостерический активатор;  
(-) — аллостерический ингибитор;  
 $\alpha$ -КГ —  $\alpha$ -кетоглутарат; Глн — глутамин

Участие  $\alpha$ -кетоглутарата, АТФ, Ф<sub>н</sub> и АМФ в регуляции биосинтеза глутамина делает эту реакцию точкой сопряжения метаболизма азотсодержащих соединений с энергетическим метаболизмом.

Таким образом, у *E. coli* глутамин инициирует инактивацию глутаминсинтетазы, которая осуществляется в результате ковалентной модификации — аденилирования фермента. Этот тип регуляции обнаружен также у фототрофной бактерии *Rhodospseudomonas capsulata* и у *Streptomyces cattleya* — продуцента  $\beta$ -лактамного антибиотика тиенамицина. В то же время у *Bac. subtilis* глутаминсинтетаза ингибируется непосредственно глутамином, который играет основную роль в регуляции своего собственного синтеза, а также множеством конечных продуктов метаболизма глутамина.

У некоторых микроорганизмов, например у *Rhizobium*, имеется две глутаминсинтетазы. Один из изоферментов, ГС<sub>I</sub>, напоминает глутаминсинтетазу энтеробактерий тем, что регулируется с помощью аденилирования. Второй изофермент, ГС<sub>II</sub>, не аденилируется, но инактивируется аммиаком.

Регулируется не только активность, но и синтез глутаминсинтетазы. Например, *E. coli* и другие энтеробактерии реагируют на голодание по источнику азота увеличением внутриклеточной концентрации ГС и ряда ферментов, участвующих в деградации азотсодержащих соединений. Регуляция экспрессии соответствующих генов, образующих Ntr-систему (от англ. nitrogen regulated — регулируемый азотом), оказалась также очень сложной. Структурный ген для глутаминсинтетазы, *glnA*, входит в состав оперона *glnALG*, который содержит еще гены *glnL* и *glnG*, кодирующие регуляторные белки. Продукт гена *glnG*, белок NR<sub>I</sub>, является репрессором и одновременно активатором Ntr-генов. Продукт гена *glnL*, белок NR<sub>II</sub>, также участвует в регуляции экспрессии этих генов на уровне транскрипции. Предполагается, что он как-то взаимодействует с продуктами генов *glnB* и *glnD*, которые при этом передают ему информацию об обеспеченности клетки азотом.

В регуляторной области оперона *glnALG* перед геном *glnA* обнаружены два промотора. Экспрессия оперона с первого промотора, *glnAp1*, активируется комплексом цАМФ—БАК и репрессирована белком NR<sub>I</sub>. Этот слабый промотор обеспечивает синтез глутаминсинтетазы и белка NR<sub>I</sub> в условиях голодания по источнику углерода и энергии. Экспрессия со второго промотора, *glnAp2*, активируется продуктом гена *glnG*. Причем белок NR<sub>I</sub> должен быть модифицирован в результате взаимодействия с белком NR<sub>II</sub>, который передает ему информацию о дефиците NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Кроме того, экспрессия с промотора *glnAp2* может осуществляться только в присутствии продукта гена *glnF*.

Исследование структуры промотора *glnAp2* показало, что он заметно отличается от обычных промоторов *E. coli*. В частности, участки в районе «-10» и «-35» нуклеотидов оказались только на 50% гомологичны соответствующим нуклеотидным последо-

вательностям классических промоторов. Сходные структуры были обнаружены также в промоторных зонах других Ntr-генов. В связи с этим возникло предположение, что транскрипция этих генов осуществляется модифицированной РНК-полимеразой. Действительно, как показали Т. Хант и Б. Магасаник (1985), продукт гена *glnF* способен связываться с ядром РНК-полимеразы вместо основного сигма-фактора и инициировать транскрипцию с *glnAp2* промотора. Это свидетельствует о том, что продукт гена *glnF* является специфическим сигма-фактором. В связи с этим предложено переименовать ген *glnF* в *groN*, а его продукт, белок с молекулярной массой около 60 000Д, обозначать как *сигма*<sup>60</sup>

Интересно, что выражение гена *glnF* (*groN*) не зависит от концентрации  $\text{NH}_4^+$ . По-видимому, в клетке всегда имеются молекулы РНК-полимеразы, содержащие *сигма*<sup>60</sup>-субъединицу. Следует добавить, что в промоторной зоне Ntr-генов обнаружен также специальный участок связывания белка  $\text{NR}_I$ .

Таким образом, инициация транскрипции Ntr-генов сопряжена с переходом  $\text{NR}_I$  в активную форму, который осуществляется в результате его взаимодействия с  $\text{NR}_{II}$ , продуктом гена *glnL*. Экспрессия *glnALG*-оперона с сильного промотора *glnAp2* увеличивает внутриклеточную концентрацию глутаминсинтетазы и продуктов генов *glnG* и *glnL*. Повышение концентрации белка  $\text{NR}_I$  в клетке, поддерживаемого в активной форме белком  $\text{NR}_{II}$ , приводит к инициации транскрипции других генов Ntr-системы.\* Экспрессия этих генов прекращается, когда соотношение глутамин/ $\alpha$ -кетоглутарат увеличивается и  $\text{NR}_{II}$  переводит  $\text{NR}_I$  в неактивную форму. Это лежит в основе явления азотной репрессии (или репрессии аммиаком), которое наблюдается у различных микроорганизмов. Таким образом, азотной репрессии подвержены ферменты и транспортные системы, функционирование которых становится ненужным в условиях избытка  $\text{NH}_4^+$ .

Все Ntr-гены можно разделить на два класса: во-первых, это гены, контролирующие образование ферментов и систем транспорта, необходимых для усвоения только источников азота; во-вторых, это гены, контролирующие усвоение азотсодержащих субстратов, которые могут быть также источниками углерода и энергии. Образование ферментов первого класса целиком зависит от продуктов генов *glnG* и *glnF* (*groN*), т. е. подвержено Ntr-контролю. Образование ферментов второго класса, кроме того, активируется продуктами генов *сya* и *сgr*, т. е. подвержено катаболитной репрессии. При этом экспрессия всех Ntr-генов может также контролироваться специфическими белками-регуляторами.

К числу важных представителей ферментов первого класса относится система азотфиксации (Nif-система) *Kl. pneumoniae*. Она обеспечивает превращение молекулярного азота в аммиак и состоит из 17 генов, образующих 8 оперонов. Продукты одного из этих оперонов, *nifLA*, регулируют экспрессию остальных

\* Белок  $\text{NR}_{II}$  катализирует перенос фосфата от АТФ к  $\text{NR}_I$ -белку, а также его отщепление от этого белка.

nif-генов. В то же время выражение nifLA-оперона зависит от продуктов генов *glnG* и *glnF* (*gpoN*). Показано, что концентрация нитрогеназы (азотфиксирующего ферментного комплекса) в клетках *Kl. pneumoniae*, растущих на средах с солями аммония, составляет только 0,005% от уровня, который наблюдается на средах с бедными источниками азота, такими, как серин.

Из других Ntr-ферментов первого класса можно упомянуть уреазу и периплазматическую аспарагиназу *Kl. aerogenes*. Образование этих ферментов не связано с индукцией субстратами и подвержено только азотной репрессии.

Наиболее изученной Ntr-системой второго класса являются *hut*-гены *Kl. aerogenes*. Они контролируют синтез ферментов, необходимых для усвоения L-гистидина (в частности, гистидазы), и индуцируются этой аминокислотой. Экспрессия *hut*-генов активируется продуктами генов *суа* и *сгр* или продуктами генов *glnG* и *glnF* (*gpoN*). В соответствии с этим концентрация гистидазы в клетках, растущих на среде с глюкозой и солями аммония, очень низкая; она повышается при замене глюкозы на менее эффективный источник углерода и энергии или замене  $\text{NH}_4^+$  на бедный источник азота.

Следует отметить, что высокая концентрация аммиака, репрессируя одни ферменты, в то же время активирует синтез других. Так, у *Kl. aerogenes* и *Kl. pneumoniae* содержание в клетках глутаматдегидрогеназы повышено при росте на средах, богатых  $\text{NH}_4^+$ , и снижено в присутствии бедных источников азота. Мутации в генах *glnG* и *glnL*, подавляющие синтез глутаминсинтетазы и гистидазы, приводят к тому, что глутаматдегидрогеназа начинает эффективно синтезироваться в условиях дефицита аммиака. С другой стороны, мутация в гене *glnL*, которая вызывает синтез глутаминсинтетазы и гистидазы даже при избытке  $\text{NH}_4^+$  (т. е. снимает азотную репрессию), резко подавляет образование глутаматдегидрогеназы. Следовательно, глутаматдегидрогеназа у *Klebsiella* кодируется Ntr-геном, выражение которого активируется аммиаком. Аналогично, по-видимому, регулируется синтез глутаминсинтетазы, гистидазы и глутаматдегидрогеназы и у *Ps. aeruginosa*.

У *Vac. subtilis* экспрессия гена *glnA*, кодирующего глутаминсинтетазу, в 10 раз выше в клетках, растущих в условиях лимитации азота, чем при его избытке в среде. Показано, что для репрессии синтеза глутаминсинтетазы аммиаком необходимо присутствие продукта гена *glnA*, т. е. ген *glnA* подвержен ауторегуляции. В то же время азотный контроль других генов у *Vac. subtilis* не обнаружен. На дефицит азота в среде представители семейства *Vacillaceae* обычно реагируют спорообразованием.

У эукариотических микроорганизмов также существует общая система регуляции азотного метаболизма. Хотя аммиак, а также глутамат и глутамин являются для грибов и дрожжей предпочтительными источниками азота, они могут использовать для этой цели белки, различные аминокислоты, пурины, ацетамид, нитраты и нитриты. Ферменты, необходимые для усвоения указанных соединений, обычно индуцибельны и подвержены азотной репрессии. Показано, что различные азотсодержащие субстраты вызывают репрессию не сами по себе, а только после превращения их в глутамин. Вероятно, что соотношение глутамин/ $\alpha$ -кетоглутарат служит и здесь сигналом обеспеченности клетки азотом. Обнаружено, что глутаминсинтетазная активность у *Neurospora*

*crassa* регулируется в основном путем изменения скорости синтеза фермента, которая зависит от концентрации  $\text{NH}_4^+$

Важную роль в азотном метаболизме эукариотических микроорганизмов играет глутаматдегидрогеназа. У *N. crassa*, *Aspergillus nidulans* и *Sacchar. cerevisiae* имеется два фермента: НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа (НАДФ-ГДГ), которая катализирует синтез глутамата, и НАД-зависимая глутаматдегидрогеназа (НАД-ГДГ), катализирующая образование аммиака и  $\alpha$ -кетоглутарата (см. реакцию 4). Содержание обоих ферментов в клетках зависит от природы и концентрации в среде как источника азота, так и источника углерода и энергии. Например, высокая активность НАДФ-ГДГ обнаружена в клетках *Aspergillus* и *Neurospora*, растущих на средах с лимитирующими рост концентрациями аммиака. Увеличение содержания  $\text{NH}_4^+$  репрессирует этот фермент и активизирует синтез НАД-ГДГ, обеспечивая усвоение глутамата в качестве источника углерода и энергии. С другой стороны, глюкоза стимулирует образование НАДФ-ГДГ, но репрессирует НАД-ГДГ, т. е. последний фермент подвержен катаболитной репрессии.

У дрожжей *Candida utilis* и *Sacchar. cerevisiae* глутамат (и другие аминокислоты) индуцирует НАД-ГДГ. Голодание по глутамату приводит к быстрой потере активности фермента. Показано, что это связано с обратимой модификацией фермента в результате его фосфорилирования.

При дефиците источника углерода и энергии НАДФ-ГДГ у дрожжей инактивируется в результате протеолитической деградации фермента. Имеются указания на то, что НАДФ-ГДГ кроме каталитической функции может играть роль регуляторного белка, контролирующего экспрессию *Ntr*-генов. Так, некоторые мутации в гене *GDNA* — структурном гене для НАДФ-ГДГ — снимают азотную репрессию многих ферментов.

Следует отметить, что молекулярные механизмы регуляции *Ntr*-генов у эукариотических микроорганизмов изучены слабо.

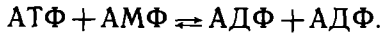
При получении штаммов промышленных микроорганизмов генетические манипуляции, изменяющие регуляцию азотного метаболизма, имеют важное значение. Интенсификация процессов образования глутамина, глутамата и аспартата может повышать продуктивность клеток в отношении многих первичных метаболитов, для которых эти соединения служат предшественниками и негативный контроль биосинтеза которых устранен в результате дополнительных мутаций. В свою очередь, повышенное образование первичных метаболитов, и в частности аминокислот, может увеличить продукцию вторичных метаболитов, предшественниками или стимуляторами синтеза которых они являются.

Поскольку синтез некоторых ферментов (например, протеиназ), а также многих вторичных метаболитов подвержен азотной репрессии (J. Aharonowitz, 1980), продукция этих соединений может быть увеличена не только в результате замены  $\text{NH}_4^+$  в среде на менее эффективные источники азота, но и с помощью

специфических мутаций, снимающих репрессию аммиаком. Кроме того, регуляция соответствующих генов может быть изменена с помощью методов генетической инженерии.

## **§ 7. Энергетическое состояние клетки и регуляция метаболизма**

Важной частью метаболизма микробной клетки является мобилизация химической энергии для поддержания процессов биосинтеза. Основным носителем энергии в любом организме служит аденозин-5'-трифосфат (АТФ). За счет энергии фосфорильных связей АТФ промежуточные продукты клеточного метаболизма активируются для дальнейших реакций. При этом АТФ может отдавать либо одну, либо обе концевые фосфатные группы, в результате чего образуется соответственно аденозин-5'-дифосфат (АДФ) или аденозин-5-монофосфат (АМФ). Образовавшийся АМФ при участии аденилаткиназы фосфорилируется до АДФ:



В ходе катаболических реакций, сопровождающихся выделением энергии, молекула АДФ может вновь присоединить фосфатную группу и образовать АТФ. Так происходит регенерация носителя энергии.

Существует два основных механизма образования АТФ из АДФ: фосфорилирование на уровне субстрата и фосфорилирование при переносе электронов.

При расщеплении органических субстратов, например в процессе гликолиза, образуется небольшое количество промежуточных продуктов, содержащих богатые энергией фосфорильные связи. Дальнейшее превращение этих соединений сопряжено с переносом фосфатной группы на АДФ. Этот способ синтеза АТФ называется фосфорилированием на уровне субстрата (или субстратным фосфорилированием).

Фосфорилирование при переносе электронов протекает в клеточных мембранах и осуществляется в процессах дыхания и фотосинтеза. В процессе дыхания органические или неорганические соединения служат донорами электронов (они при этом окисляются), а акцепторами электронов выступают неорганические соединения (они при этом восстанавливаются). Транспорт электронов от доноров к акцепторам, который протекает в дыхательной цепи, сопряжен с синтезом АТФ из АДФ и неорганического фосфата ( $\text{P}_i$ ). При аэробном дыхании конечным акцептором электронов является молекулярный кислород. Такой способ образования АТФ называется окислительным фосфорилированием.

Субстратное фосфорилирование является единственным способом синтеза АТФ в процессах брожения, посредством которых многие микроорганизмы получают химическую энергию из глюкозы и других субстратов в отсутствие молекулярного кислорода.

Роль конечного окислителя (или акцептора электронов) при брожении играет какая-нибудь органическая молекула, образуемая в ходе самого брожения.

Расщепление органических соединений в процессе дыхания также сопровождается субстратным фосфорилированием, но основное количество АТФ образуется при окислительном фосфорилировании, сопряженном с окислением промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот. Общий выход АТФ на одну молекулу субстрата, окисленного при дыхании, значительно выше, чем при его сбраживании.

Хотя АТФ непереносимый участник всех главных энергетических превращений в клетке, связанных с переносом фосфатных групп, в этом процессе могут принимать участие 5'-трифосфаты и других рибонуклеозидов и 2-дезоксирибонуклеозидов. Они не только являясь предшественниками нуклеиновых кислот, но и служат донорами энергии для некоторых специфических реакций биосинтеза. Все они связаны с АТФ через фермент нуклеозиддифосфокиназу, который катализирует реакции



где X — любой нуклеозид.

Как было отмечено, в процессе энергозависимых реакций в клетке используется АТФ и образуются АДФ и АМФ. Соотношение молярных концентраций АТФ, АДФ и АМФ отражает энергетическое состояние клетки и служит фактором, обеспечивающим связь между АТФ-утилизирующими и АТФ-генерирующими реакциями. Это обусловлено тем, что адениннуклеотиды относятся к числу важнейших эффекторов. Относительное увеличение концентрации АДФ и АМФ служит сигналом, автоматически повышающим интенсивность процессов, обеспечивающих катаболизм источников энергии. Это, в свою очередь, усиливает фосфорилирование АДФ до АТФ, и таким образом восстанавливается нормальное соотношение адениннуклеотидов. С другой стороны, АТФ действует обычно как аллостерический ингибитор в реакциях, ведущих к его образованию.

Хорошо известно, что факультативно анаэробные клетки, растущие в анаэробных условиях, потребляют сравнительно очень большие количества глюкозы (и образуют большие количества продуктов брожения). Если же ввести в среду кислород, то клетки начнут немедленно его поглощать и уровень потребления глюкозы резко снизится. Это снижение скорости гликолитического расщепления глюкозы с началом дыхания носит название эффекта Пастера. Он обусловлен подавлением активности фермента фосфофруктокиназы, который катализирует реакцию, лимитирующую общую скорость гликолиза, а именно фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-дифосфата. Фосфофруктокиназа представляет собой поливалентно регулируемый аллостерический фермент, который активируется АДФ и подавляется АТФ и цитратом. Таким образом, снижение

активности этого фермента связано с ускорением образования АТФ и началом функционирования ЦТК при переходе к аэробному окислению глюкозы. Приведенный пример показывает, что скорость катаболизма определяется, в общем, не концентрацией тех или иных субстратов в среде, а потребностью клетки в энергии.

Регуляция метаболических процессов в зависимости от энергетического состояния клетки может осуществляться на различных уровнях. Скорость данной последовательности реакций может зависеть от концентрации АТФ, который выступает на определенных стадиях в качестве субстрата, или «энергетического кофактора».

Уровни АТФ, АДФ, АМФ в клетке могут регулировать активность аллостерических ферментов, стимулируя или подавляя образование определенных клеточных метаболитов. Наконец, адениннуклеотиды могут регулировать экспрессию различных генов.

Ранее уже говорилось о том, что для инициации синтеза РНК и образования первой межнуклеотидной связи в процессе транскрипции необходима относительно высокая концентрация АТФ и ГТФ, которые чаще всего первыми включаются в цепь РНК. При низкой концентрации этих нуклеотидов этап инициации лимитирует скорость синтеза РНК. Обнаружено также, что РНК-полимераза способна связывать молекулы АТФ и ГТФ в отсутствие ДНК-матрицы. При этом изменяются некоторые физические свойства фермента, что свидетельствует об аллостерическом эффекте указанных нуклеотидов. Предполагается, что, присоединяясь к ферменту, АТФ и ГТФ как-то активируют его и для активации необходимы относительно высокие концентрации этих нуклеотидов.

В опытах *in vitro* высокие концентрации ГТФ стимулируют синтез рРНК и подавляют ингибирующее действие ффГфф. Как предполагают А. Траверс с соавторами (А. Travers et al., 1981), ГТФ может действовать как регуляторный антагонист ффГфф, активирующий РНК-полимеразу для синтеза рРНК. Температурно-чувствительные мутации, повреждающие фруктозо-1,6-дифосфатальдоллазу и аденилаткиназу при высокой температуре, вызывают остановку синтеза рРНК. При этом внутриклеточное содержание ффГфф не меняется. Очевидно, что эффект этих мутаций связан с изменением энергетического состояния клетки, т. е. соотношения нуклеотидов аденина. В опытах *in vitro* было показано, что нуклеотиды аденина могут регулировать активность РНК-полимеразы. В частности, высокие концентрации АТФ, а также его аналога  $\alpha, \beta$ -метилден-АТФ в 3—4 раза стимулируют транскрипцию рРНК и тРНК<sup>тип</sup>. В тех же условиях транскрипция лас мРНК в равной степени подавляется. В обоих случаях действие АТФ прекращалось при добавлении АДФ и АМФ, причем в концентрациях, которые в 5—10 раз ниже концентрации АТФ. Интересно, что сходный эффект вызывает циклический 3',5'-АМФ и ффГфф.



Следовательно, адениннуклеотиды регулируют активность РНК-полимеразы, изменяя ее сродство к различным промоторам. При этом АТФ стимулирует транскрипцию тех же самых генов, что и ГТФ, в то время как АДФ и АМФ, ффГфф и цАМФ негативно влияют на транскрипцию этих генов.

Как уже отмечалось, ффГфф накапливается в клетках при аминокислотном голодании и при дефиците источников энергии. Повышение содержания АДФ и АМФ, в свою очередь, отражает сниженную эффективность процессов регенерации АТФ. Поэтому действие этих эффекторов направлено на подавление синтеза рРНК и, возможно, других компонентов белоксинтезирующего аппарата, что представляется целесообразным в неблагоприятных для роста условиях.

С другой стороны, при высокой внутриклеточной концентрации АТФ и ГТФ, отражающей благоприятное энергетическое состояние клетки, синтез рРНК и, вероятно, других компонентов аппарата трансляции стимулируется. Напомним, что ГТФ связан с АТФ через нуклеозиддифосфокиназу и наряду с АТФ участвует в энергетическом обеспечении процесса синтеза белка. Повышенная чувствительность инициации транскрипции к снижению концентраций АТФ и ГТФ не только ограничивает синтез рРНК при ухудшении энергетического состояния клетки, но и препятствует резкому истощению адениннуклеотидов, которое сделало бы невозможным восстановление процессов биосинтеза в благоприятных условиях среды.

Говоря об энергетическом состоянии клетки, следует отметить также важную роль энергизации мембраны, которая возникает в результате работы так называемого *протонного насоса*. Этот механизм, существующий в различных прокариотических и эукариотических мембранах, использует энергию окисления, света и гидролиза АТФ для «откачивания» протонов из клетки через мембрану. В результате создаются градиент концентрации ионов водорода ( $\Delta pH$ ) и электрический мембранный потенциал ( $\Delta \Psi$ ), которые в совокупности образуют трансмембранный электрохимический потенциал ионов водорода ( $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$ ). Энергия, запасенная в этом потенциале (протонодвижущая сила), используется в процессах синтеза АТФ, активного транспорта и движения клеток с помощью жгутиков. Кроме того, со значением мембранного потенциала может быть связана активность некоторых ключевых ферментов, контролирующих, в частности, синтез и стабильность таких регуляторных молекул, как ффГфф и цАМФ.

## § 8. Протеолиз и регуляция метаболизма

С изменением внешних условий и фазы клеточного цикла содержание некоторых белков и ферментов в микробной клетке заметно меняется. Это связано с тем, что начинают функционировать или прекращают свою деятельность различные ферментные системы. Ставшие ненужными белки и ферменты могут быть

подвергнуты деградации (протеолизу) протеолитическими ферментами — *протеиназами* и *пептидазами*. Однако время существования различных клеточных белков сильно варьирует: одни деградируют очень быстро, другие значительно медленнее, а большая часть (до 70%) не разрушается (М. Pine, 1978).

Как уже отмечалось, при аминокислотном голодании, а также при дефиците источников азота, углерода и энергии наблюдается стимуляция внутриклеточного протеолиза. Образующиеся при этом свободные аминокислоты используются для синтеза белка и в метаболических реакциях. Таким образом, процесс деградации белков является одним из проявлений адаптации клетки к изменению условий среды.

В последние годы появляется все больше данных о том, что протеиназы играют важную роль в регуляции клеточного метаболизма. Кроме общего катаболизма белков эти ферменты осуществляют ограниченную протеолитическую модификацию определенных белковых молекул, активирующую или, наоборот, прекращающую их функцию, контролируют экспрессию некоторых генов, процессы спорообразования и прорастания спор, инициируют секрецию внеклеточных белков (А. Я. Стронгин, В. М. Степанов, 1979). Для выполнения регуляторных функций в клетках имеется набор высокоспецифических протеиназ, активность которых, в свою очередь, строго контролируется.

Можно считать установленным, что микроорганизмы имеют две системы общей деградации собственных белков. Одна из них активируется в условиях голодания и, видимо, не требует для функционирования затрат метаболической энергии. Другая, постоянно действующая система белковой деградации, служит для гидролиза аномальных белков, которые появляются в результате мутаций или ошибок биосинтеза, а также белков, играющих важную регуляторную функцию, время существования которых должно быть ограничено. Деятельность этой системы подавляется такими энергетическими ингибиторами, как цианиды или азиды. По-видимому, каждая из систем имеет свой набор протеолитических ферментов. Так, некоторые ингибиторы протеиназ подавляют протеолиз в условиях голодания, но не влияют на деградацию аномальных белков.

В клетках бактерий, растущих при постоянных условиях, за час деградирует 1—2% от общего количества белков. При аминокислотном голодании, недостатке источников азота или углерода и энергии, а также фосфора или серы или некоторых других элементов (калия, марганца) наблюдается повышение уровня протеолиза до 4—5% от общего содержания клеточного белка за час. Следует отметить, что одновременное голодание по нескольким факторам не дает дополнительного увеличения скорости внутриклеточной деградации белка.

Показано, что стимуляция протеолиза при голодании не связана с синтезом протеиназ *de novo*. Очевидно, в клетках уже существует набор необходимых ферментов. Активация протеоли-

за в этих условиях может быть обусловлена изменением концентрации низкомолекулярных эффекторов. Действительно, имеется хорошая корреляция между внутриклеточным содержанием гуанозинтетрафосфата, которое повышается при голодании, и эффективностью деградации клеточных белков. Однако пока не удалось показать прямого стимулирования этим нуклеотидом активности выделенных протеиназ *in vitro*. С другой стороны, уровень протеолиза возрастает при ограниченном (на 25—60%) снижении содержания АТФ под влиянием ингибиторов дыхания или при голодании по источнику энергии. Но и здесь отсутствуют данные о прямом влиянии адениннуклеотидов на активность протеолитических ферментов. Исключение составляют две специфические АТФ-зависимые протеиназы, функции которых будут описаны ниже.

Следует отметить, что, когда содержание АТФ резко падает (на 85—90%), сильно уменьшается деградация всех клеточных белков. В связи с этим предполагается, что процесс протеолиза внутри клеток происходит в два этапа: на первом происходит модификация белка, зависящая от АТФ; на втором независимо от АТФ осуществляется непосредственный акт протеолиза. Активность большинства известных протеиназ проявляется именно на втором этапе, поскольку для их действия *in vitro* АТФ не требуется.

АТФ-зависимая модификация белков-субстратов может осуществляться при участии белкового фактора протеолиза — убихитина. Этот фактор обнаружен в клетках самого разного происхождения. Предполагается, что в присутствии АТФ ковалентно связываются несколько молекул убихитина с молекулой белка-субстрата. Модифицированный белок становится чувствительным к внутриклеточным протеолитическим ферментам, которые расщепляют его до свободных аминокислот. Убихитин играет при этом каталитическую роль (А. Hershko et al., 1980). Возможно, что действие его зависит от низкомолекулярных эффекторов.

Повышение уровня протеолиза во время голодания приводит к деградации белков, обычно стабильных в растущих клетках. Объем этих белков может составить до 20% от общего протеина клетки. По-видимому, в эту фракцию входят ключевые ферменты и факторы, участвующие в синтезе ДНК, РНК и белка. В условиях голодания, когда образование этих макромолекул в значительной степени подавлено, соответствующие ферменты часто оказываются в «бездеятельном состоянии». Имеются данные, что не связанные с матрицами, субстратами, коферментами и аллостерическими эффекторами белки-ферменты сильнее подвержены действию протеиназ.

Таким образом, усиление протеолиза при голодании может быть обусловлено как активацией протеолитических ферментов, так и модификацией белков-субстратов, повышающей их чувствительность к действию этих ферментов. Следует отметить, что протеиназы, ответственные за деградацию нормальных клеточных

белков при голодании клеток, равно как и гены, контролирующие их синтез, не идентифицированы даже у *E. coli*.

Внешние условия могут не только стимулировать, но и подавлять протеолиз. Синтез внутриклеточных и секретируемых протеиназ у микроорганизмов подвержен катаболитной репрессии и сильно зависит от природы и концентрации источника азота. У дрожжей глюкоза и другие быстро усваиваемые субстраты подавляют новообразование не только ферментов, катаболизирующих углеводы, но также протеиназ А и В и карбоксипептидазы Y. Показано, что азотсодержащие субстраты могут контролировать скорость синтеза внеклеточных протеиназ у *Neurospora crassa* и *Bac. subtilis*, а также внутриклеточных протеиназ у дрожжей.

Как было упомянуто выше, у микроорганизмов существует постоянно действующая система деградации аномальных белков. Такие белки появляются в клетке в результате мутаций, ошибок биосинтеза (преждевременная терминация, замены аминокислот, включение аналогов) или посттрансляционных повреждений (ограниченный протеолиз). Следовательно, аномальные белки отличаются от нормальных клеточных белков размером и аминокислотным составом. Предполагают, что возникающие при этом изменения в третичной структуре и появление гидрофобных участков на поверхности белковых молекул повышают их чувствительность к действию специфических протеиназ.

Белки, содержащие аналоги аминокислот, такие, как 7-азатриптофан (аналог триптофана), L-канаванин (аналог аргинина), β-фторфенилаланин (аналог фенилаланина) и др. деградируют примерно в 20 раз быстрее нормальных. При встраивании аналогов некоторые обычно растворимые белки, например β-галактозидаза, агрегируют, образуя гранулы. Возможно, что такая агрегация аномальных белков способствует их распознаванию клеточной системой деградации.

Укороченные полипептиды, которые появляются в результате ошибок трансляции, действия пуромицина, делеций и мутаций, вызывающих преждевременную терминацию трансляции (нонсенс-мутаций), деградируют особенно быстро. Например, β-галактозидаза *E. coli* в норме настолько стабильна, что *in vivo* не удается даже определить время ее полураспада. В то же время возникающие в результате нонсенс-мутаций укороченные фрагменты этого белка (нонсенс-фрагменты) существуют всего несколько минут.

Даже замена одной аминокислоты на другую в результате так называемых миссенс-мутаций, сильно нарушает стабильность белков. Применение иммунологических методов показало, что около половины таких мутаций, полученных в гистидиновом опероне. *S. typhimurium*, приводят к деградации мутантных ферментов. Оказалось также, что у многих температурно-чувствительных мутантов утрата функции при повышении температуры связана с протеолизом измененных белков.

А. Бухари и Д. Зипсер выделили класс мутантов со сниженной способностью к деградации аномальных полипептидов (А. Bukhari, D. Zipser, 1973). С этой целью они сконструировали штаммы *E. coli*, содержащие две копии гена *lacZ*, несущие некомплементирующие мутации, одна из которых была нонсенс-мутация, а другая — делеция. Было известно, что неспособность этих мутаций к комплементации (которая является результатом взаимодействия дефектных полипептидов, частично восстанавливающего функцию фермента) связана с быстрой деградацией *in vivo* нонсенс-фрагмента. Следовательно, мутации, предотвращающие такую деградацию, приведут к появлению  $\beta$ -галактозидазной активности и способности клеток усваивать лактозу. Такие мутации были получены и обозначены *deg*. Неожиданно оказалось, что по своему фенотипическому проявлению и локализации на хромосоме они полностью идентичны известным мутациям *lon* (*carR*).

Все эти мутации вызывают повышенную чувствительность к ультрафиолетовому свету (УФ) и ионизирующей радиации, образование слизистых колоний, неспособность к лизогенизации фагами  $\lambda$  и P1, а также увеличивают стабильность нонсенс-фрагментов и фаговых мутантных белков (миссенс-белков). Чувствительность к УФ не связана с нарушением механизмов репарации (исправления дефектов) ДНК, а является следствием утраты способности к восстановлению клеточного деления после воздействия агентов, повреждающих ДНК. Поэтому мутанты *Lon* (*Deg*) после облучения образуют длинные нитевидные клетки, которые в конце концов лизируются.

Мукоидность колоний обусловлена сверхсинтезом капсульных полисахаридов в связи с дерепрессией соответствующих оперонов\* Повышенная стабильность фаговых миссенс-белков проявляется в том, что бактерии *Lon* начинают поддерживать развитие в непермиссивных условиях температурно-чувствительных мутантов фагов  $\lambda$  и T5 (S. Gottesman, D. Zipser, 1978).

Как и следовало ожидать, продукт гена *lon* оказался протеиназой, причем по своим характеристикам он не отличается от ранее обнаруженной в клетках *E. coli* АТФ-зависимой протеиназы La. Нативный фермент является тетрамером, построенным из одинаковых субъединиц с молекулярной массой 94000 Д. Он находится в цитоплазме, но похожий и, возможно, идентичный белок связан с наружной мембраной интактных клеток. Помимо АТФ-зависимой протеиназной активности продукт гена *lon* имеет также стимулируемую ДНК АТФазную активность и, подобно репрессорам, способен связываться с ДНК. Расщепление АТФ является весьма существенным для проявления протеолитической активности и отличает эту протеиназу от других известных ферментов, гидролизующих белки, включая те из

\* Продукт гена *lon*, по-видимому, контролирует стабильность белков — позитивных регуляторов синтеза капсульных полисахаридов (S. Gottesman et al., 1985).

них, которые активируются АТФ. Недавно появились сведения о механизме действия La-протеиназы, которые объясняют селективный протеолиз аномальных белков (M. Waxman, A. Goldberg, 1986). Оказалось, что такие белки в присутствии АТФ аллостерически активируют фермент.

Протеиназа La играет важную роль в координации процессов репликации ДНК и деления клетки. Она контролирует стабильность белка-ингибитора клеточного деления — продукта гена *su1A*, который индуцируется при воздействиях, подавляющих синтез ДНК и вызывающих SOS-реакцию (см. ниже). Время полураспада этого белка в клетках штаммов дикого типа составляет 1,2 мин, а в клетках мутантов *lop* — 19 мин. Таким образом, кроме общего гидролиза аномальных белков протеиназа La может осуществлять специфическую деградацию некоторых нативных клеточных белков.

Следует отметить, что повреждение гена *su1A* увеличивает жизнеспособность *lop*-мутантов. Двойные мутанты *lop Su1A* не отличаются заметно от штаммов дикого типа по своей чувствительности к УФ и другим факторам, нарушающим репликацию ДНК.

Повышая стабильность дефектных белков, мутация *lop* частично супрессирует температурно-чувствительную делеционную мутацию *groD800*, повреждающую основную сигма-субъединицу РНК полимеразы *E. coli*. Клетки, несущие эту мутацию, растут при температуре 30°C, но не могут расти при 41,5°C, очевидно, в связи с деградацией поврежденного белка. Двойные мутанты *groD800lop* развиваются при указанной температуре, хотя в отличие от бактерий дикого типа не способны к росту при 43°C.

У штамма, несущего мутацию *groD800*, были получены псевдоревертанты (истинные ревертанты в связи с делеционной природой мутации возникнуть не могут), растущие при 43°C. У них оказался резко сниженным протеолиз дефектных белков, хотя мутации затрагивали не *lop*-ген, а другой локус, известный под названием *htpR*. Это регуляторный ген, контролирующий синтез по крайней мере двух десятков белков, которые индуцируются при *тепловом шоке*, т. е. резком повышении температуры культивирования.

Реакция на тепловой шок наблюдается у различных прокариотических и эукариотических организмов. Она проявляется в том, что сразу же после переноса в условия повышенной температуры скорость синтеза белков определенного класса — так называемых белков теплового шока — резко увеличивается.

У температурно-чувствительных мутантов по гену *htpR* повышение температуры не сопровождается индукцией белков теплового шока. Кроме того, как было отмечено, у них нарушена деградация аномальных белков. Причины этого дефекта стали понятны, когда выяснилось, что протеиназа La также относится к белкам теплового шока, а выражение гена *lop* регулируется

продуктом гена *htrR*. По-видимому, усиление протеолиза в условиях повышенной температуры должно снижать накопление в клетке поврежденных белков.

Недавно было установлено, что ген *htrR* контролирует синтез сигма-субъединицы с молекулярной массой 32000 Д, которая обеспечивает инициацию транскрипции на промоторах генов теплового шока. Эта субъединица обозначается как  $\sigma^{32}$ , в отличие от  $\sigma^{70}$  — основного сигма-фактора *E. coli*, продукта гена *groD*. Предложено также переименовать ген *htrR* в ген *groH*.

При повышении температуры эффективность транскрипции гена *groH* увеличивается. Это, в свою очередь, вызывает активацию транскрипции генов теплового шока. Следует отметить, что возрастание экспрессии этих генов происходит также при голодании по аминокислотам и под влиянием некоторых повреждающих агентов, таких, как этанол и оксиданты. Пока не ясно, что именно индуцирует экспрессию самого гена *groH*. Возможно, что таким сигналом служит появление в клетке определенных низкомолекулярных эффекторов. Недавно показано, что под влиянием оксидантов в клетках синтезируются необычные нуклеозидполифосфаты, такие, как диаденозинтетрафосфат, аденозингуанозинтетрафосфат и др. Вероятно, некоторые из них могут образоваться и при тепловом шоке и стимулировать синтез  $\sigma^{32}$ -субъединицы.

Мутации *htrR* (*groH*) уменьшают способность разрушать аномальные белки даже при температуре 30°C. По-видимому, это связано с низким содержанием в клетке протеиназы La. Вместе с тем эффективность мутации *htrR* (*groH*) в подавлении протеолиза дефектных белков выше, чем мутации *lon*. Поэтому можно думать, что кроме протеиназы La ген *groH* контролирует синтез и других пока не идентифицированных ферментов, участвующих в деградации аномальных белков.

Из высокоспецифичных протеиназ бактерий хорошо изучены свойства и функции продукта гена *hcsA* *E. coli*. *RecA*-белок обладает одновременно несколькими ферментативными активностями. Он связывается с одно- и двунитевыми ДНК и обеспечивает взаимодействие их молекул, необходимое для процессов рекомбинации, расщепляет АТФ, т. е. является АТФазой, а также проявляет протеолитическую активность, очень специфичную к белкам-субстратам. Ферментативные активности *RecA*-белка стимулируются АТФ и одонитевыми олиго- и полинуклеотидами. АТФ выступает в роли аллостерического эффектора, поскольку для активации гидролиз АТФ не нужен.

Вместе с продуктом гена *lexA* *RecA*-белок играет ведущую роль в регуляции SOS-реакции клетки. Как уже отмечалось, продукт гена *lexA* — это репрессор, контролирующий SOS-регулон, т. е. около 20 генов, которые индуцируются в ответ на воздействия, повреждающие ДНК или тормозящие ее синтез. В число этих генов входит и ген *hcsA*. В присутствии АТФ и образующихся одонитевых (или каких-то иных производных) ДНК стимулируется протеиназная активность *RecA*-белка и он расщепляет *LexA*-белок. Таким образом, он дерепрессирует и свой собственный синтез, т. е. является позитивным ауторегулятором. Экспрессия генов SOS-регулона активирует процессы репарации и мутагенеза и подавляет деление клетки, поскольку среди индуцируемых находится и ген *sulA*, контролирующий синтез ингибитора клеточного деления. После прекращения действия повреждающих агентов содержание *LexA*-белка

в клетке возрастает и он репрессирует SOS-регулон. Вслед за этим под действием протеиназы La разрушается Sul A-белок и становится возможным деление клетки.

Кроме Lex A-белка Rec A-протеиназа способна инактивировать также репрессор фага  $\lambda$ .

Следует отметить участие специфических протеиназ в таком явлении, как катаболическая инактивация. У дрожжей глюкоза вызывает не только катаболическую репрессию определенных ферментов, но и протеолитическую деградацию малатдегидрогеназы и фосфоенолпируваткарбоксилазы, а также аминокептидазы. По-видимому, глюкоза или ее метаболиты, а возможно, само повышение скорости образования АТФ активируют или индуцируют синтез протеиназы, необходимой для избирательного разрушения указанных ферментов.

Высокоспецифичные протеиназы играют важную роль в регуляции клеточного цикла, в частности при переходе от вегетативного роста к образованию спор у дрожжей и бактерий. У мутантов дрожжей с низким уровнем протеиназ А и В снижена способность к споруляции. Выделен температурно-чувствительный мутант к споруляции *Bac. subtilis*, у которого этот дефект связан с повреждением структурного гена для внутриклеточной протеиназы. У *Bac. thuringiensis* с началом спорообразования специфическая протеиназа расщепляет  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы, осуществляя необходимую модификацию фермента.

Процесс прорастания спор также связан с деятельностью протеиназ. В спорах *Bac. megaterium* уже в течение первых 20 мин прорастания пятая часть всех белков деградирует до свободных аминокислот, которые используются затем для образования биосинтетических ферментов. Расщепление споровых белков осуществляется протеиназами, которые синтезируются при спорообразовании, сохраняются в покоящихся спорах и обнаруживают высокую специфичность к споровым белкам. После деградации споровых белков эти ферменты, в свою очередь, подвергаются протеолизу.

Детальные механизмы регуляции активности протеиназ, участвующих в процессах спорообразования и прорастания спор, в настоящее время не известны.

Наконец, образование зрелых белков из их предшественников (процессинг белков) связано с деятельностью высокоспецифичных протеиназ. Среди них важное значение имеет лидерная (сигнальная) пептидаза, которая отщепляет сигнальный пептид (или препептид), содержащий 15—30 аминокислотных остатков, от аминоконцевого участка секретрируемых (экспортируемых) белков. Присутствие сигнального пептида необходимо для осуществления секреции этих белков. Вместе с тем удаление препептида нужно для того, чтобы белок мог принять правильную конформацию и соединиться с определенными структурами или проявить свою функцию. Например, предшественник  $\beta$ -лактамазы (фермента, расщепляющего пенициллин и некоторые его производные), кодируемый плазмидой pBR322, приобретает активность только после отщепления лидерного пептида. Иногда, правда, секретрируемые белки, сохранившие препептид, обнаруживают почти нормальную биологическую функцию.



Завершающий этап деградации белков, начатой протеазами, — распад небольших пептидов до свободных аминокислот — осуществляется пептидазами. У *S. typhimurium*, где эти ферменты изучены лучше всего, обнаружено около десятка пептидаз (С. Miller, 1983). Одни из них представляют собой аминокептидазы широкого спектра действия, которые последовательно отщепляются по одной аминокислоте с аминоконца пептида, за исключением аминокислот, предшествующих остатку пролина. Последние отщепляются пролинспецифичными пептидазам. Кроме того, имеются дипептидаза широкого спектра действия, пролинспецифичная пептидаза (расщепляющая дипептиды с общей структурой X—Pro, где X — любой аминокислотный остаток), а также другие менее охарактеризованные ферменты (в том числе пептидаза, разрушающая сигнальный пептид),

Важно отметить, что гидролиз пептидов, образующихся в процессе деградации внутриклеточных белков, а также экзогенных пептидов осуществляют одни и те же пептидазы. Благодаря действию этих ферментов пептиды, добавленные в среду, могут служить для клетки источником аминокислот, в частности поддерживать рост ауксотрофных по аминокислотам мутантов. Именно это обстоятельство используют при получении штаммов, дефектных по пептидазам, которые утрачивают способность к усвоению соответствующих пептидов.

Установлено, что множественные мутанты по пептидазам в процессе роста на минимальных средах накапливают гетерогенную смесь небольших пептидов, которые образуются из внутриклеточных белков под действием протеиназ. В настоящее время не известно, как осуществляется регуляция действия пептидаз и как она связана с активностью ферментов, осуществляющих начальные этапы деградации белков. Но такая связь, вероятно, существует, на что указывает замедленное разрушение аномальных белков, содержащих аналоги аминокислот, в клетках мутантов, дефектных по пептидазам.

Уровень протеолиза аномальных белков имеет большое значение для селекции микроорганизмов и создания штаммов-продуцентов биологически активных веществ с применением методов генетической инженерии.

При получении продуцентов с помощью мутагенеза обычно не учитывается тот факт, что часто не удастся обеспечить синтез достаточного количества мутантных белков и ферментов, например с измененными регуляторными свойствами, именно потому, что они воспринимаются клеткой как аномальные и подвергаются ускоренному протеолизу. Чужеродные белки, не связанные со специфическими субстратами и структурами микробной клетки, в особенности короткие полипептиды, также эффективно разрушаются. Поэтому применение мутантов, дефектных по протеолизу аномальных белков, а также по пептидазам, представляется перспективным для повышения эффективности промышленных штаммов-продуцентов.

## § 9. Регуляция переноса веществ через мембраны

Как известно, любая живая клетка окружена мембраной — ее часто называют плазматической. Это как бы стена, отделяющая живое содержимое от неживого окружения. Однако плазматическая мембрана — не просто оболочка. Она избирательно проницаема и регулирует поступление в клетку ионов и молекул и выход их из клетки наружу.

Клеточные мембраны разного происхождения построены из двойного слоя фосфолипидов, в который включены полипептиды. Так, в мембранах бактерий находится около 300 различных белков, которые участвуют в процессах дыхания, транспорта электронов и биогенеза самой мембраны. Двойной липидный слой плазматической мембраны должен полностью препятствовать проникновению всех полярных молекул, каковыми в большинстве своем являются молекулы питательных веществ. Поэтому их поступление в клетку осуществляется с помощью специальных мембранных белков через модифицированные участки мембраны.

У микроорганизмов эластичная и хрупкая плазматическая мембрана обычно окружена клеточной оболочкой (или клеточной стенкой). Клеточная оболочка представляет собой ригидный и прочный сетчатый каркас, пропускающий многие молекулы. У эукариотических микроорганизмов она состоит из связанных различных образом полимеров глюкозы (глюканов), глюкосамина (хитозана) или N-ацетилглюкозамина (хитина). Общим компонентом клеточной стенки прокариот является пептидогликан, построенный из чередующихся субъединиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, который прилежит к мембране.

У грамотрицательных бактерий оболочка клетки имеет более сложное строение, чем у грамположительных. Она содержит дополнительный барьер проницаемости — так называемую внешнюю мембрану, которая состоит из двойного слоя липополисахаридов и фосфолипидов. Внешняя мембрана содержит около 50 различных белков, многие из которых участвуют в переносе веществ, а также служат рецепторами для фагов и колицинов. Промежуток между плазматической мембраной и внешней мембраной грамотрицательных бактерий называется периплазматическим пространством или периплазмой. Здесь находится около 100 различных белков, участвующих в транспорте и катаболизме некоторых соединений.

Небольшая группа веществ может поступать в клетку в результате *пассивной диффузии*, когда концентрация их в среде выше, чем концентрация в клетке. При этом они, видимо, не взаимодействуют со специфическими компонентами клеточной мембраны. Таким путем поступают в клетку вода, неполярные и малополярные молекулы газов ( $O_2$ ,  $H_2$ ,  $N_2$ ) и углеводороды.

При *облегченной диффузии* поступление веществ в клетку осуществляется с помощью специфических мембранных переносчиков. Это мембранные белки, имеющие общее название *пер-*

*меазы*, которые в ряде случаев индуцируются своими субстратами. Переносимое вещество связывается с пермеазой снаружи и освобождается внутри клетки. При облегченной диффузии, так же как и при пассивной диффузии, переносимый субстрат движется по градиенту концентрации (т. е. от более высокой к более низкой концентрации), причем ни один из этих процессов не требует метаболической энергии.

Системы *активного транспорта* могут создавать внутри клетки концентрации растворенных веществ, которые в тысячи раз превышают их концентрации во внешней среде. Это обеспечивает возможность развития микроорганизмов в условиях низкого содержания питательных веществ. Активный транспорт характеризуется специфичностью по отношению к субстрату, которая обеспечивается мембранным переносчиком. Когда переносчик обращен к внешней поверхности мембраны, он имеет высокое сродство к субстрату, а когда обращен к ее внутренней поверхности — низкое. Благодаря этому субстрат как бы «накачивается» в клетку. Этот процесс сопряжен с затратой метаболической энергии, обеспечивающей диссоциацию субстрата и переносчика на внутренней поверхности мембраны. Так, с помощью механизма активного транспорта в клетку поступает лактоза. Как уже отмечалось, ее перенос осуществляется при участии  $\beta$ -галактозидпермеазы. Если блокировать образование энергии (например, азидом натрия), то активный транспорт лактозы прекращается. В этих условиях  $\beta$ -галактозидпермеаза катализирует облегченную диффузию дисахарида, обнаруживая одинаковое сродство к нему по обе стороны мембраны.

Источником энергии, обеспечивающим активный транспорт в клетки различных микроорганизмов, в большинстве случаев является трансмембранный электрохимический потенциал ионов водорода, который может создаваться за счет переноса электронов или распада АТФ под влиянием мембранной АТФазы. Переносчики, имеющие места связывания протонов и молекул субстрата, используют мембранный потенциал (протонодвижущую силу) для транспорта в клетку ионов водорода и питательных веществ. Связывание с протоном должно повышать сродство переносчика к субстрату, а высвобождение его от протона на внутренней поверхности мембраны — понижать это сродство. Такой совместный транспорт одним переносчиком двух субстратов в одном направлении называется *симпортом* в отличие от *унипорта*, когда переносчик транспортирует только один субстрат. Многие питательные вещества поступают в клетки микробов также за счет симпорта с ионами  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ . Существует еще механизм *антипорта*, когда один переносчик транспортирует два субстрата, но в противоположном направлении.

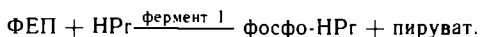
У микроорганизмов, в частности у *E. coli*, обнаружены также системы активного транспорта, которые используют химическую энергию АТФ. Такие системы обычно функционируют с помощью расположенных в периплазме связывающих белков.

Это водорастворимые белки, обладающие высоким сродством к некоторым аминокислотам, витаминам, пептидам, сахарам и органическим кислотам. Сами они не могут транспортировать субстраты через плазматическую мембрану, но способны стимулировать активность мембранных компонентов системы транспорта. Исследование мутантов бактерий, дефектных по синтезу определенных связывающих белков, показало, что они совершенно необходимы для активного транспорта их субстратов.

Предполагается, что физиологическая роль связывающих белков состоит в том, чтобы концентрировать в переплазматическом пространстве определенные соединения, имеющиеся в среде, а также в том, чтобы препятствовать выходу в среду питательных веществ, вытекающих из цитоплазмы.

В процессе активного транспорта из среды в клетку поступает немодифицированный субстрат. Однако у многих микроорганизмов есть транспортные системы, которые переводят питательное вещество в химически измененную форму, не способную проходить через мембрану наружу. Это так называемые *системы транслокации* (или *переноса*) *групп*. Процесс переноса групп напоминает активный транспорт, поскольку приводит к тому, что внутриклеточная концентрация химически измененного соединения может во много раз превысить концентрацию свободного соединения в среде. Примером системы переноса групп является уже упоминавшаяся фосфотрансферазная система (ФТС). Она транспортирует многие углеводы и их производные, поступающие в клетку в виде фосфатных эфиров (фосфоуглеводы).

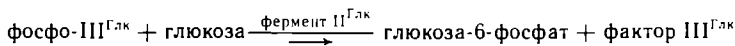
Неспецифическими компонентами ФТС являются два растворимых белка. ферменты I и HPr. Фермент I катализирует фосфорилирование фосфоенолпируватом (ФЕП) низкомолекулярного термостабильного белка HPr:



Образующийся фосфо-HPr служит общим донором фосфорильной группы для глюкозы, маннозы, фруктозы и других гексоз (ФТС-углеводов). Фосфорилирование этих соединений катализируется набором субстрат-специфичных белков, локализующихся в мембране, которые носят общее название — ферменты II:



Как уже отмечалось, у *E. coli* транспорт глюкозы и ее аналогов происходит при участии фермента II<sup>ГЛК</sup> (продукта гена ptsG) и фактора III<sup>ГЛК</sup> (продукта гена sgt), который также фосфорилируется фосфо-HPr:



В случае повреждения гена ptsG глюкоза транспортируется при участии фермента II<sup>Ман</sup> (продукта гена ptsM), специфичного к глюкозе, маннозе и 2-дезоксиглюкозе, и независимо от фермента III<sup>ГЛК</sup>.

При транспорте углеводов с помощью механизма переноса групп в клетке сразу же оказывается фосфорилированное производное. Таким образом, одновременно осуществляется

первая реакция катаболизма углевода и, следовательно, экономится АТФ. В связи с этим ФТС особенно выгодна факультативным и строго анаэробным бактериям. Кроме энтеробактерий, она обнаружена, например, у молочнокислых стрептококков и клостридий. Однако и у некоторых аэробов — представителей рода *Arthrobacter*, и семейства *Bacillaceae* (в том числе у *Bac. subtilis*) — глюкоза транспортируется в клетку с помощью ФТС.

Следует отметить, что мембранные белки — ферменты II — не только являются фосфотрансферазами, но также, по-видимому, служат мембранными рецепторами для ФТС-углеводов. Рецепторные белки, связывая те или иные низкомолекулярные вещества, обратимо меняют свою конформацию. Эти изменения запускают внутри клетки различные реакции. Взаимодействие ферментов II со своими субстратами приводит к снижению уровня фосфорилирования фактора III<sup>ГЛК</sup>, с которым они начинают конкурировать за фосфо-НРг. Это, в свою очередь, снижает активность аденилатциклазы, а следовательно, и внутриклеточную концентрацию цАМФ, что вызывает множественные изменения в метаболизме. Вероятно, аналогичную рецепторную функцию могут выполнять определенные компоненты систем переноса и других веществ, например источников азота и фосфора.

Транспорт многих субстратов регулируется как на уровне биосинтеза, так и на уровне функционирования компонентов транспортных систем. Так, системы транспорта источников углерода и энергии индуцибельны и подвержены катаболитной репрессии. Выше уже говорилось о роли в этом явлении цАМФ и фактора III<sup>ГЛК</sup>.

У *E. coli* и *S. typhimurium* известны два класса субстратов, на усвоение которых влияет уровень фосфорилирования фактора III<sup>ГЛК</sup> (P. Postma, 1982).

К первому относятся мальтоза, лактоза, глицерин и мелибиоза, усвоение которых зависит от цАМФ, активирующего транскрипцию оперонов, контролирующих синтез компонентов соответствующих транспортных систем. Поступление этих соединений в клетку подавляется нефосфорилированным фактором III<sup>ГЛК</sup>. Во второй класс входят ксилоза, рамноза, органические кислоты (цитрат, сукцинат и др.), для усвоения которых нужен цАМФ. Однако системы их транспорта не чувствительны к ингибированию нефосфорилированных фактором III<sup>ГЛК</sup>.

Как уже было отмечено, некоторые представители облигатно аэробных неспорных бактерий, например *Pseudomonas putida*, предпочтительно усваивают органические кислоты. Они имеют также конститутивную систему их транспорта. В то же время глюкоза поступает в клетки этих организмов с помощью транспортной системы, которая индуцибельна и подвержена катаболитной репрессии сукцинатом.

Системы транспорта глюкозы индуцируются и у бактерий, способных переключаться с автотрофного (или миксотрофного)

типа питания на гетеротрофное. В этом случае предпочтительный источник энергии (тиосульфат, водород, ионы железа) репрессирует образование транспортной системы глюкозы, а иногда и подавляет ее функционирование.

Важно подчеркнуть, что иногда одновременно с индукцией белковых компонентов необходим синтез фосфолипидов, в отсутствие которого транспортная система остается малоактивной. Это связано с тем, что мембранные белки нормально функционируют, когда они находятся в контакте с липидами. Активирующее действие этих соединений может быть двояким. Во-первых, в присутствии липидов может меняться форма молекулы мембранного белка, так что его активный центр становится доступным для субстрата. Во-вторых, липиды могут играть роль организатора ансамбля, состоящего из нескольких мембранных белков.

Свойства мембранных липидов могут изменяться, если в среде добавить различные жирные кислоты (или их производные), которые включаются в мембрану вместо нормальных. Кроме того, на содержание и состав липидов в мембране могут влиять мутации. В результате нарушаются функционирование транспортных систем и проницаемость мембран.

Избыток субстрата в среде может репрессировать синтез соответствующей транспортной системы. Это особенно характерно для аминокислот, регуляция транспорта которых, по-видимому, скоординирована с регуляцией их метаболизма. Важным обстоятельством является участие в такой репрессии аминоацил-тРНК, что свидетельствует о тесном взаимодействии процессов транспорта аминокислот и их последующего использования в трансляции. Репрессия транспорта наступает при избытке соответствующих аминоацил-тРНК. Показано также участие в регуляции транспорта аминокислот фактора терминации транскрипции Rho. Мутация, инактивирующая Rho-фактор, вызывает заметную дерепрессию транспорта аминокислот, но не всех, а только тех, в транспорте которых участвуют связывающие белки. В совокупности эти данные позволяют предположить участие механизма аттенуации в регуляции экспрессии генов, контролируемых соответствующими транспортными системами.

Обнаружено также, что в клетках RelA-мутантов не происходит дерепрессии транспорта аминокислот при переносе их с богатой среды на бедную. Это свидетельствует о том, что в норме соответствующие системы транспорта, очевидно, активируются гуанозинтетрафосфатом. Наконец, синтез компонентов систем транспорта азотсодержащих соединений и, в частности, некоторых аминокислот подвержен азотному контролю и зависит от наличия ионов аммония в среде.

В связи с выраженной специфичностью переносчиков и связывающих белков, а также ограниченным их количеством в мембране и периплазме структурно близкие соединения конкурируют друг с другом при транспорте, взаимно подавляя включение. Это явление называется *цисингибированием* и использу-

ется иногда для доказательства общности путей поступления субстратов в клетку. В одних случаях ингибитор блокирует перенос субстрата и сам переносится в клетку данной транспортной системой. Например, система ЛИБ-1 у энтеробактерий переносит лейцин, изолейцин и валин, но может также переносить аланин, глицин, серин и треонин. Для этой системы все соединения, являющиеся цисингибиторами, служат и ее субстратами. В других случаях цисингибитор имеет достаточное структурное сходство с субстратом, чтобы связаться с активным центром переносчика, но не может быть транслоцирован им в клетку. Иногда цисингибирование проявляет вещество, химически несходное с субстратом транспортной системы. К явлениям этого порядка можно отнести подавление транспорта многих соединений глюкозой (исключение индуктора)

Обнаружена также регуляция транспорта по тире обратной связи, когда субстрат, накопленный внутри клетки, подавляет собственный транспорт (или транспорт родственного соединения) из внешней среды. В этом случае переносчик, по-видимому, иммобилизуется субстратом на внутренней стороне мембраны и не может участвовать в новых циклах транслокации. Такое явление называется *трансингибированием*.

Наряду с цис- и трансингибированием известны также *цис-* и *транстимуляция*. Приставки «цис» и «транс» означают взаимодействие с транспортной системой веществ, находящихся по одну или по разные стороны мембраны соответственно. Однако иногда влияние одного субстрата на транспорт другого может иметь более сложный характер. Например, подавление транспорта многих субстратов глюкозой в результате каталитической репрессии можно отнести и к цис-, и к трансингибированию. Точно так же стимуляция транспорта субстратом, который быстро проникает в клетку и служит источником энергии для транспорта другого субстрата, можно рассматривать и как цис-, и как транстимуляцию, поскольку транспорт второго субстрата зависит от внутриклеточного метаболизма первого субстрата. Такое явление наблюдается, к примеру, у некоторых представителей рода *Arthrobacter*, у которых транспорт лизина, аргинина и орнитина, осуществляемый общей системой, стимулируется малатом и сукцинатом и зависит от генерируемого при окислении этих субстратов электрхимического мембранного потенциала.

Как было указано в начале этого раздела, движение веществ через мембрану не является однонаправленным. Микроорганизмы освобождаются от токсичных продуктов собственного метаболизма, выделяют избыточные питательные вещества, многие виды продуцируют антибиотики и экзоферменты.

Определенные низкомолекулярные соединения могут выводиться наружу с помощью тех же механизмов пассивной и облегченной диффузии, когда концентрация их в клетке превышает концентрацию во внешней среде. Напомним, что при облегченной диффузии перенос субстратов по градиенту концентрации осуществляется с помощью специфических переносчиков, имеющих одинаковое средство к субстрату по обе стороны мембраны, и не требует затрат энергии. Более того, некоторые микроорганизмы используют опосредованный переносчиками вывод метаболитов из клетки для создания протондвижущей силы. Так, в клетках молочных стрептококков, *Strept. cremoris*, поступающие с помощью ФТС глюкоза и лактоза метаболизируются с образованием молочной кислоты. При этом внутриклеточная концентрация лактата может достичь уровня 200 мМ. Лактат выводится в симпорте с протонами, так что при оптимальных условиях среды (рН > 6, 7, концентрация лактата меньше 10 мМ) одна его молекула покидает клетку вместе с двумя ионами H<sup>+</sup>

Установлено, что за счет этого клетка получает дополнительную энергию, эквивалентную 50% той энергии, которая генерируется в процессе субстратного фосфорилирования за счет катаболизма глюкозы (W. Komings et al., 1984).

Однако вывод из клетки многих метаболитов, по-видимому, осуществляется независимо от их поступления в клетку. Известны мутанты бактерий, у которых нарушен транспорт в клетку аминокислот и витаминов, но сохранилась способность к выделению этих соединений.

Предполагается, что многие метаболиты выводятся из клеток через особые каналы, или поры, в мембране. Эти каналы могут быть наподобие тех, которые существуют в наружной мембране грамотрицательных бактерий для диффузии небольших ( $\leq 800$  Д) гидрофильных молекул. У *E. coli* они образованы специальными белками, так называемыми поринами, продуктами генов *ompF* и *ompC*. Экспрессия этих генов зависит от осмолярности среды, причем осморегуляция осуществляется на уровне транскрипции.

Поры в плазматической мембране, возможно, возникают или начинают функционировать, когда концентрация того или иного соединения в клетке достигает определенного значения. Они могут быть важной частью системы регуляции метаболизма. Вместе с тем клетка стремится предотвратить потерю ценных питательных веществ. Как уже отмечалось, этой цели служат связывающие белки и другие компоненты систем активного транспорта, которые возвращают метаболиты в клетку, т. е. осуществляют их реаккумуляцию.

Показано, что некоторые соединения активно выводятся с помощью специфических энергозависимых систем экскреции. Так осуществляется вывод регуляторного нуклеотида цАМФ из клеток *E. coli* и *S. typhimurium* и инозиновой кислоты (ИМФ) из клеток *Brevibacterium ammoniagenes*. Системы экскреции обеспечивают также выведение из клеток токсичных соединений и некоторых антибиотиков. Например, устойчивость к арсенату, арсениту и соединениям сурьмы у *E. coli* и *St. aureus* связана с плазмидами и контролируется опероном, который, по-видимому, находится в составе транспозона. В присутствии токсичных ионов индуцируется их выброс из клетки, осуществляемый энергозависимой системой. Аналогичным образом связанная с плазмидами устойчивость к кадмию у *St. aureus* обусловлена активным выбросом из клетки катионов  $Cd^{2+}$

Следует отметить высокую специфичность этих систем. Часто токсичные анионы и катионы поступают в клетку с помощью систем транспорта жизненно важных соединений. Так, система *Pit* у *E. coli* обеспечивает перенос в клетку как анионов  $PO_4^{3-}$  так и анионов  $As_4^{3-}$  Однако экскретируется из клетки только арсенат. Обнаружено также, что детерминируемая некоторыми плазмидами устойчивость к тетрациклину у бактерий связана с активным выбросом его из клетки.



У многих продуцентов антибиотиков в период их активного синтеза образуются многочисленные впячивания клеточной мембраны. Ферменты, катализирующие конечные этапы синтеза антибиотиков, могут быть связаны с этими мембранными структурами, где, по-видимому, и происходит синтез антибиотиков. Следует отметить, что образование более или менее обособленных участков — так называемая компартментализация — изолирует чувствительные структуры клетки продуцента от токсичного действия этих метаболитов. Накапливаясь в вакуолях, образованных инвагинацией мембраны, они могут затем выделяться из клетки по типу экзоцитоза (т. е. в результате процесса, обратного влячиванию мембраны). Самоотравлению продуцента обычно препятствует индуцированная устойчивость к антибиотику, которая может быть связана с активным выбросом его из клетки, с его инактивацией или же с изменением проницаемости мембраны. Например, у *Streptomyces venezuelae*, продуцента хлорамфеникола, устойчивость к нему обусловлена барьером мембранной проницаемости, который возникает с началом синтеза антибиотика. Показано также, что клетки *Bac. brevis* — продуцента эдеина — в продуктивный период становятся непроницаемыми для этого антибиотика.

Отдельного рассмотрения требует вопрос об экспорте белков. Этим термином обозначают перемещение белков из цитоплазмы, где они синтезируются, в плазматическую мембрану, периплазматическое пространство, внешние слои клеточной стенки и в окружающую среду. Процесс выделения белков за пределы клетки называют также *секрецией*. Таким образом, секреция — это особый случай экспорта белков.

К секретлируемым белкам относятся экзоферменты, осуществляющие гидролиз различных полимеров (белков, нуклеиновых кислот, поли- и олигосахаридов и липидов) до растворимых конечных продуктов, которые могут поступать в клетку и усваиваться микроорганизмами. Кроме того, секретированы разнообразные токсины, действующие на прокариотические и эукариотические клетки. Сюда же относятся так называемые лизирующие ферменты, способные разрушать клеточные стенки микробов. Наконец, секретированы ферменты, способные инактивировать некоторые антибиотики, например  $\beta$ -лактамаза.

Большинство экспортируемых белков синтезируется в виде предшественников, содержащих на аминоконцевом участке сигнальный (или лидерный) пептид, который не обнаруживается в зрелых белках. Сигнальные пептиды из эукариотических и прокариотических организмов представляют собой последовательности из 15—30 аминокислотных остатков, которые имеют ряд общих признаков: 1) на самом конце последовательности находится один или несколько положительно заряженных аминокислотных остатков; 2) существует непрерывный участок, содержащий восемь (или более) гидрофобных или нейтральных остатков; 3) имеется участок расщепления для сигнальной пептидазы, которому обычно предшествует консервативная последовательность.

Положительно заряженный участок, по-видимому, обеспечивает начальный контакт белка-предшественника с мембраной, внутренняя поверхность которой заряжена отрицательно, в то время как гидрофобные остатки формируют протяженный участок связывания с мембраной. Мутации, уменьшающие число

положительно заряженных остатков или размеры гидрофобной области лидерного пептида, нарушают экспорт и процессинг белков.

Обычно белки, которые выводятся из цитоплазмы, синтезируются на связанных с мембраной полирибосомах (полирибосомы, или полисомы, образованы большим числом рибосом, присоединенных к транслируемой мРНК). Связывание полирибосом с мембраной происходит за счет гидрофобной области сигнального пептида. У эукариот экспорт белков всегда сопряжен с трансляцией. Энергия, освобождающаяся в процессе элонгации полипептидной цепи, обеспечивает и процесс экспорта. У прокариот, в частности у *E. coli*, экспорт белков может осуществляться и после завершения трансляции и зависит от трансмембранного электрохимического потенциала. Здесь лидерный пептид, видимо, играет определенную роль в изменении конформации предшественника, обеспечивающей сохранение его до начала транслокации в растворенном состоянии в цитоплазме.

Зоны связывания на мембране, очевидно, образованы с участием специальных мембранных белков, ответственных за процесс экспорта. Причем различные участки, вероятно, могут быть избирательными по отношению к экспортируемому белку. Определенную роль в процессе выведения белков из цитоплазмы играют и рибосомы. Показано, что супрессорные мутации, восстанавливающие способность к экспорту белков с дефектной сигнальной последовательностью, могут затрагивать гены, контролирующие синтез рибосомных или мембранных белков.

Как уже отмечалось, процессинг экспортируемых белков осуществляется сигнальной пептидазой, которая расположена в мембране так, что каталитический участок фермента находится на ее наружной поверхности. Непосредственно перед окончанием трансляции или же вскоре после окончания происходит отщепление сигнального пептида и зрелый белок перемещается в определенные отделы клетки или за ее пределы. Однако в лидерном пептиде содержится не вся информация, необходимая для правильной локализации белка в клетке. Зрелый белок может включать дополнительные последовательности (стоп-трансферные сигналы, мембранные якоря), которые определяют, в частности, его расположение в пределах мембраны. Обычно это гидрофобные участки, напоминающие аналогичные последовательности сигнальных пептидов, детерминирующие задержку белка в липидном двуслое. В зависимости от характера расположения этих участков в пределах полипептидной цепи белок может или целиком размещаться в пределах мембраны, или же присоединяться к ней за счет концевой области. По-видимому, некоторые ферменты, которые остаются всегда связанными с поверхностью клетки, фиксированы в мембране подобным образом.

Следует отметить, что многие белки плазматической мембраны синтезируются без лидерного пептида, а имеют только внутренний «мембранный якорь». С другой стороны, секретлируемые

белки почти всегда образуются с аминоконцевым сигнальным пептидом и не содержат внутренних стоп-трансферных последовательностей.

Генетические и в особенности генно-инженерные методы позволяют соединить участок ДНК, несущий регуляторную область и сигнальную последовательность одного белка, с участком ДНК, кодирующими аминокислотную последовательность другого белка. В результате в клетке синтезируется гибридный или химерный белок. Такого рода эксперименты показали, что различные сигнальные последовательности эукариот и прокариот обычно взаимозаменяемы и обеспечивают выведение из цитоплазмы экспортируемых белков. Однако если второй белок в норме является цитоплазматическим, то экспорт его чаще всего не происходит. Иногда это связано с тем, что такие белки содержат внутренние участки, которые напоминают стоп-трансферные последовательности и поэтому «застревают» в мембране. Кроме того, у прокариот, где экспорт не сопряжен строго с трансляцией, может иметь значение неспособность образующихся химерных молекул принять конформацию, необходимую для последующей их транслокации из цитоплазмы.

К примеру, присоединение регуляторной области и участка ДНК, кодирующего сигнальный пептид периплазматического белка, связывающего мальтозу (БСМ), — продукта гена *malE* — к лишенному промоторной области гену *lacZ*, кодирующему цитоплазматический белок  $\beta$ -галактозидазу, не привело к экспорту этого фермента в периплазму *E. coli*. Химерный белок *MalE-LacZ* «застревал» в мембране и при этом блокировал вывод из цитоплазмы экспортируемых белков. Поэтому клетки *E. coli*, способные синтезировать *MalE-LacZ*, чувствительны к мальтозе, которая индуцирует *mal*-гены. Мутации, придающие таким бактериям устойчивость к указанному дисахариду, изменяли гидрофобный участок лидерного пептида, очевидно, нарушая его связывание с мембраной. Это подтверждает ключевую роль лидерного пептида в инициации экспорта белков.

Как уже отмечалось, грамотрицательные бактерии имеют дополнительный барьер проницаемости в виде внешней мембраны, через которую не проникают белковые молекулы. Поэтому некоторые ферменты, например фосфатазы, которые обычно секретируются грамположительными бактериями, задерживаются у них в периплазме. Однако и среди грамотрицательных бактерий есть виды и штаммы, способные продуцировать внеклеточные белки. Так, штаммы *E. coli*, несущие плазмиду, детерминирующую синтез гомолизина, приобретают способность и к его секреции. Первоначально гомолизин, по-видимому, поступает в периплазматическое пространство. Для выведения его из клетки необходим синтез двух белков, кодируемых той же плазмидой. Эти белки встраиваются во внешнюю мембрану и обеспечивают энергозависимое перемещение гомолизина наружу (W. Goebel et al., 1984).

Грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas*, включая хорошо изученный вид *P. aeruginosa*, секретируют многие белки. Один из них, токсин А, синтезируется в виде предшественника с классическим сигнальным пептидом и, по-видимому, сопряженно с трансляцией экспортируется прямо в среду. Секрция этого белка осуществляется через особые зоны контактов между плазматической и внешней мембраной и включает этап удаления сигнального пептида. Эти зоны, вероятно, также образованы при участии специальных мембранных белков.

Последние примеры, а также данные, о которых упоминалось ранее, показывают важную роль мембранных белков в процессах экспорта и секрции. С их участием в мембранах, по-видимому, образуются своеобразные зоны, или «каналы», через которые осуществляется транслокация белковых молекул и инициируется сам процесс экспорта.

Число таких зон в мембране ограничено и меняется в зависимости от условий роста. Можно предполагать, что их образование как-то скоординировано с синтезом экспортируемых белков. Напомним, что среди этих белков есть много экзоферментов, которые чаще всего индуцибельны и подвержены катаболитной и азотной репрессии. Некоторые данные свидетельствуют о том, что мембранные белки, обеспечивающие процесс экспорта, индуцируются не одновременно с экспортируемыми белками, а скорее последовательно. Так, у *E. coli* индукция мембранного белка, продукта гена *secA*, связана с накоплением в цитоплазме белков, подлежащих транслокации.

Интересно, что подавление образования белка *SecA* снижало синтез экспортируемого белка БСМ. Это говорит о том, что процессы экспорта и трансляции у *E. coli* могут быть и сопряжены.

В ряде случаев показано, что для секрции белков необходимо, чтобы продолжался нормальный синтез фосфолипидов. Подавление их новообразования, например, антибиотиком церулеином останавливает секрцию у бацилл, а также экспорт периплазматических белков у *E. coli*. Очевидно, нормальные липидно-белковые взаимодействия в мембранах важны как для транспорта низкомолекулярных соединений, так и для экспорта и секрции белков.

Изменение работы систем, обеспечивающих перенос веществ через мембраны, является важным методом повышения продуктивности промышленных штаммов микроорганизмов. С этой целью используют физиологические факторы и мутации, специфически повышающие проницаемость плазматических мембран, а также мутации, активирующие выделение метаболитов из клетки или нарушающих их реаккумуляцию.

# Глава 2

## МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ *in vivo*

---

Стратегия селекционной работы с микроорганизмами заключается в поиске природных форм, которые обладают какими-либо полезными для человека свойствами (синтез ценного соединения, высокая скорость роста, способность к усвоению дешевых и доступных субстратов и пр.), и в последующем их улучшении, создании на их основе промышленных штаммов. Эта задача обычно решается путем изменения регуляции метаболической активности микробной клетки.

Методы современной селекции — это генетическое конструирование, т. е. совокупность приемов, с помощью которых сознательно изменяют генетическую программу микроорганизмов.

Генетическое конструирование *in vivo* включает получение и выделение мутантов и использование различных способов обмена наследственной информацией живых микробных клеток.

Генетическое конструирование *in vitro* основано на применении генетической инженерии, которая предполагает манипуляции на выделенной из организмов ДНК. Следует отметить, что такое разделение условно, поскольку указанные методы взаимосвязаны и сегодня все больше переплетаются друг с другом. Именно на этой основе разрабатываются универсальные подходы к генетическому конструированию различных видов микроорганизмов, имеющих промышленное значение.

В настоящей главе рассматриваются способы генетического конструирования *in vivo*. Поскольку методы гибридизации грибов, конъюгации, трансдукции и трансформации хорошо и детально изложены в многочисленных учебниках и учебных пособиях (см. литературу), основное внимание сосредоточено на общих принципах и подходах, позволяющих использовать эти методы для широкого круга микроорганизмов.

## § 1. Мутагенез и методы выделения мутантов

Генетическое изучение микроорганизмов, создавшее фундамент для современной селекции, стало возможным только, когда были разработаны способы выделения клоновых культур, или клонов. *Клон* — это генетически однородное потомство одной клетки, например колония, возникшая из одной клетки при рассеивании культуры на плотной питательной среде. Исследуя свойства такой колонии, можно получить представление и о признаках породившей ее клетки.

Важно отметить, что при последующих пересевах клоновой культуры (и даже уже в самой колонии) в результате процесса изменчивости могут появиться варианты, отличающиеся от исходного. И тогда клоновая культура клеток превращается в генетически разнородную клеточную популяцию. Клоновая по происхождению культура, наследственная однородность которой поддерживается отбором по специфическим признакам, называется штаммом. Получение и поддержание высокопродуктивных штаммов — основная задача селекционной работы.

Важнейшим методом селекции микроорганизмов является *отбор мутантов*, т. е. организмов с измененными наследственными признаками, которые появляются в результате мутаций. В самом широком смысле мутацию можно определить как внезапно возникающее наследуемое изменение в генетическом материале клетки. Следует различать мутации цитоплазматические, затрагивающие внехромосомные генетические детерминанты, и ядерные, или хромосомные. В свою очередь, хромосомные мутации можно разделить на три основных типа: 1) изменение числа хромосом; 2) изменение числа и порядка расположения генов (перестройки хромосом или структурные изменения); 3) изменения индивидуальных генов (внутригенные изменения, или мутации в наиболее узком смысле этого слова) (Ш. Ауэрбах, 1978). В селекции микроорганизмов основное значение имеют последние два типа мутаций.

Хромосомные перестройки включают: выпадения участков хромосомы (делеции), удвоения (дупликации) или умножения (амплификации) числа отдельных генов или группы генов, вставки участков хромосом в новые места (транспозиции), обмен участками между хромосомами (транслокации), изменения порядка расположения генов на хромосоме (инверсии). Такие мутации могут вызывать как утрату функций, так и приобретение новых признаков, в частности в связи со слиянием генов, которые могут оказаться под контролем несвойственных им регуляторных элементов. При этом могут появиться гибридные белки, увеличиться (уменьшиться) количество продуктов определенных генов. За исключением амплификации, все хромосомные перестройки стабильны.

Внутригенные мутации изменяют последовательность оснований ДНК в пределах одного гена. Это могут быть выпадения

или вставки одного или нескольких оснований, нарушающие порядок считывания гена в процессе трансляции (frame-shift-мутации, или мутации со сдвигом рамки) В клетках такого типа мутанта синтезируется неактивный белок с измененной последовательностью аминокислот. При транзициях происходит замена какого-либо одного пурина (аденина или гуанина) или пиримидина (тимина или цитозина) на другой пурин или пиримидин соответственно. При трансверсиях пуриновые основания заменяются на одно из двух пиримидиновых и, наоборот, пиримидиновое основание — на одно из двух пуриновых.

Транзиции и трансверсии часто приводят к миссенс-мутациям (мутациям с изменением смысла), поскольку вызывают замену в белке одной аминокислоты на другую. Если кодируемая мутантным геном аминокислота оказывается сходной с той, которая кодировалась геном дикого типа (т. е. исходным родительским геном), то возникает мутантный фенотип лишь с частично нарушенной функцией (leaky-мутант). Часть мутаций с заменой оснований представляет собой нонсенс-мутации (бесмысленные мутации), которые обусловлены появлением кодонов, не кодирующих никакой аминокислоты. В этом случае синтез белка на измененном кодоне прерывается, а образующиеся незавершенные фрагменты белковой молекулы, как правило, функционально неактивны, в частности из-за быстрого их протеолиза. При протяженных делециях, удаляющих значительную часть гена, также синтезируются неактивные фрагменты белковых молекул.

Важной характеристикой мутантов является их способность к реверсии, т. е. обратному мутированию к исходному фенотипу. Мутанты, которые появляются в результате реверсии, называются *ревертантами*. При истинных обратных мутациях в ДНК восстанавливается исходная последовательность оснований. Так ревертируют точковые мутации — замены оснований, вставки или выпадения одного или нескольких нуклеотидов.

Кроме того, реверсии могут произойти благодаря супрессорным мутациям. При внутригенной супрессии вторая мутация возникает в том же гене, что и первичная мутация, и приводит к более или менее полному восстановлению функции белка. При внегенной супрессии вторая мутация затрагивает другой ген (ген-супрессор). Так, ошибки кодирования, связанные с нонсенс-мутациями и некоторыми мутациями со сдвигом рамки, могут частично исправляться мутациями в генах, кодирующих тРНК. Восстановленная активность поврежденного белка при этом обычно не превышает 10 % от исходного уровня.

Некоторые внегенные **супрессорные мутации** могут **стимулировать экспрессию** мутантных генов, т. е. частично компенсировать дефект поврежденного белка увеличением его количества. Кроме того, может активироваться альтернативный метаболический путь или же изменяться специфичность других белков, которые приобретают способность в большей или меньшей степени выполнять функцию поврежденного или отсутствующего

белка. Например, у мутантов *E. coli*, у которых делеция захватывает весь ген *lacZ*, кодирующий  $\beta$ -галактозидазу, можно получить ревертанты, приобретающие способность к усвоению лактозы. Оказалось, что при этом изменяется белок — продукт гена, обозначенного *ebg*, который в результате мутации приобретает способность катализировать расщепление различных  $\beta$ -галактозидов. Ген *ebg* никак не связан с *lac*-опероном и картируется на 66 мин. карты *E. coli* (В. Hall, 1981).

Ревертанты, которые возникают в результате внегенных супрессорных мутаций, иногда называют псевдоревертантами. Псевдоревертанты обычно заметно отличаются от исходного родительского типа. Нередко у них изменено множество признаков и снижена жизнеспособность, т. е. супрессорные мутации могут иметь плейотропный эффект.

Как известно, мутации являются первоисточником всех биологических изменений и наряду с процессом переноса генов обуславливают генетическую изменчивость, поставляющую материал для эволюции и искусственного отбора. По своему происхождению мутации бывают спонтанными и индуцированными.

Спонтанные, или неконтролируемые, мутации возникают с низкой частотой. Например, чтобы обнаружить колонию  $Lac^-$  (неспособность сбраживать лактозу) среди колоний культуры *E. coli* дикого типа (т. е.  $Lac^+$ ), необходимо просмотреть 100 000 клонов. Если есть возможность для отбора редких спонтанных мутантов, то задача упрощается. Можно просто высеять большое количество клеток на среду, где рост исходного штамма невозможен. Так получают мутанты, усваивающие новые субстраты, устойчивые к фагам, антибиотикам и другим ингибиторам метаболизма, а также к физическим агентам (температуре, pH и др.). Ревертанты ауксотрофных (т. е. нуждающихся в питательных добавках) мутантов отбирают на минимальных средах, не содержащих соответствующих факторов роста.

Успех генетико-селекционной работы нередко зависит от создания методов для селективного выделения спонтанных мутантов. Такие методы разрабатываются на основе всестороннего анализа возможных последствий интересующей мутации на клеточный метаболизм и тщательного изучения фенотипа соответствующего мутанта. Иногда для селективного выделения мутантов приходится конструировать специальные штаммы. Так, мутации, затрагивающие катаболизм нуклеозидов у *E. coli*, легко отбираются у тиминовых ауксотрофов как варианты со сниженной потребностью в тимине (В. В. Суходолец и др., 1974).

Когда невозможно провести прямой отбор мутантов, исследуют колонии на индикаторных чашках, применяют тест-культуры микроорганизмов или перепечатают колонии на различные среды, т. е. используют метод отпечатков, или реплик. Иногда приходится выращивать каждую колонию и определять в культуральной жидкости интересующую активность.

Индикаторные чашки дают возможность различать мутанты



по цвету колоний и проводить тестирование разнообразных фенотипов в больших популяциях. Такие чашки могут содержать среды с индикатором, выявляющим различие в рН между теми колониями, которые метаболизируют определенные углеводы, и теми, которые не обладают такой способностью. Так, на агаре с трифенилтетразолием колонии, не сбраживающие лактозу, приобретают ярко-красный цвет, а колонии, сбраживающие этот дисахарид, остаются неокрашенными. Используются также специально приготовленные субстраты, распадающиеся с образованием красителя при их гидролизе ферментами, наличие которых тестируется на этих чашках. Иногда вносят субстраты, изменяющие прозрачность сред, и наблюдают образование вокруг колоний мутантов зон просветления.

В качестве тест-культур используют ауксотрофы, дающие рост в том случае, если мутанты выделяют в среду искомым метаболит, а также чувствительные культуры, рост которых подавляется, если мутант продуцирует антибиотик. В этом случае по зоне роста или зоне ингибирования роста тест-культуры иногда можно составить представление о продуктивности мутанта. Следует отметить важность изучения морфологии колоний микроорганизмов, которая отражает биохимические особенности образовавших ее клеток. На структуру, форму и прозрачность колоний влияют даже те изменения в биосинтезе, прямая связь которых с компонентами клеточной поверхности не установлена. Так, ауксотрофность и устойчивость к некоторым ингибиторам роста у *E. coli* сопровождаются небольшими, но существенными изменениями характера колоний, что помогает распознавать мутанты (W. Graup et al., 1965).

В 1952 г. Д. Ледерберг и Э. Ледерберг ввели для непрямого отбора мутантов метод отпечатков (рис. 6). Согласно этому методу, чашки Петри засеваются с таким расчетом, чтобы на каждой из них выросло 50—200 колоний. Стерильный бархат или фильтровальную бумагу натягивают на металлический или деревянный цилиндр и закрепляют металлическим кольцом. Чашки с выросшими колониями переворачивают и прикладывают к бархату. Затем к этому же бархату (с отпечатками колоний на нем) прикладывают чистые чашки с различными средами. После соответствующей инкубации на них образуются колонии в том же расположении, что и на исходной (матричной) чашке. Если матричная чашка содержала полноценную среду, то отпечатками на минимальные среды можно выявить ауксотрофные мутанты. Различные модификации этого метода широко используются для выделения мутантов с питательными потребностями, а также мутантов, чувствительных к различным физическим, химическим и биологическим агентам (температура, антибиотики, фаги и др.).

Получение ауксотрофных мутантов с помощью метода отпечатков может быть облегчено, если обогащать ими популяцию клеток, используя пенициллин или его аналоги. Эти антибио-

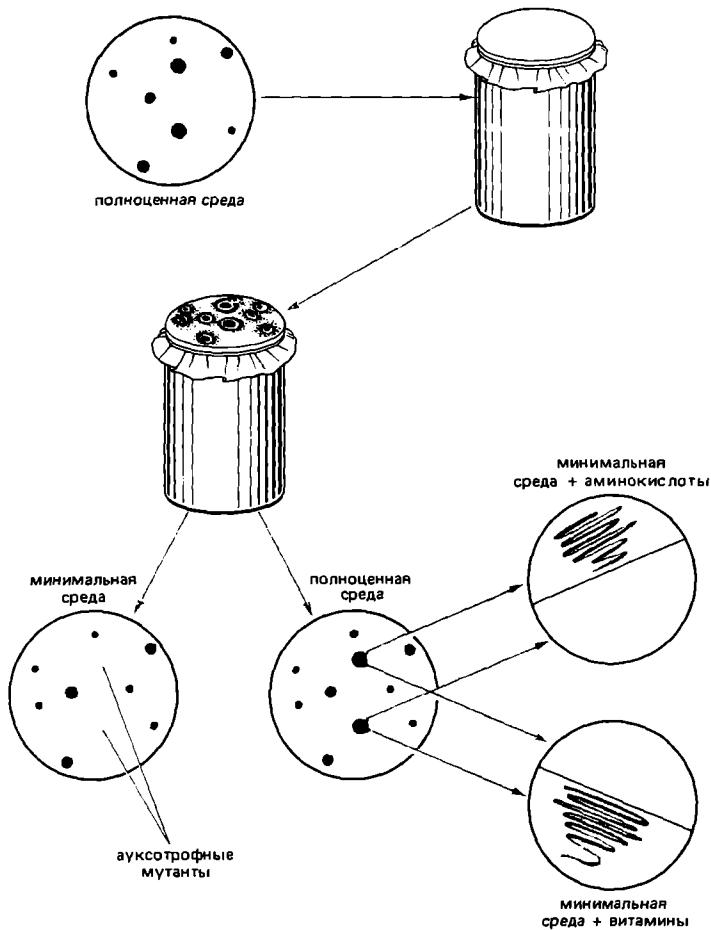


Рис. 6. Выделение ауксотрофных мутантов методом отпечатков

тики убивают только растущие клетки. Например, ауксотрофные по треонину мутанты *E. coli* не растут на минимальной среде без треонина. В этих условиях пенициллин будет убивать только прототрофные клетки. Однако полной селекции ауксотрофов эта процедура не обеспечивает. Иногда приходится проводить несколько циклов обработки пенициллином, попеременно выращивая бактерии в среде с треонином без пенициллина и в минимальной среде без треонина с пенициллином. После одного цикла достигается обогащение желаемыми мутантами в 1000 и даже в 10 000 раз. Следовательно, если необходимая мутация возникает спонтанно с частотой  $10^{-7}$ , то достаточно просмотреть не-

сколько тысяч колоний, выживших после обработки пенициллином, чтобы найти колонию с нужной мутацией.

В популяции спорообразующих форм долю ауксотрофных мутантов можно повысить прогреванием культур, прорастающих в минимальной среде. Поскольку чувствительность спор и вегетативных клеток к температуре различна, прорастающие прототрофы при нагревании погибают, а ауксотрофы, сохраняющиеся в виде спор, выживут и прорастут при переносе их в обогащенную среду.

У мицелиальных грибов для выделения ауксотрофных мутантов используют метод обогащения при фильтрации. Он основан на том, что при культивировании на минимальных средах прототрофные клетки делятся и образуют крупные задерживаемые фильтром частицы, а неделящиеся клетки промываются в фильтрат. Следует добавить, что методы обогащения с помощью пенициллина и фильтрации можно использовать для выделения мутантов, чувствительных к антибиотикам, повышенной температуре и т. д., если действие этих факторов обратимо останавливает рост клеток, но не убивает их.

Ауксотрофные мутанты представляют значительный интерес для селекции промышленных микроорганизмов. Например, используемые в промышленности эффективные продуценты лизина — это гомосериновые ауксотрофы глутаматпродуцирующих коринеподобных бактерий *Corynebacterium glutamicum*. Мутации ауксотрофности могут повышать выход целевого продукта, изменяя регуляцию его биосинтеза и отсекая побочные пути метаболизма. Распространенный прием получения продуктивных штаммов — это выделение ауксотрофов и отбор псевдоревертантов, несущих регуляторные мутации. Наконец, ауксотрофные мутанты используются при получении рекомбинантных штаммов в генетических скрещиваниях.

К сожалению, методы, повышающие содержание в культуре мутантов, особенно ценных для селекции промышленных штаммов-продуцентов, часто отсутствуют. В этих случаях не прямой отбор спонтанных мутантов становится чрезвычайно трудоемким, так как приходится просматривать десятки и сотни тысяч колоний. Содержание мутантов в микробной популяции можно резко повысить, если подвергнуть их мутагенезу, т. е. воздействию факторов физической, химической и биологической природы, способных вызывать мутации. В табл. 1 приведены некоторые мутагены, которые используют для индукции мутации у микроорганизмов.

Следует отметить, что в живых клетках существуют механизмы исправления (репарации) повреждений ДНК. Процессы репарации связаны с функционированием определенных ферментных систем, контролируемых соответствующими генами. Мутации в этих генах (а также в некоторых генах, ответственных за репликацию ДНК) превращают их в гены-мутаторы, существенно повышающие частоту спонтанных мутаций. Нор-

Таблица 1. Свойства некоторых мутагенов, используемых для индукции мутаций у микроорганизмов

Мутаген	Механизм действия	Тип мутации	Эффективность	Особенности и недостатки
<i>Радиация:</i> рентгеновское излучение, быстрые нейтроны УФ-облучение	Преимущественно разрывы хромосом	Делеции, инверсии	Высокая	Требует специального оборудования
	Димеризация пиримидинов	Транзиции, трансверсии, делеции	Средняя	Мутаген широкого спектра действия
<i>Химические агенты:</i> 2-аминопурин, 5-бромдезоксипуридин гидроксиламин азотистая кислота	Ошибки в репликации ДНК	Транзиции	Низкая	Относительно низкая эффективность
	Дезаминирование цитозина Дезаминирование цитозина и аденина	Транзиции, делеции	Средняя	Высокая частота мутаций только в условиях низкой выживаемости
нитрозогуанидин (НГ)	Алкилирование оснований в репликативной вилке	Транзиции, трансверсии, делеции (с низкой частотой)	Очень высокая	Высокая мутагенность при низкой летальности, множественные мутации
этилметансульфонат (ЭМС)	Алкилирование гуанина	Транзиции и трансверсии	Средняя	По сравнению с НГ меньше множественных мутаций
акридиновые красители, этидий бромид соединения типа ICR	Интеркаляция между основаниями во время репликации То же	Мутации со сдвигом рамки считывания, небольшие вставки и делеции Мутации со сдвигом рамки считывания, небольшие вставки и делеции	Низкая Высокая	Эффективны при излечивании клеток от плазмид Соединение, которое трудно достать
<i>Биологические агенты:</i> гены-мутаторы	Нарушение процессов репарации и репликации ДНК	Транзиции, трансверсии	Средняя	Требуют конструирования штаммов. Повышают частоту мутаций при обработке алкилирующими агентами
транспозоны (Тп5, Тп10, Тп17) и др.	Встраивание в ДНК	Вставки, делеции, инверсии	Очень высокая	Возможность прямой селекции мутаций. Требуют создания векторов
<i>Спонтанные мутации</i>	Воздействие на ДНК факторов внешней среды и интермедиатов клеточного метаболизма	Транзиции, трансверсии, делеции, вставки	Очень низкая	Широкий спектр мутаций (обычно одиночные)

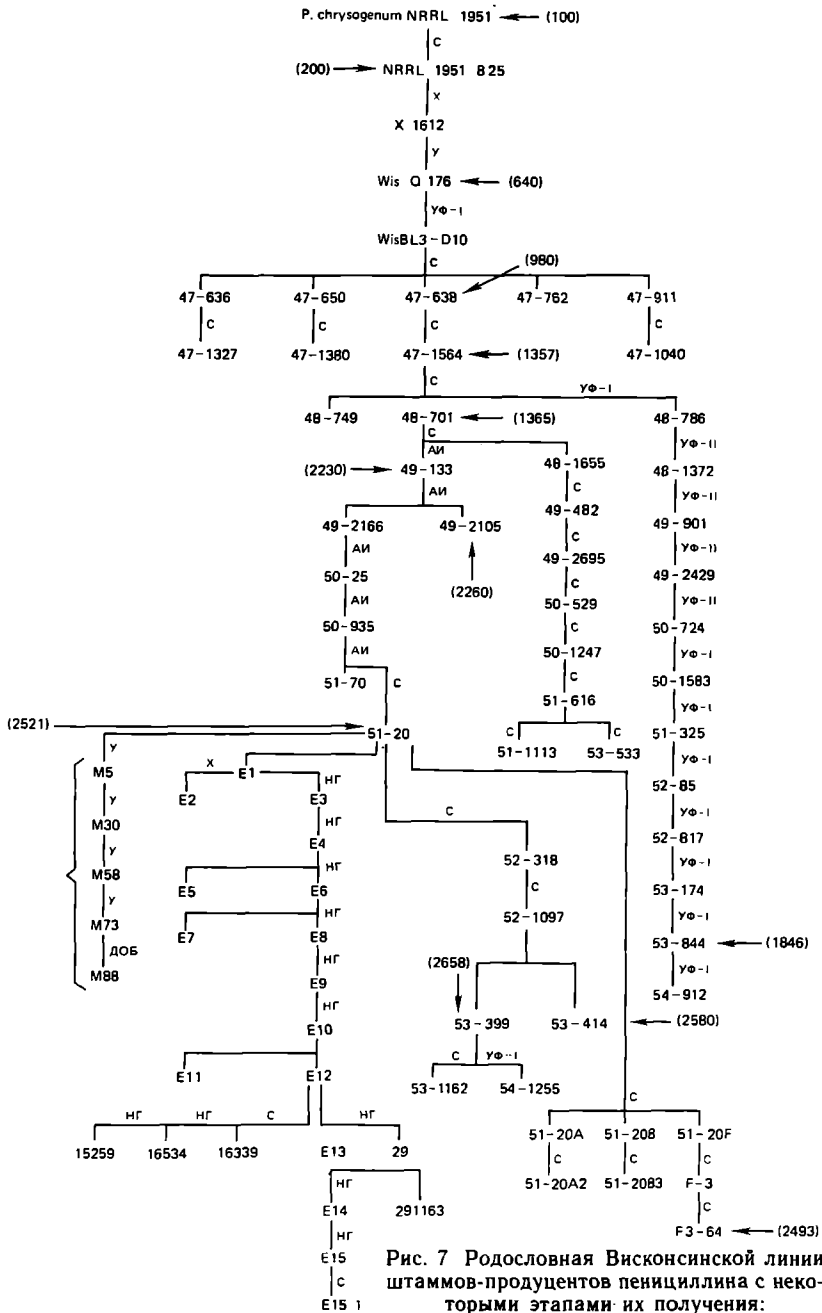
мальное функционирование систем репарации может сильно снизить эффективность мутагенеза. Известно, например, что видимый свет активирует ферменты, быстро расщепляющие пиримидиновые димеры, которые образуются в ДНК при УФ-облучении и обуславливают появление мутации (явление фотореактивации). Кроме того, в клетках бактерий существуют системы, которые исправляют повреждения ДНК, вызванные алкилирующими соединениями.

Выбор мутагена определяется типом мутации, которую желательно получить (т. е. делеция, замена оснований или сдвиг рамки считывания), а также эффективностью мутагена в отношении данного микроорганизма. Следует отметить, что разные виды микроорганизмов могут требовать разных доз и условий для эффективного мутагенеза.

Простым и удобным методом получения мутантов разного типа является УФ-облучение. Однако высокая частота мутаций достигается здесь при низкой выживаемости клеток. Кроме того, облучение необходимо проводить в условиях, исключающих фотореактивацию. Из химических мутагенов широкое применение в селекционной работе с микроорганизмами получил нитрозогуанидин. Алкилируя основания в точке репликации, где ДНК существует в одонитевой форме, он часто вызывает множественные мутации на ограниченном участке хромосомы (а также в различных районах хромосомы). Множественность мутаций, как правило, является негативным фактором, поскольку наряду с желательными мутациями могут возникать мутации, снижающие жизнеспособность клетки. Однако иногда полезный и стабильный признак может быть получен при одновременном изменении нескольких генов или даже нескольких участков одного и того же гена. Наличие селективных методов позволяет выделять такие мутанты, возникающие обычно с низкой частотой. Применение мутагенов повышает частоту мутантов в 100—1000 раз, что облегчает работу по их выделению методом отпечатков.

Индукцированный мутагенез и отбор продуктивных мутантов до настоящего времени остается важным методом повышения активности промышленных штаммов микроорганизмов, например в селекции продуцентов антибиотиков. При этом обработанную мутагеном культуру рассеивают на плотные питательные среды с таким расчетом, чтобы получить отдельные колонии, а затем исследуют каждый клон на продуктивность. Выделив более продуктивный вариант, процедуру мутагенеза и отбора повторяют, т. е. проводят *ступенчатый отбор*. Обычно ступенчатый отбор включает этапы мутагенеза, а также выделение спонтанных мутантов. Схема получения продуцентов этим методом имеет вид перевернутого дерева (рис. 7).

Применяя ступенчатый отбор, можно ничего не знать о путях биосинтеза целевого продукта и его регуляции, т. е. селекция на повышение активности штамма ведется, по существу, на основании априорного представления, что с помощью мутаций



**Рис. 7** Родословная Висконсинской линии штаммов-продуцентов пенициллина с некоторыми этапами их получения:

C — спонтанные мутации; X — рентгеновское излучение; Y — ультрафиолетовое излучение неизвестной длины волны; УФ1 — ультрафиолетовое излучение ( $\lambda = 275$  nm); УФН — ультрафиолетовое излучение ( $\lambda = 253$  nm); AI — азотистый иприт; НГ — нитрозогуанидин; ДОБ — диоксидбутан; цифрами в скобках указана активность в м. е.

можно увеличить его продуктивность. Исходя из того, что известно о регуляции метаболизма микробной клетки, это предположение вполне правомочно. Действительно, в процессе мутагенеза и отбора могут быть последовательно получены мутации, ведущие к конститутивному синтезу соответствующих ферментов, устраняющие ретроингибирование, катаболитную и азотную репрессию, повышающие пул предшественников целевого продукта, изменяющие клеточную энергетику и проницаемость мембран. Именно поэтому ступенчатый отбор дал замечательные результаты в селекции продуцентов антибиотиков, где с его помощью удалось повысить продуктивность штаммов в десятки и сотни раз.

Основной недостаток ступенчатого отбора — его колоссальная трудоемкость. Работа по созданию активного штамма этим методом нередко занимает многие годы. Кроме того, в процессе многократного мутагенеза помимо мутаций, повышающих продуктивность, в геноме продуцента накапливаются вредные мутации. Для элиминации таких мутаций можно получать ревертанты к дикому типу. Однако эта работа требует дополнительных усилий и не всегда приводит к желательному результату.

Следует отметить, что индукция мутагенами ревертантов используется для получения комутаций, которые возникают одновременно с реверсией мутации, блокирующей синтез целевого продукта, и имеют положительный эффект на его образование. Комутации могут изменять регуляторные свойства ключевых ферментов или затрагивать регуляторные участки соответствующих генов. Для получения комутаций чаще всего используют нитрозогуанидин.

Конструирование штаммов на основе ступенчатого отбора существенно упрощается и ускоряется, если использовать селективные и полуселективные методы, позволяющие отбирать нужные мутанты из большой популяции клеток. Многие из таких методов основаны на использовании структурных аналогов естественных метаболитов и субстратов. Например, в селекции продуцентов аминокислот широко применяют аналоги этих соединений. Действуя как ретроингибиторы или корепрессоры, аналоги выключают синтез естественных метаболитов, однако не могут заменить их функционально. Более того, нередко аналоги подавляют ферментативные реакции, в которых участвуют природные соединения. Поэтому на минимальной среде с аналогом выживают и образуют колонии лишь те клетки, у которых нарушены механизмы негативной регуляции биосинтеза соответствующей аминокислоты и которые вследствие этого избыточно ее синтезируют. (Устойчивость к аналогу могут вызывать также мутации, которые блокируют его поступление в клетку.) Часто проводят несколько этапов селекции, используя различные аналоги или повышающиеся концентрации одного и того же аналога, а также получая мутации аутокотрофности и мутации, вызы-

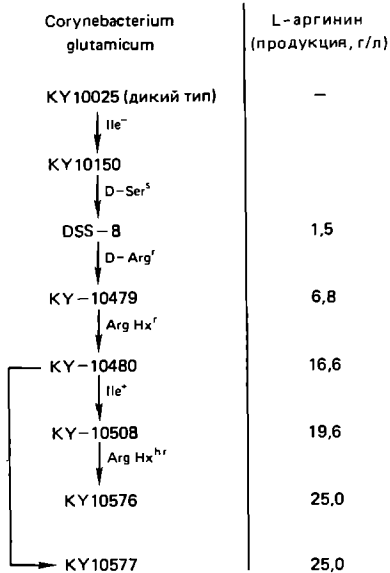


Рис. 8. Схема селекции штаммов — процентов L-аргинина с применением аналогов:

Ile<sup>-</sup> — потребность в изолейцине; D-Ser<sup>s</sup> — чувствительность к D-серину; D-Arg<sup>f</sup> — устойчивость к D-аргину; ArgHx<sup>f</sup> — устойчивость к гидроксамату аргинина; ArgHx<sup>hr</sup> — сверхустойчивость к гидроксамату аргинина

шенная продуктивность утрачиваются.

В селекции продуцентов ферментов важное значение имеет получение конститутивных мутантов. С этой целью можно использовать метаболизируемые аналоги субстратов, не способные вызывать индукцию. На чашках, где такие соединения являются единственными источниками углерода и энергии или азота, образуют колонии только мутанты, синтезирующие соответствующие ферменты конститутивно.

Синтез многих экзоферментов и антибиотиков подавляется легко усваиваемыми источниками углерода и энергии, а также азота. Для выделения мутантов, не чувствительных к катаболитной репрессии, используют неметаболизируемые аналоги глюкозы — α-метилглюкозид и 2-дезоксиглюкозу. Их добавляют в среду одновременно с субстратами, которые усваиваются, если отсутствует катаболитная репрессия. В этих условиях образуют колонии мутанты, у которых нарушены компоненты системы транспорта глюкозы (в результате мутаций типа pts G у *E. coli*) или же изменена регуляция генов, контролирующих усвоение соответствующих соединений, таким образом, что они утрачи-

вающие чувствительность клеток к некоторым метаболитам (рис. 8). Повышение продуктивности в процессе отбора связано с изменением дополнительных механизмов, регулирующих образование аминокислот (усиление эффективности промоторов, устранение побочных путей метаболизма, увеличение синтеза предшественников, изменение энергетики и проницаемости клетки). Конечным результатом должен стать высокий уровень синтеза естественного метаболита, позволяющий ему, в частности, конкурировать за ферментные системы клетки с новыми аналогами или повышенными концентрациями исходного аналога.

Следует указать и на такой механизм повышения устойчивости к аналогам, как дупликация или амплификация определенных генов. Это приводит к генетической нестабильности штамма, поскольку в отсутствие селективного давления в результате процесса рекомбинации множественные копии гена, а вместе с ними и повы-



вают чувствительность к катаболитной репрессии. Например, мутация *lac UV5* в промоторной области *lac*-оперона делает синтез ферментов этого оперона не чувствительным к присутствию глюкозы в среде.

Мутанты, не чувствительные к азотной репрессии, получают как формы, устойчивые к неметаболизируемым аналогам аммиака — метиламину, диметиламину, диэтиламину и др. Эти соединения вносят в среду одновременно с субстратами, усвоение которых подвержено репрессии аммиаком. При этом образуют колонии три типа мутантов: мутанты, у которых нарушена общая регуляция *Nit*-генов; мутанты, у которых изменена регуляция синтеза ферментов, контролирующего усвоение в качестве источника азота соответствующего субстрата, и, наконец, мутанты с блокированным транспортом аммиака (и его аналогов) в клетку.

Формы с измененными системами общей регуляции метаболизма в связи с нарушением процессов транскрипции и трансляции и их координации можно получать как варианты, устойчивые к антибиотикам, которые ингибируют соответствующие процессы. Так, мутация устойчивости к антибиотику тиострептону вызывает у бацилл фенотип *Rel<sup>-</sup>* (т. е. «ослабленный» аминокислотный контроль синтеза РНК) в связи с повреждением белка большей субъединицы рибосомы, участвующего в связывании фактора строгого контроля (см. гл. 1).

Мутации устойчивости к рифампицину повреждают РНК-полимеразу, а мутации устойчивости к стрептомицину — белок малой субъединицы рибосомы. Имеется сообщение, что устойчивость к этим антибиотикам повышает выход лизина у штаммов-продуцентов *Corynebacterium glutamicum*.

Как было отмечено ранее (см. гл. 1), энергетическое состояние может существенно влиять на процессы биосинтеза в клетке. Предполагается, например, что сверхсинтез пролина гистидинзависимыми и изолейцинзависимыми мутантами *Brevibacterium flavum* связан с увеличением у них внутриклеточного пула АТФ. С другой стороны, избыток неорганического фосфата в среде, повышая пул АТФ, подавляет синтез антибиотиков хлортетрациклина и кандицидина соответствующими продуцентами *Strept. aureofaciens* и *Strept. griseus*. Энергетические процессы могут быть изменены в желательном направлении у устойчивых к ингибиторам дыхания, а также аналогам продуктов ЦТК и гликолиза мутантов, которые можно отбирать на средах, содержащих указанные соединения.

Важным методом повышения продуктивности промышленных штаммов микроорганизмов является изменение работы систем, обеспечивающих перенос веществ через мембраны. Известно, что так называемые глутаматпродуцирующие коринеподобные бактерии (*Cor. glutamicum*, *Br. flavum*), которые используются в селекции продуцентов аминокислот, нуждаются в биотине. В условиях, когда рост этих микроорганизмов лимити-

руется количеством биотина в среде, они начинают эффективно продуцировать глутаминовую кислоту. Показано, что дефицит биотина, который является кофактором одного из ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот, изменяет фосфолипидный состав мембраны. В результате она становится проницаемой для многих молекул. Этот дефект мембраны вызывает выход из клетки главным образом глутамата, который является основным компонентом пула свободных аминокислот в клетке. В свою очередь, снижение внутриклеточной концентрации глутамата, очевидно, устраняет негативный контроль его новообразования и способствует дальнейшему синтезу аминокислоты.

Максимальная продукция другого первичного метаболита, ИМФ, аденинзависимыми мутантами *Brevibacterium ammoniagenes* наблюдается при ограниченном содержании в среде ионов  $Mn^{2+}$ . Показано, что в этих условиях изменяется липидный и белковый состав мембраны бактерий, которая становится проницаемой для ИМФ и других низкомолекулярных соединений, а также для некоторых ферментов.

Неспецифическое увеличение проницаемости плазматической мембраны может стимулировать также продукцию антибиотиков, других вторичных метаболитов и некоторых экзоферментов. По-видимому, и в этих случаях облегчается выход продукта из клетки и устраняется негативный контроль его биосинтеза.

Усиление проницаемости мембраны может быть достигнуто изменением состава среды (ограничением содержания биотина, ионов марганца, введением антибиотиков, поверхностно-активных соединений и жирных кислот), а также с помощью мутаций. Так, известны мутанты *Cor. glutamicum*, которые продуцируют глутамат даже при избытке биотина, и мутанты *Br. ammoniagenes*, которые продуцируют ИМФ при избытке  $Mn^{2+}$  в среде. Применение таких мутантов облегчает ведение процесса ферментации и повышает рентабельность производства.

Большой практический интерес представляют мутации устойчивости к антибиотикам, подавляющим синтез компонентов мембраны и клеточной стенки, а также к поверхностно-активным соединениям. Мутанты, устойчивые к пенициллину, бацитрацину, полимиксину, нистатину, кабицидину и другим аналогично действующим соединениям, могут быть селективно получены на средах, содержащих ингибирующие концентрации этих антибиотиков. У них часто наблюдается изменение проницаемости клеточной мембраны, повышающее их продуктивность. Так, устойчивые к пенициллину мутанты *Cor. glutamicum* продуцируют на 15—20% больше лизина, чем исходные чувствительные штаммы. Мутанты *Cephalosporium acremonium*, устойчивые к нистатину, кабицидину или трихомицину, выделяют в среду более 10 г/л цефалоспорина С.

Резистентные к кабицидину мутанты *Fusarium* эффективно продуцируют эргостерол и щелочную протеиназу. А мутант

*Trichoderma reesei*, устойчивый к этому антибиотику, секретирует повышенное количество целлюлазы.

Увеличение продуктивности некоторых фагоустойчивых штаммов актиномицетов, продуцентов антибиотиков, также может быть связано с изменением плазматической мембраны.

Однако неспецифическое повышение проницаемости мембран часто приводит к накоплению в культуральной жидкости большого числа различных соединений. Это уменьшает эффективность образования целевого продукта и затрудняет его выделение и очистку. Кроме того, нарушение нормальной структуры мембраны снижает жизнеспособность микроорганизмов и делает их непригодными для использования, например, в процессах, связанных с иммобилизованными клетками. Поэтому возможность активации специфических систем экскреции и экспорта имела бы большое значение для селекции промышленных штаммов микроорганизмов.

Другой подход связан с получением мутантов, у которых нарушен активный транспорт метаболитов в клетку. Такие мутанты могут быть отобраны как формы, устойчивые к действию токсичных аналогов соответствующих соединений. Обнаружено, что мутанты *Br. flavum*, у которых нарушен активный транспорт глутамата в клетки, продуцируют его почти на 10% больше, чем исходный штамм. По-видимому, прекращение реаккумуляции глутамата вызывает дальнейшее снижение его внутриклеточной концентрации, что стимулирует его синтез.

Показано также, что штаммы *E. coli*, несущие мутацию, вызывающую сверхсинтез пролина, выделяют его в среду только в том случае, если у них одновременно блокирован катаболизм и активный транспорт этой аминокислоты, что нарушает ее возврат в клетку.

Таким образом, в распоряжении селекционеров имеется большой арсенал селективных и полуселективных методов выделения мутантов с измененной регуляцией метаболизма, позволяющий более успешно вести отбор продуктивных штаммов микроорганизмов. Тем не менее эта работа в силу указанных ранее причин требует больших трудозатрат и много времени. Недостатки ступенчатого отбора могут быть в значительной мере преодолены, если сочетать его с методами генетического обмена.

## § 2. Гибридизация эукариотических микроорганизмов

Генетическая рекомбинация перераспределяет гены или части генов и позволяет объединять в одном геноме признаки двух организмов и более. В результате образуются гибридные или рекомбинантные клетки, сочетающие свойства родительских форм. К рекомбинации ведут различные процессы обмена наследственной информацией живых клеток: половой и парасексуальный процессы у эукариотических микроорганизмов, конъюгация, трансдукция и трансформация у прокариот, а также

такой универсальный способ получения гибридных клеток, как слияние протопластов.

В опыты по гибридизации обычно берут генетически маркированные штаммы микроорганизмов — чаще всего ауксотрофные мутанты и мутанты, устойчивые к ингибиторам роста. Это позволяет выявлять колонии, совмещающие признаки обоих родителей.

Образование гибридов у дрожжей, грибов и водорослей происходит в результате слияния клеток (копуляции). Если исходные клетки были гаплоидными (т. е. содержали только один набор хромосом), то в результате последующего слияния ядер (кариогамии) появится диплоидная клетка (зигота), несущая два набора хромосом в одном ядре (рис. 9). У некоторых микроорганизмов, например у *Neurospora crassa*, диплоидное ядро сразу же подвергается мейозу. Vegetативные диплоиды у этого организма неизвестны. В ходе мейоза каждая из хромосом продольно расщепляется и какое-то время состоит из двух сестринских хроматид. Гомологичные хромосомы образуют пары и обмениваются частями своих хроматид в результате кроссинговера (рассмотрение механизмов кроссинговера не входит в задачи этой книги). Затем формируются гаплоидные половые споры, каждая из которых может содержать новый набор генов, которыми различались родительские клетки, в результате рекомбинации генов одной и той же хромосомы, а также разных хромосом при перераспределении хромосомных пар (рис. 9).

У аспергилл, дрожжей-шизосахаромицетов, водоросли хламидомонады диплоидное ядро иногда начинает делиться и образуются диплоидные вегетативные клетки. С другой стороны, у дрожжей-сахаромицетов вегетативные клетки обычно диплоидны, а мейоз и образование гаплоидных половых спор происходит лишь в специальных условиях.

Если после слияния клеток ядра не сливаются, то образуются формы со смешанной цитоплазмой и ядрами разного происхождения — гетерокарионы. Более или менее устойчиво сохраняющиеся гетерокарионы свойственны мицелиальным грибам, например пенициллам. Гетерокарионы и гетерозиготные диплоиды, образующиеся при слиянии генетически разнородных клеток, имеют ряд общих свойств. И в том, и в другом случае в цитоплазму поступают продукты активности каждого из двух гомологичных генов, происходящих от обеих родительских клеток. В связи с этим наблюдается явление доминирования, т. е. проявление или преобладание признака одного из родителей. Например, способность к синтезу какого-либо метаболита обычно доминирует над рецессивным признаком — неспособностью к его образованию. Доминантность и рецессивность определяются свойствами аллелей, т. е. гомологичных генов, находящихся в альтернативных состояниях.

При размножении полученного в результате гибридизации гетерозиготного диплоида или гетерокариона происходит расщеп-

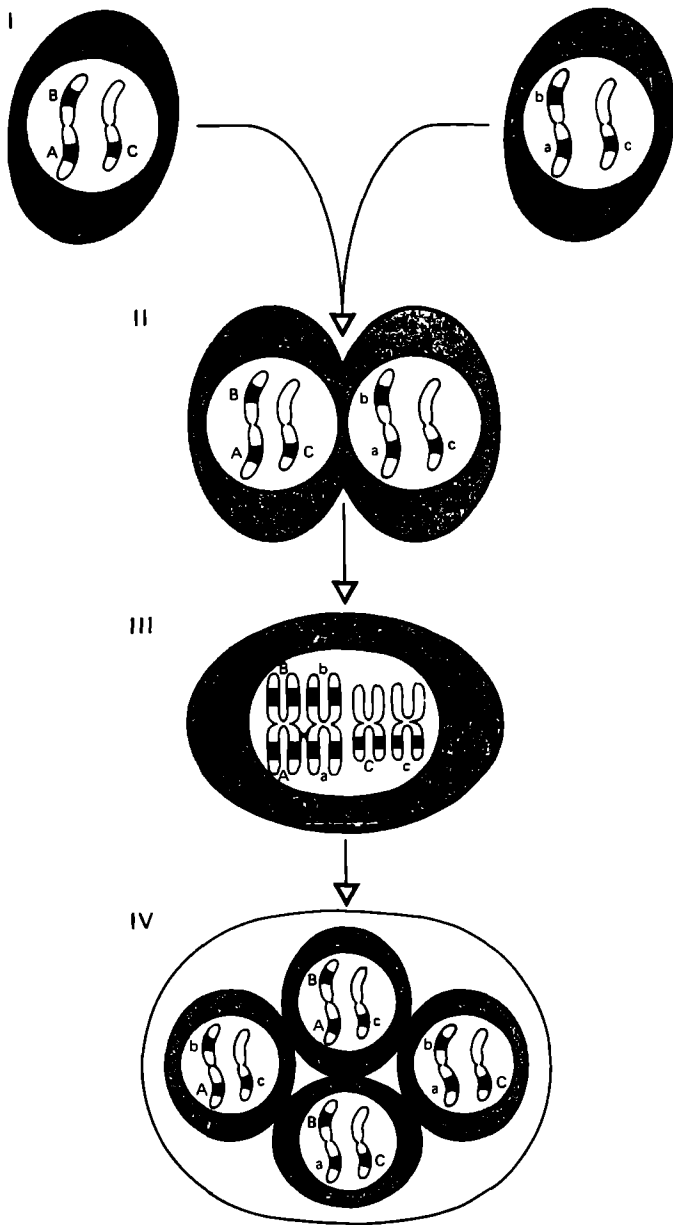


Рис. 9. Схема рекомбинации у эукариот (по Д. Хопвуду, 1984):  
 I — гаплоидные клетки; II — слияние клеток; III — слияние ядер,  
 (содержащих две хромосомы), образование диплоидной клетки, мейоз;  
 IV — формирование гаплоидных клеток с новым набором хромосом

ление — появление в потомстве форм, обнаруживающих не только доминантные, но и рецессивные признаки родителей. У эукариотических микроорганизмов расщепление обычно происходит при мейозе, а иногда и при митотических делениях. Например, у несовершенных грибов, утративших половую стадию, наблюдается так называемый парасексуальный процесс. Он заключается в образовании гетерокарионов, а затем гетерозиготных диплоидов (при слиянии ядер), которые при митотических делениях выщепляют рекомбинантные формы.

Половой и парасексуальный процессы широко используются в генетических исследованиях с эукариотическими микроорганизмами, но пока не так часто — в селекционной работе с ними. Гибридизация промышленных штаммов дрожжей осложняется тем, что они во многих случаях полиплоидны, т. е. содержат несколько наборов хромосом, и у них редко наблюдается слияние клеток. Тем не менее скрещивание разных линий (и даже разных видов) сыграло важную роль в создании эффективных штаммов дрожжей, которые используются для быстрой выпечки хлеба современными промышленными методами, а также в пивоварении и в производстве спирта. При этом объединение в одном организме свойств двух родительских форм достигается в результате проявления у диплоидного гибрида всех доминантных признаков исходных клеток. Благодаря вегетативному размножению, которое может продолжаться неопределенно долго, такие диплоиды стабильно сохраняются в производственных условиях.

Совмещение ценных качеств родителей при гибридизации эукариотических микроорганизмов может происходить также вследствие рекомбинации, к которой приводит мейоз или митотическое расщепление.

Мицелиальные грибы — продуценты важных антибиотиков и ферментов — уже длительное время являются объектом интенсивной селекции. Однако ступенчатый отбор, который дал столь значимые результаты в работе с пенициллами (увеличение выхода пенициллина в 400 раз), во многих случаях себя исчерпал. Дальнейшее повышение продуктивности, улучшение технологических характеристик и создание штаммов, способных синтезировать новые антибиотики, по-видимому, будет достигнуто с помощью генетического конструирования на основе гибридизации и клонирования генов.

### § 3. Плазмиды и конъюгация у бактерий

Основным и обязательным генетическим элементом прокариотических клеток является хромосома, организованная в виде репликона, т. е. структуры, способной к самостоятельной репликации. Хромосома *E. coli* и, вероятно, всех других бактерий представляет собой кольцевую молекулу ДНК. Ее репликация, инициируемая на специфическом участке *oriC* (от англ. *origin* — начало), направлена в обе стороны и завершается в опре-

деленной точке — терминусе (terC). Окончание репликации хромосомы, по-видимому, является сигналом для начала клеточного деления. Молекулярная масса хромосомной ДНК энтеробактерий составляет около  $3 \cdot 10^9$  Д. Наряду с хромосомой в бактериальной клетке может присутствовать дополнительный генетический материал в виде плазмидной или фаговой ДНК. Плазмидами (или внехромосомными генетическими элементами) называются репликоны, стабильно наследуемые во внехромосомном состоянии. Молекулярная масса известных плазмид варьирует от  $1,5 \cdot 10^6$  до  $3 \cdot 10^8$  Д (или от 1,5 до 300 МД). 1 МД (мегадальтон) эквивалентен примерно 1500 парам оснований (п. о.), что достаточно для кодирования 1—2 белков среднего размера.

В клетке может содержаться от 10 до 200 копий мелких плазмид, в то время как число крупных плазмид составляет обычно 1—4 на хромосому. Иногда бактерии содержат несколько плазмид разной молекулярной массы и количество плазмидной ДНК может быть сопоставимо с содержанием ДНК в бактериальной хромосоме.

Некоторые плазмиды не способны стабильно сосуществовать в одной и той же клетке, т. е. они несовместимы. Изучение несовместимости плазмид разного происхождения привело к распределению их на группы несовместимости — Inc-группы (от английского *incompatibility* — несовместимость). К одной группе несовместимости обычно относят плазмиды, которые несовместимы между собой, но совместимы с любой плазмидой из других групп (N. Datta, 1979). Плазмиды, относящиеся к одной Inc-группе, обладают, как правило, многими сходными признаками и часто обнаруживают значительную гомологию ДНК.

Плазмиды, по-видимому, вездесущи, поскольку они выявлены в клетках десятков видов грамположительных и грамотрицательных, аэробных и анаэробных бактерий, а также актиномицетов, цианобактерий и архебактерий. Аналогичные образования существуют и в эукариотических клетках. Вместе с тем они не являются обязательным компонентом генома и многие природные штаммы не содержат плазмид.

Молекулы плазмидных ДНК могут обнаруживаться как в кольцевой, так и в линейной двухцепочечных формах\*. Нативная плазмидная ДНК, выделяемая из клеток с помощью мягких методов, представляет собой сверхскрученные ковалентно замкнутые кольцевые молекулы. Если происходит разрыв одной нити ДНК, возникают открытые кольцевые, или релаксированные, молекулы. При двунитевых разрывах образуются линейные формы (рис. 10). Огромные молекулы ДНК хромосом при разрушении клеток обычно многократно разрываются и образуют линейные фрагменты. Один из методов выделения плазмид-

---

\* Недавно показано, что некоторые плазмиды могут находиться в клетке в кольцевой одноцепочечной форме (H. Te Riele et al., 1986).

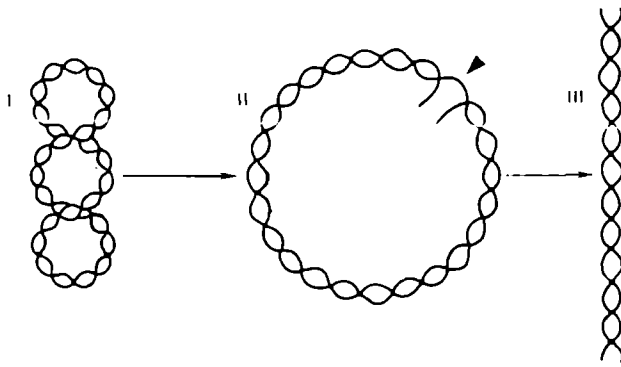


Рис. 10. Формы молекул ДНК плазмид

*I* — сверхскрученная молекула, у которой обе цепи ковалентно замкнуты.  
*II* — релаксированная двуцепочечная молекула; *III* — линейная двуцепочечная молекула; стрелкой указано место разрыва одной из цепей ДНК

ных ДНК основан на том, что ковалентно замкнутые кольцевые молекулы хуже связывают этидий бромид и поэтому при обработке этим красителем сохраняют большую плотность, чем другие формы молекул. Кроме того, для очистки плазмид используют то обстоятельство, что в щелочных растворах вследствие разрывов водородных связей цепи линейных (а также открытых кольцевых) молекул ДНК разъединяются, давая начало одноцепочечным молекулам, тогда как цепи ковалентно замкнутых кольцевых молекул не могут полностью отделиться друг от друга и эффективнее ренатурируют после нейтрализации раствора.

Важнейшими компонентами плазмидного репликона являются детерминанты, регулирующие его репликацию. К ним относятся:

1. Последовательность нуклеотидов, на которой происходит инициация репликации (*oriV*). Некоторые плазмиды могут содержать два и даже три таких участка.

2. Структурный ген (гены), контролирующий репликацию (*rep*).

3. Генетические детерминанты, негативно контролирующие количество плазмидных копий (*cop*).

4. Генетические детерминанты, обеспечивающие распределение плазмидных копий между дочерними клетками (*par*).

Репликация плазмид в значительной степени зависит от клетки-хозяина. Мутации, нарушающие репликацию бактериальной хромосомы, обычно влияют и на репликацию плазмид. Принято считать, что репликация плазмид, которые существуют в 1—4 копиях на клетку, подвержена строгому контролю. В то же время контроль репликации многокопийных плазмид является ослабленным, что ведет к колебаниям количества их копий.

Внехромосомные генетические элементы нередко изменяют фенотипические свойства клеток. Это связано с тем, что они могут нести детерминанты устойчивости к антибиотикам (*R*-



плазмиды) и ионам тяжелых металлов, содержать гены, контролирующие катаболизм некоторых органических соединений (плазмиды биодegradации, или D-плазмиды), определять синтез токсинов, бактериоцинов, антибиотиков, а также другие признаки. Многие плазмиды, молекулярная масса которых обычно превышает 25 МД, имеют генетические системы, детерминирующие перенос плазмид в другие клетки в результате конъюгации. *Конъюгацией называется процесс генетического обмена, сопровождаемый переносом генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при непосредственном контакте клеток между собой.* По способности к конъюгационному переносу плазмиды делят на конъюгативные и неконъюгативные.

Система конъюгационного переноса такой плазмиды, как F-фактор, которая изучена лучше других, контролируется более чем 20 генами, занимающими область протяженностью в 33 тысячи пар оснований (т. п. о.), что составляет  $\sim 1/3$  всей плазмидной ДНК (N. Davidson et al., 1975). Эта система обеспечивает осуществление двух основных этапов процесса конъюгации: во-первых, образование скрещивающихся пар и во-вторых, перенос и репликацию ДНК. Для образования скрещивающихся пар совершенно необходимы половые ворсинки — пили, которые формируются на поверхности донорных клеток. Образование пилей контролируется 12 генами, входящими в состав большого *tra*-оперона, причем ген *traA* определяет синтез белка-предшественника пилина, из которого строятся пили. Другие *tra*-гены участвуют в стабилизации скрещивающихся пар.

Из клетки донора в клетку реципиента переносится только одна нить плазмидной ДНК начиная со специфического сайта *oriT*, где с помощью продуктов генов *traY* и *traZ* образуется одностранный разрыв (R. Everett, N. Willetts, 1980). Затем с участием продукта гена *traD* происходит разделение нитей ДНК, необходимое для инициации переноса и комплементарного синтеза ДНК как в клетке донора, так и в клетке реципиента. Завершающий этап этого процесса связан с образованием кольцевых структур плазмидных ДНК.

Экспрессия *tra*-генов регулируется на генетическом уровне. Транскрипция *tra*-оперона требует присутствия продукта гена *traJ*, выражение которого, в свою очередь, репрессируется совместным действием продуктов двух генов: *finO* и *finP*. Плазмида F (и это является ее особенностью) не образует продукт гена *finO*, и поэтому система конъюгационного переноса у нее дерепрессирована (*drd*). У многих других плазмид, таких, как R1 и ColI, способность к конъюгационному переносу репрессируется. Так, например, только 0,02% популяции клеток *E. coli*, содержащих ColI плазмиды, являются эффективными донорами. Однако у этих плазмид могут возникать дерепрессированные мутанты типа R1 *drd19*. Пока не ясно, какие физиоло-

гические условия и факторы среды контролируют экспрессию *tra*-генов. Однако, поскольку образование пилей связано с затратами клеточных ресурсов, а сами они обуславливают чувствительность бактерий к так называемым донорспецифичным фагам, прекращение функционирования *tra*-оперона может иметь для клетки приспособительное значение.

Неконъюгативные плазмиды не содержат детерминантов, придающих бактериальным клеткам свойства генетических доноров, и поэтому они не способны самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Однако такие плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Перенос неконъюгативных плазмид конъюгативными называется мобилизацией. При этом неконъюгативная плаزمида является мобилизуемой, а конъюгативная — мобилизующей.

Известно два основных механизма мобилизации неконъюгативных плазмид. Во-первых, перенос неконъюгативной плазмиды может осуществляться за счет продуктов *tra*-генов конъюгативной плазмиды. Он начинается с собственного сайта *ori T* мобилизуемой плазмиды и требует функционирования ее собственных генов *mob*. Так осуществляется мобилизация плазмид Col E1 и RSF1010. Важно отметить, что перенос конъюгативной плазмиды в реципиентную клетку в этом случае может и не происходить. Роль собственных генов мобилизуемой плазмиды в процессе переноса до конца не установлена. Предполагается, что мутанты *Mob<sup>-</sup>* плазмиды ColE1, дефектные по мобилизуемости, не способны синтезировать белок, который осуществляет одонитевый разрыв (*nick*) плазмидной ДНК, необходимый для начала ее переноса. Кроме того, у таких мутантов может быть нарушена нуклеотидная последовательность, с которой связываются белки мобилизации.

Во-вторых, неконъюгативные плазмиды могут переноситься в реципиентные клетки в составе коинтеграторов с конъюгативными плаزمидами. Коинтегратор представляет собой единую молекулу ДНК, в который объединены два (или более) репликона, каждый из которых способен к независимой репликации (R. Novick et al., 1976). Образование коинтеграторов может происходить за счет *гес А*-зависимой реципрокной рекомбинации по участкам гомологии между плазмидами (репликонами). Такие участки могут создаваться, в частности, перемещающимися генетическими элементами (IS-элементами и транспозонами). Если только один из двух репликонов несет в своем составе IS-элемент или транспозон, то между ними может образоваться коинтегратор как промежуточный продукт транспозиции (см. § 5 гл. 2 и рис. 16). В этом случае процесс мобилизации, так же как и процесс транспозиции, является *гесА*-независимым. Иногда образующиеся коинтеграторы могут быть довольно стабильны.

Следует отметить, что некоторые природные плазмиды изначально являются коинтегративными. Так, например, родственные плазмиды R1, R6 и R100 состоят из так называемого RTF

(resistance transfer factor) и  $\gamma$ -детерминанта. RTF-компонент содержит гены, контролирующие конъюгационный перенос плазмиды и ген резистентности к тетрациклину, тогда как  $\gamma$ -детерминант — гены резистентности к нескольким антибиотикам (P. Sharp et al., 1973). Перечисленные плазмиды в определенных условиях могут диссоциировать на составляющие их компоненты.

Плазмиды могут находиться как в автономном, так и в интегрированном состоянии по отношению к хромосоме клетки-хозяина. В последнем случае, по существу, образуется коинтегра́т между плазмидой и хромосомой.

Важным свойством конъюгативных плазмид является их способность к мобилизации хромосомных генов, которая используется для получения генетических рекомбинантов у бактерий. Впервые конъюгационный перенос хромосомных генов был обнаружен у *E. coli* K-12 (J. Lederberg, E. Tatum, 1946) и оказался связанным с F-фактором. Клетки, несущие эту плазмиду в автономном состоянии, не являются, однако, эффективными донорами. Процесс включения F-фактора в хромосому *E. coli* зависит от продукта гена *hcs A* и, по-видимому, осуществляется в результате реципрокной рекомбинации по участкам гомологии между плазмидой и хромосомой, которые создаются IS2, IS3 и гамма-дельта ( $\gamma$  1000) последовательностями. При этом образуются донорные клетки типа Hfr (High frequency of recombination — высокая частота рекомбинации), способные с высокой частотой передавать хромосомные гены в  $F^-$ -клетки реципиента (рис. 11).

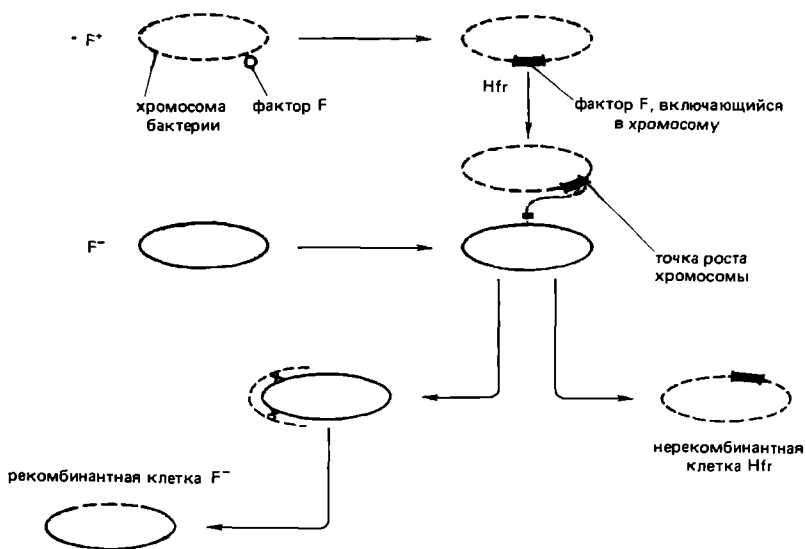


Рис. 11. Схема конъюгационного скрещивания у *E. coli*

Этот процесс можно рассматривать как самоперенос фактора F, в состав которого включена бактериальная хромосома.

Для конъюгационного скрещивания культуры донора и реципиента смешивают и инкубируют совместно в питательном бульоне или на поверхности твердых агаризованных сред. В этих условиях клетки Hfr и F<sup>-</sup> соединяются между собой при помощи конъюгационного мостика, через который в реципиентную клетку начиная с сайта ori T плазмиды поступает хромосома донора. При 37°C для переноса всей хромосомы требуется около 90 мин, однако в большинстве случаев клетки расходятся до того, как вся хромосомная ДНК успеет перейти. Основная часть фактора F обычно не передается, поскольку он располагается на дистальном конце хромосомы, который переносится крайне редко. Таким образом, при конъюгационных скрещиваниях, как правило, образуются мерозиготы, содержащие только часть генетического материала донора. Затем донорная ДНК спаривается с гомологичной областью хромосомы реципиента и происходит кроссинговер, ведущий к образованию рекомбинантных клеток (рис. 11).

Конъюгация открывает широкие возможности для генетического анализа и конструирования штаммов бактерий. Время вхождения генетических маркеров донора в реципиентную клетку отражает их локализацию на хромосоме. Это используется для картирования генов в опытах с прерыванием конъюгации (F. Jacob, E. Wollman, 1958). Построение генетических карт облегчает генетическое конструирование микроорганизмов и изучение регуляции различных клеточных процессов.

Конъюгативные плазмиды обнаружены у различных грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также у актиномицетов. Понимание общих механизмов, обеспечивающих мобилизацию хромосомных генов, применение транспозонов и генно-инженерных подходов позволяет создавать на основе таких плазмид системы конъюгации для промышленно важных видов бактерий. Так, плазмиды Inc P1-группы несовместимости (RP4, R68.45), имеющие широкий круг хозяев и способные передаваться в десятки видов грамотрицательных бактерий, были использованы для мобилизации хромосомных генов у представителей родов *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Erwinia*, *Methylobionas*, *Zymomonas* и др. (B. Holway, 1980). Плазмида рАМβ1, выделенная из *Streptococcus faecalis*, переносится в клетки различных видов стрептококков, *Lactobacillus casei*, *Bac. subtilis*, *Clostridium acetobutilicum*, *St. aureus* и, вероятно, других грамположительных бактерий. Другая конъюгативная плазмида рP501, обнаруженная у *Streptococcus agalactiae*, способна поддерживаться как в клетках ряда грамположительных бактерий, так и в *E. coli* (E. Masgrin et al., 1982). Указанные плазмиды мобилизуют перенос неконъюгативных плазмид, а также хромосомных генов. Так, имеется сообщение о мобилизации плазмидой рАМβ1 хромосомных ге-

нов *Bac. subtilis* (O. Landman et al., 1981). Долгое время считалось, что конъюгация у этого организма не существует. Недавно был обнаружен конъюгационный перенос плазмид и у самих бацилл, в частности у энтомопатогенной бактерии *Bac. thuringiensis* (J. Gonsales Jr., et al., 1982). Однако механизм этого переноса пока не изучен.

Разрабатывая системы конъюгационного переноса на основе плазмид с широким кругом хозяев, следует учитывать возможные барьеры, которые препятствуют конъюгации. Клетки некоторых штаммов, особенно неродственных видов, могут быть не способными вступать в контакт. Иногда не определены оптимальные условия для скрещиваний. Попав в клетку-реципиент, донорная ДНК может стать мишенью для ферментов рестрикции. Чужеродные плазмиды должны либо использовать систему репликации реципиентной клетки, либо обладать собственной системой репликации. Они не должны нарушать клеточные процессы реципиента и быть совместимыми с уже существующими плазмидами.

Плазмиды, интегрированные в хромосому, могут исключаться из нее и снова переходить в автономное состояние. Иногда этот процесс сопровождается захватом соседних бактериальных генов, которые становятся частью плазмидного репликона. При этом образуются так называемые F'- или R'-факторы. Они часто используются в генетических экспериментах (изучение доминантности мутаций, создание штаммов типа Hfr с определенным началом переноса хромосомы, локализованный мутагенез, изучение экспрессии чужеродных генов).

Конъюгация все чаще применяется при конструировании промышленных штаммов микроорганизмов. Используя этот метод, можно легко получать генетические рекомбинанты, проводить мобилизацию неконоъюгативных плазмид, создавать гибридные (коинтегративные) плазмиды, объединять различные плазмиды в одной клетке.

Ярким примером создания микроорганизма с помощью переноса природных плазмид служит получение штамма *Ps. putida*, способного утилизировать большинство основных углеводов нефти. Многие псевдомонады несут плазмиды, каждая из которых кодирует ферменты, необходимые для расщепления одного-единственного класса углеводов. Плазида ОСТ обуславливает расщепление октана, гексана и декана, плазмиды ХУЛ — ксилола и толуола, САМ — камфоры, НАН — нафталина. Две из этих плазмид, САМ и НАН, являются конъюгативными, а две другие, ОСТ и ХУЛ, мобилизуются указанными плазмидами. В результате последовательных скрещиваний был получен штамм *Ps. putida*, несущий плазмиды ХУЛ и НАН и гибридную плазмиду, вероятно, коинтеграат, содержащий плазмиды ОСТ и САМ (рис. 12). Такая мультиплазмидная бактерия энергично растет, усваивая неочищенную нефть, поскольку она утилизует гораздо больше углеводов, чем любая бактерия с одной плаз-

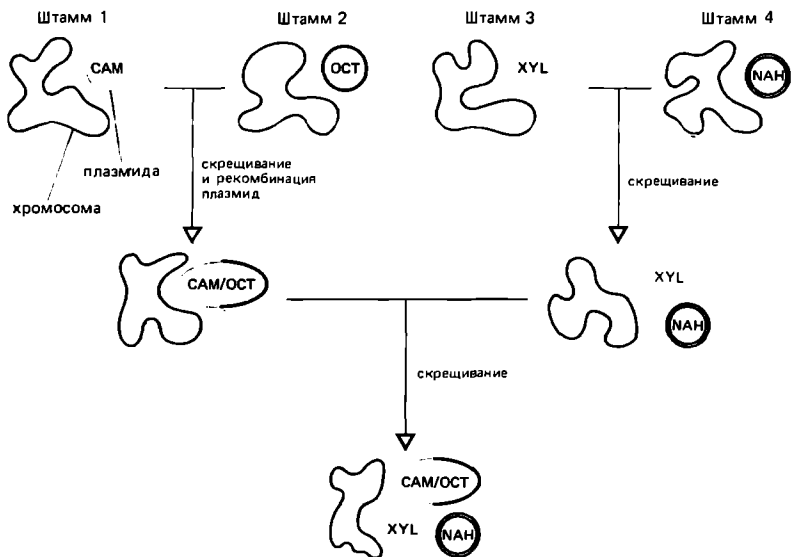


Рис. 12. Получение штамма *Pseudomonas putida*, способного усваивать большинство основных углеводов нефти (по Д. Хопвуду, 1984): CAM — камфора; ОСТ — октан; XYL — ксилл; НАН — нафталин

мидой (А. Chakrabarty, 1974). На этот штамм был выдан первый в истории США патент, защищающий конструирование и использование живого организма.

В гл. 4 приведены примеры применения конъюгации при конструировании штаммов-продуцентов треонина и интерферона человека, которое осуществлено во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

#### § 4. Фаги и трансдукция

Бактериофаги, или просто фаги, — это вирусы бактерий. Как и все вирусы, они являются существами доклеточного уровня организации, способны проникать в живые клетки и только в них воспроизводиться. В большинстве случаев фаговые частицы (вирионы) состоят лишь из ДНК (или РНК) и белка, образующего оболочку (головку, или капсид) вокруг нуклеиновой кислоты и хвостовой отросток. Обычно у ДНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота двухцепочечная, но в некоторых случаях бывает и одноцепочечной (фаги ф X174, M13 и др.). У всех известных РНК-содержащих фагов нуклеиновая кислота является одноцепочечной.

Жизненный цикл фага начинается в момент соприкосновения фаговой частицы с чувствительной клеткой. Фаг прикрепляется своим отростком к клеточной оболочке. По-видимому, с помощью фермента, который имеется в отростке, или в результате механического прокола он разрушает небольшой участок клеточной стенки бактерии и через образовавшееся отверстие вводит свою хромосому в клетку. В бактериальной клетке происходит многократная репликация хромосомы фага и синтез под контролем фаговых генов белков головки и отростка. Затем образуются новые фаговые оболочки и в них пакуются фаговые хромосомы, так что сразу возникает большое количество (от 100 до 1000) фаговых частиц. Цикл заканчивается лизисом бактериальной клетки и выходом зрелых фаговых частиц в окружающую среду.

Вирулентные фаги (например, фаг T4 *E. coli*) всегда лизируют зараженные ими бактерии и имеют только один путь развития — литический цикл, описанный выше. Умеренные фаги (например, фаг  $\lambda$  или P1 *E. coli*) могут вести себя по-разному: после проникновения в клетку хромосома фага либо вовлекается в литический цикл, либо вступает с клеткой-хозяином в своего рода симбиотические отношения — превращается в профаг и передается всему потомству данной клетки (рис. 13). Бактерии, которые содержат профаг, называются лизогенными. Профаг может находиться в клетке в виде автономной плазмиды, реплицирующейся синхронно с хромосомой бактерии (фаг P1), либо в интегрированном в хромосому состоянии (фаг  $\lambda$ ).

ДНК фага  $\lambda$  — это линейная двухцепочечная молекула, содержащая 48,5 т. п. о. На 5'-конце каждой ее цепи имеется одноцепочечная последовательность из 12 нуклеотидов. Эти последовательности называются липкими концами, так как они взаимно комплементарны. Сразу же после заражения они спираются и ковалентно соединяются ДНК-лигазой клетки-хозяина с образованием кольцевой молекулы. Репликация этой кольцевой молекулы ДНК в литическом цикле осуществляется на основе взаимодействия фаговых белков с репликационным механизмом клетки-хозяина.

В другом случае кольцевая ДНК фага  $\lambda$  может включиться в бактериальную хромосому в результате одного акта реципрокной рекомбинации между специфическими att-участками ДНК фага и хромосомы *E. coli* (рис. 14). Сайт прикрепления фага (att $\lambda$ ) расположен на хромосоме между генами галактозного (gal) и биотинового (bio) оперонов. Последовательность оснований att $\lambda$  обозначают как ВВ' (от англ. bacterial — бактериальный). Специфический сайт прикрепления в фаге называется att и расположен он рядом с генами int и xis. Последовательность оснований att обозначается как РР' (от англ. phage — фаг). Фаговый белок Int узнает последовательность РР' в фаговой ДНК и последовательность ВВ' в ДНК *E. coli*. В процессе так называемой сайт-специфической рекомбинации проис-

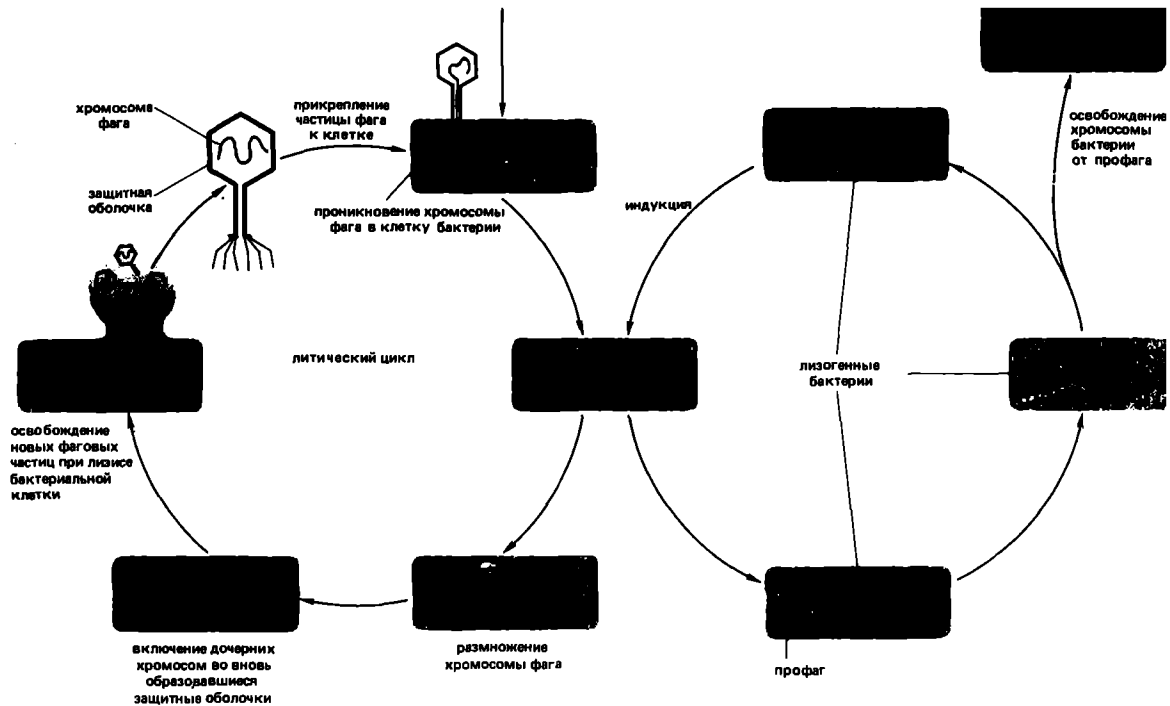


Рис. 13. Жизненный цикл умеренного бактериофага



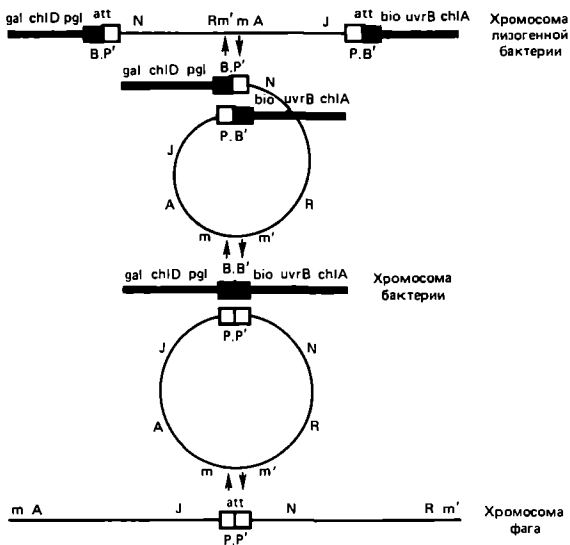


Рис. 14. Включение фага  $\lambda$  в хромосому *E. coli* (по А. Кемпбеллу, 1975)

ходит взаимный перенос: *P* соединяется с *B'*, а *B* — с *P'*, и ДНК фага становится частью молекулы ДНК бактерии (рис. 14). При этом на хромосоме образуются два новых *att*-сайта: *attBP'* — слева от профага и *attPB'* — справа от него. Профаг стабилен в отсутствие белка *Xis*. Транскрипция гена *xis* блокируется репрессором фага  $\lambda$ . При индукции профага, когда репрессия снимается (например, при УФ-облучении или при повышенной температуре, инактивирующей термочувствительный репрессор), белки *Xis* и *Int* катализируют процесс, обратный по отношению к интеграции фага. В результате происходит вырезание профага и снова получается кольцевая молекула ДНК фага  $\lambda$  и исходная хромосома *E. coli* (рис. 14).

В тех случаях, когда вырезание профага по каким-либо причинам происходит не точно, образуются частицы фага, несущие соседние бактериальные гены.

При инактивации *att*  $\lambda$ -сайта фаг  $\lambda$  может встраиваться в другие районы хромосомы, но с гораздо меньшей эффективностью.

Почти каждый известный в настоящее время вид бактерий является хозяином одного или нескольких вирулентных или умеренных фагов. Значение фагов для микробиологической промышленности определяется не только тем, что они могут серьезно нарушать процессы ферментации в результате фаголизиса производственных культур. Фаги являются важным инструментом генетического анализа и конструирования штаммов бакте-

рий с помощью трансдукции и методов генетической инженерии.

*Трансдукция — это перенос генетической информации от клетки донора к клетке-реципиенту, который осуществляется фагом.* Это явление впервые описали в 1952 г. Н. Циндер и Дж. Ледерберг. Оно основано на том, что в процессе размножения фагов в бактериях иногда образуются частицы, которые наряду с фаговой ДНК или вместо нее содержат фрагменты бактериальной ДНК. Такие частицы называются трансдуцирующими. По морфологии и адсорбционным свойствам они ничем не отличаются от обычных фаговых вирионов, но при заражении ими новых клеток они передают им генетические детерминанты предыдущего хозяина. Таким образом, чтобы осуществить трансдукцию (или трансдукционное скрещивание), необходимо размножить фаг на клетках штамма-донора, а затем заразить им клетки штамма-реципиента. Отбор рекомбинантов, которые называются здесь трансдуктантами, проводят на селективных средах, где не могут расти исходные реципиентные клетки.

Главным этапом образования трансдуцирующих частиц является процесс упаковки ДНК. У разных фагов специфичность упаковки меняется в очень широких пределах не только по виду пакуемой ДНК (фаговая или бактериальная), но и по степени взаимодействия с различными участками на бактериальной ДНК. От этой специфичности зависит спектр трансдуцируемых бактериальных маркеров и частота их трансдукции: при полном отсутствии специфичности может трансдуцироваться любой бактериальный ген примерно с одинаково высокой частотой и, наоборот, чем специфичнее упаковка, тем уже спектр при разной частоте переноса.

В соответствии со спектром переносимых бактериальных маркеров трансдукцию принято делить на ограниченную, или специфическую, и общую (неспецифическую).

При образовании специфически трансдуцирующих фагов ( $\lambda$  dgal  $\phi$ 80 dtrp, P22 drgo) в головку всегда начинает упаковываться только фаговая ДНК и только с одного определенного участка. Например, упаковка ДНК фага  $\lambda$  начинается с липкого конца. Однако если к ней присоединен отрезок бактериальной ДНК, прилежащей к профагу, то они могут быть упакованы вместе. В этом случае бактериальная ДНК частично замещает фаговую. Поэтому при специфической трансдукции переносится только один из участков бактериальной ДНК, расположенных по флангам от профага. Обязательными условиями образования единой гибридной молекулы, состоящей из ДНК фага и бактерии, являются предварительная лизогенизация с включением профага в хромосому и последующая индукция профага.

При неспецифической трансдукции фаговые оболочки могут начать упаковываться не только с фаговой, но и с бактериальной

ДНК в различных участках, специфичность которых может быть неодинаковой. Если упаковка началась с бактериальной ДНК, то головка фага полностью заполняется только ею, а избыток ДНК удаляется. Частицы таких фагов всегда содержат фрагменты бактериальной ДНК, соответствующие размеру их головки. Образование их может происходить как при литическом развитии фага, так и после индукции профага. Трансдуцироваться могут самые разные маркеры, но с неодинаковой частотой. Так, при литическом развитии фага P1 бактериальная хромосома, по-видимому, фрагментируется до размеров фаговой ДНК и эти фрагменты неспецифически упаковываются в фаговые оболочки. Возможно, что на бактериальной хромосоме имеются более или менее специфические участки, с которых начинается упаковка, так как частота трансдукции отдельных маркеров различна.

Некоторые фаги, например фаг P22 *S. typhimurium*, могут осуществлять как специфическую, так и общую трансдукцию. Фаг P22 интегрируется в единственный участок хромосомы рядом с генами *rgo*. Индукция профага резко стимулирует образование специфически трансдуцирующих частиц. Они содержат гибридную ДНК, несущую фаговые гены и гены бактериальной хромосомы, расположенные по флангам от профага. Упаковка ее начинается в специфическом участке на фаговом геноме (*pac*) в одном направлении с помощью последовательного наполнения головки и отрезания (В.-К. Тье et al., 1974). При литическом развитии в оболочку фага пакуются различные участки бактериальной ДНК. Упаковка начинается с относительно специфических участков на бактериальной хромосоме (*pacB*) Этих участков много, они расположены почти беспорядочно. Их специфичность различна и ниже, чем у *pac*-участка фаговой ДНК. Поэтому эффективность трансдукции отдельных маркеров бактериальной хромосомы различна (С. Chelala, P. Margolin, 1974).

Таким образом, особых, четко разграниченных механизмов для специфической и общей трансдукции нет. Расшифровка механизмов образования трансдуцирующих частиц позволяет превращать специфически трансдуцирующие фаги в общетрансдуцирующие, как этого удалось добиться для фага  $\lambda$  (N. Sternberg, R. Weisberg, 1975).

При общей трансдукции в реципиентную клетку поступает фрагмент двунитовой ДНК донора. Он может сразу же включиться в хромосому реципиента, вследствие чего формируются стабильные клоны рекомбинантного генотипа. При специфической трансдукции фрагмент хромосомы донора может остаться соединенным с генетическим материалом фага и бактерия становится лизогенной по данному профагу. Возникает диплоидное в отношении трансдуцированных генов (мерозиготное) состояние. Оно сохраняется при клеточных делениях неопределенно долго. Клоны, несущие такой профаг, обнаруживают нестабильность.

При размножении их происходит выщепление исходных реципиентных форм (в случае утраты добавленного фрагмента) или стабильных рекомбинантов, образовавшихся в результате включения трансдуцированных генов в бактериальную хромосому.

Следует отметить, что, по-видимому, значительная часть трансдуцируемой ДНК не взаимодействует с ДНК реципиента. Она сохраняет свой исходный размер, транскрибируется, придает клетке новый фенотип, но не реплицируется. При делении клетки такая ДНК передается только одной дочерней клетке. Поэтому в любой момент этот фрагмент несет лишь одна клетка клона. Остальные выжившие клетки, вероятно, приобретают новый признак, получая при делении родительской клетки вместе с цитоплазмой уже готовый недостающий фермент (белок). При достаточном большом числе делений концентрация клеток с новым фенотипом сильно уменьшается и в конце концов донорный фрагмент может быть утерян. Такие трансдуктанты называются абортивными. На чашках они образуют мелкие колонии, которые гораздо меньше, чем колонии стабильных трансдуктантов.

Трансдуцироваться могут и внехромосомные генетические элементы. Механизмы трансдукции плазмид несколько отличаются от механизмов трансдукции хромосомных генов. В целом фаги могут трансдуцировать любые плазмиды, но частота их трансдукции обычно ниже, чем хромосомных маркеров. Вероятно, кольцевую плазмидную ДНК упаковать труднее, чем отдельные линейные фрагменты. Поскольку перенос цельных плазмид подчиняется общим законам трансдукции, размер пакуемой ДНК должен быть равен геному фага. Если плазида меньше, то для достижения соответствующего размера она должна быть «достроена». Возможны несколько способов такой достройки: за счет других плазмид; за счет фаговой ДНК; за счет полимеризации плазмиды.

Совместная трансдукция (котрансдукция) различных плазмид наблюдается редко. Обычно при этом плазмиды рекомбинируют с образованием коинтеграта, вероятно, в основном за счет IS-элементов и транспозонов. Участие фаговых генов в достройке плазмид вполне возможно и, вероятно, также осуществляется в результате образования коинтегратов.

По-видимому, наиболее универсальный способ достройки — это полимеризация плазмид. У части инфицированных фагом клеток плазмиды находятся в виде олигомеров — димеров, тримеров или мультимеров, которые могут иметь подходящий размер и включаться в фаговую оболочку.

Если же размер плазмидной ДНК в донорных клетках превышает размер фагового генома, то плазида может трансдуцироваться отдельными фрагментами — происходит ее «трансдукционное укорочение» (Т. Watanabe et al., 1968; В. Low, 1972). Укорочение плазмиды ведет к утрате различных функ-

ций, и если эти функции ответственны за репликацию плазмиды, то без включения в хромосому реципиента такие плазмиды просто утрачиваются как abortивные фрагменты. Эффективность трансдукции крупных плазмид будет тем ниже, чем больше геном плазмиды превышает размер ДНК трансдуцирующего фага. Частота появления трансдуктантов может увеличиваться, если плаزمида восстанавливает исходную структуру в реципиентной клетке. Это происходит, когда реципиенты содержат аналогичную резидентную плазмиду, при рекомбинации с которой устраняется дефект трансдуцированной плазмиды.

Оптимальные условия для трансдукции плазмид создаются в тех случаях, когда исходный размер плазмиды приближается к размеру генома фага. Частота трансдукции таких плазмид не зависит от гес А-функций донора и реципиента и может быть очень высокой — до  $10^{-4}$ .

В трансдукции плазмид могут принимать участие и специфически трансдуцирующие фаги. Если на плазмидной ДНК имеется соответствующий участок для включения профага, то при индукции лизогенных клонов можно обнаружить частицы, специфически трансдуцирующие фрагменты плазмидной ДНК, расположенные по флангам от места включения профага. Это представляет определенный интерес для анализа отдельных плазмидных генов, а также в генно-инженерных экспериментах.

Перенос плазмид с помощью фагов удобно использовать, когда необходимо преодолеть барьер поверхностного исключения, придать клеткам дополнительные метки, а иногда просто перенести неконъюгативные плазмиды или получить их коинтеграты. Трансдукционное укорачивание используют для картирования плазмид и для их конструирования *in vivo*.

Говоря о трансдукции, следует упомянуть и о таком явлении, как фаговая конверсия. Это явление очень широко распространено, и проявления его чрезвычайно разнообразны. При фаговой конверсии все инфицированные фагом клетки изменяют свой фенотип. Это изменение сохраняется лишь до тех пор, пока в клетке присутствует фаг (исключения бывают в случае фагов с транспозонами). Наиболее известный пример такого рода — приобретение токсигенности клетками *Corynebacterium diphtheriae* при лизогенизации их фагом  $\beta$ . Фаговую конверсию можно рассматривать как крайнее проявление специфической трансдукции, когда в фаговой популяции каждая частица обладает способностью вызывать изменение фенотипа клеток.

Конвертирующие фаги, способные сообщать устойчивость к различным антибиотикам, известны давно (E. Dubnau, B. Stocher, 1964). Однако только в последние годы было показано, что они обычно несут транспозоны (D. Berg, 1977). Транспозоны могут мигрировать с фага на другие репликоны, и в этом случае устойчивость к антибиотику остается и после элиминации фагов.

Фаги с транспозонами удобно использовать для определения

чувствительности различных бактерий к данному фагу, а приобретение клеткой резистентности — для контрселекции донора при постановке опытов по конъюгации.

Трансдукция широко распространена среди бактерий. Известны десятки видов, у которых она обнаружена (Э. Я. Амиров, И. В. Домагдский, 1981). Однако возможности этого способа передачи генетического материала раскрыты далеко не полностью. Между тем современный уровень знаний позволяет не только объяснять новые факты, но и с успехом управлять многими процессами, связанными с трансдукцией, значительно расширяя ее возможности, адаптируя ее для новых видов, имеющих промышленное значение.

Например, упаковка ДНК в фаговые головки — процесс специфический даже для бактериальной ДНК при образовании общетрансдуцирующих частиц. Выражение этой специфичности для разных участков ДНК неодинаково, поэтому частота трансдукции отдельных маркеров может сильно варьировать. Оказалось, что с помощью мутаций можно получить фаги, у которых такая специфичность утрачивается, и процесс упаковки бактериальной ДНК становится намного эффективнее. Обычно при общей трансдукции фаг P22 упаковывает только 0,7% бактериальной ДНК. Однако мутанты этого фага упаковывают до 50% и соответственно резко увеличивается частота трансдукции (H. Schmieger, H. Backhaus, 1973). Были выделены также мутанты фага P1, у которых эффективность упаковки хозяйской ДНК возрастала в 10 раз. У этих мутантов изменяется, вероятно, не только специфичность, но и активность нуклеаз, осуществляющих разрезы ДНК перед упаковкой (J. Wall, P. Haggiman, 1974). Аналогичные мутанты описаны и у других фагов.

По-видимому, отсутствие специфичности упаковки — явление не столь уж редкое и встречается в естественных условиях. В связи с этим большой интерес представляют данные о том, что у некоторых видов бактерий фаги, вероятно, выполняют только функцию, связанную с генетическим обменом. Так, многие виды бацилл при воздействии индуцирующих агентов лизируются с освобождением частиц, похожих на фаговые, но заполненных бактериальной ДНК (A. Garro, J. Magnum, 1970). В таких лизатах активные фаги полностью отсутствуют. Все гены, ответственные за синтез соответствующих белков и сборку головок, картированы на одном участке бактериальной хромосомы.

Аналогичная картина обнаружена у *Rhodopseudomonas capsulata* (B. Marrs, 1974), *Str. lactis* (McKay, 1973) и *Proteus mirabilis* (M. Fleischacher et al., 1978). Дальнейшее исследование этого явления открывает новые перспективы для поиска трансдукции у разных видов и для ее применения.

Первоначально предполагалось, что способностью к трансдукции обладают только умеренные фаги. Однако для образования общетрансдуцирующих частиц стадия лизогенизации совсем не обязательна. Поэтому, если капсид вирулентного фага обладает

способностью упаковывать бактериальную ДНК, то соответствующий фаг сможет осуществлять трансдукцию. Впервые с этой целью был использован вирулентный мутант фага P1 — P1 vir (Н. Ikeda, S. Tomizawa, 1965). Затем появились работы с вирулентными фагами *B. subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Ps. putida*, *Rhizobium leguminosarum*, актиномицетов, а также фагами T1 и T4 *E. coli*. Стало ясно, что вирулентные фаги в отношении трансдуцирующей способности ничуть не уступают умеренным фагам, а нередко превосходят их по частоте трансдукции и по размеру переносимых фрагментов. Применение вирулентных фагов открывает перспективы трансдукции у тех видов бактерий, у которых она пока не известна.

Основная сложность при трансдукции вирулентными фагами заключается в создании условий для предупреждения гибели потенциальных трансдуктантов при заражении активными фагами. С этой целью можно использовать различные приемы. Это создание условий, подавляющих литическое действие фага (временное понижение температуры после адсорбции, использование «голодающих» культур в стационарной фазе роста, температурочувствительных мутантов фага), применение низкой множественности инфекции, облучение фага большими дозами УФ, использование в качестве реципиентов штаммов, непермиссивных для амбер-мутантов соответствующих фагов, удаление неадсорбированного фага различными способами, предотвращение реадсорбции фага и лизиса клеток на чашках путем исключения катионов, необходимых для адсорбции. Следует отметить, что применение перечисленных методов повышает частоту появления трансдуктантов и при использовании умеренных фагов.

К сожалению, имеется немало примеров, когда у бактерий выявлено много фагов, но трансдукция не обнаружена. Во многих случаях образование трансдуцирующих частиц у этих бактерий, вероятно, все же происходит, но не удается выявить трансдуктанты. Однако некоторые свойства фагов могут действительно исключать возможность трансдукции. Если при проникновении фаговой ДНК в клетку бактериальная хромосома сразу же разрушается до кислоторастворимых олигонуклеотидов, то трансдуцировать фагу будет просто нечего. Именно такое положение создается в случае вирулентных фагов T-группы кишечной палочки (T2, T4, T5, T6). У других видов бактерий, вероятно, существуют подобные же «гиперагрессивные» фаги. В этом случае мутации, снижающие нуклеазную активность фагов, должны способствовать образованию трансдуцирующих частиц. Это предположение находит подтверждение в работе по получению трансдуцирующего варианта фага T4 (K. Young et al., 1982).

В то же время есть фаги, которые совсем не разрушают бактериальную ДНК. Это также отрицательно сказывается на способности фагов к трансдукции, поскольку при образовании трансдуцирующих частиц точками начала упаковки должны служить свободные концы бактериальной ДНК. И, конечно, фаги не

могут трансдуцировать, если они не в состоянии нужным образом упаковывать бактериальную ДНК. Именно это происходит в случае РНК-содержащих фагов и фагов, содержащих однонитевую ДНК. Таким образом, изучение природы фагов и их физиологических особенностей позволяет более успешно вести поиск подходящих фагов для трансдукции.

Для осуществления межвидовых и межродовых передач важное значение имеет расширение круга хозяев для известных и хорошо изученных фагов. С этой целью осуществляется поиск чувствительных к данному фагу клеток в исходной популяции нового хозяина или в мутагенизированной культуре его. Чувствительные клетки можно обнаружить с помощью термоиндуцибельных мутантов фагов, несущих транспозоны, позволяющих вести отбор сразу по двум признакам: лизису при повышенной температуре и устойчивости к соответствующему антибиотику (R. Goldberg et al., 1974). Так, используя фаг PlcIrl00KM, удалось отобрать P1-чувствительные варианты *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus*, *Erwinia*, *Serratia* и *Pseudomonas* (J. Murooka, T. Harada, 1979).

Как уже отмечалось, трансдукция имеет важное значение для генетического исследования бактерий и конструирования новых штаммов. Возможности этого метода увеличиваются в связи с широким использованием транспозонов. Уже сегодня с помощью трансдукции создаются промышленные штаммы микроорганизмов. Так, путем объединения в одном геноме мутаций, влияющих на сверхсинтез изолейцина, трансдукцией их фагом PS20 был получен штамм *Serratia marcescens* — эффективный продуцент L-изолейцина, накапливающий в КЖ до 25 г/л этой аминокислоты (S. Komatsubara et al., 1980). Затем эти же авторы с помощью трансдукции сконструировали штамм *Serratia marcescens*, эффективный продуцент L-треонина (S. Komatsubara et al., 1983). При создании штамма *E. coli* — промышленного продуцента L-треонина — во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов трансдукция применялась при конструировании реципиента для гибридной плазмиды, несущей гены треонинового оперона (см. гл. 4).

## § 5. Применение транспозонов

*Транспозлируемые* (перемещающиеся, подвижные, мигрирующие) генетические элементы — это дискретные сегменты ДНК, способные к самостоятельному перемещению из одного участка в другой в пределах репликона (генома), а также к перемещению из одного репликона (хромосомного, плазмидного или фагового) в другой. К таким элементам относятся простые вставочные последовательности (IS-элементы — Insertion Sequences), транспозоны (Tp-элементы) и фаги-транспозоны (Mu, Д3112 и др.). Интеграция их в репликоны осуществляется независимо от



системы общей (гомологичной) рекомбинации клеток, требующей протяженной гомологии у рекомбинирующих структур.

IS-элементы представляют собой линейные фрагменты ДНК, содержащие от 200 до 2000 п. о., имеющие на концах инвертированные повторы оснований (IR, или ITR — inverted terminal repeat). Длина этих повторов у различных IS-элементов различна. ITR необходимы для транспозиции и есть у всех мигрирующих элементов про- и эукариот. IS-элементы содержат только гены, необходимые для их транспозиции и не несут никаких других генов. В разных репликациях может содержаться различное число копий вставочных последовательностей разного типа. Например, в хромосоме *E. coli* содержится 6—10 копий элемента IS1, 5—12 копий IS2, 4—6 копий IS3, 1—2 копии IS4, до 10 копий IS5, 2—4 копии IS30. В F-факторе, как уже отмечалось, имеется 1 копия IS2 и 2 копии IS3-элемента.

Транспозоны — это образованные на основе IS-элементов (или их производных) сложные перемещающиеся структуры, которые содержат гены, определяющие функции, не имеющие отношение к транспозиции (Р. Б. Хесин, 1985; N. Kleckner, 1981). Все транспозоны фланкированы концевыми повторами. Часто ими являются известные IS-элементы, например, IS1, которые могут быть повторены на концах транспозона в прямой или обратной ориентации. Некоторые транспозоны фланкированы другими IS-элементами. Существует также ряд транспозонов, таких как Tn3, которые имеют на концах лишь короткие инвертированные повторы (ITR). Предполагается, что они являются остатками полных вставочных последовательностей. Поскольку IS-элементы сами заканчиваются ITR, любой транспозон, даже фланкированный элементами IS в прямой ориентации, всегда имеет на концах инвертированные повторы (рис. 15).

**Транспозоны могут переносить всевозможные заключенные в них гены, по-видимому, любые участки ДНК, оказавшиеся между IS-элементами** (Р. Б. Хесин, 1985). С этой точки зрения всю хромосому *E. coli*, содержащую несколько IS-элементов одного типа, можно рассматривать как совокупность ряда транспозонов. Однако вероятность перемещения больших хромосомных блоков, по-видимому, чрезвычайно низкая.

Известно много транспозонов, которые несут детерминанты устойчивости к антибиотикам и другим ингибиторам роста бактерий. Так, транспозоны Tn5 кодирует резистентность к канамицину, Tn9 — резистентность к хлорамфениколу, а Tn10 — устойчивость к тетрациклину. Эти транспозоны могут перемещаться в клетках различных грамотрицательных бактерий. У грамположительных бактерий обнаружены транспозоны Tn551 (у *St. aureus*) и Tn917 (у *Str. faecalis*), детерминирующие устойчивость к эритромицину. У *Str. faecalis* описан также транспозон, Tn916, определяющий устойчивость к тетрациклину, который, очевидно, имеет гены плазмидного происхождения и способен к конъюгационному переносу в отсутствие конъюгативных плазмид

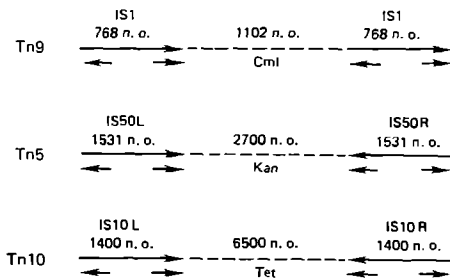


Рис. 15. Структура некоторых транспозонов, несущих детерминанты устойчивости к антибиотикам

(А. Franke, D. Clewell, 1981). Проникнув в реципиентную клетку, Тп916 может сохраниться в ней, только внедрившись в бактериальную хромосому (или какой-либо другой репликон).

Умеренный бактериофаг Му (от англ. Mutator), обнаруженный у *E. coli* (А. Taylor, 1963), способен размножаться в клетках многих грамотрицательных бактерий (J. Murooka, T. Nagada,

1980). Линейная двухцепочечная ДНК фага содержит около 38 т. п. о., кодирующих более 30 генов, и фланкирована инвертированными повторами, состоящими всего из 2 п. о. Кроме того, на концах фаговой хромосомы, включенной в вирусные частицы, имеются участки бактериальной ДНК, которые теряются при интеграции фага. Фаг Му может внедряться в различные репликоны, вызывая мутации всевозможных генов. Во время литического цикла репликация генома фага осуществляется в процессе многократных транспозиций его в хромосому клетки-хозяина. Две группы Му-подобных фагов обнаружены у *Ps. aeruginosa* (В. Н. Крылов и др., 1980). По-видимому, фаги-транспозоны существуют и у других видов бактерий. Во многих отношениях они весьма сходны с IS- и Тп-элементами и по существу отличаются от них только тем, что могут формировать вирусные частицы.

Разные перемещающиеся элементы отличаются между собой **по степени специфичности** при выборе мест интеграции в репликоны. При высокой специфичности транспозон интегрируется только в один или несколько сайтов, а при региональной специфичности — преимущественно в некоторые районы, внутри которых интеграция происходит в многочисленные сайты. Когда вставки транспозона осуществляются во многие участки, но имеются предпочтительные сайты, говорят о средней специфичности. При низкой специфичности почти каждый акт транспозиции осуществляется в новый сайт. К транспозонам с высокой специфичностью относятся Тп7, с региональной специфичностью — Тп1, со средней специфичностью Тп9 и Тп10, а с низкой — Тп5. Следует отметить, что специфичность транспозиции одного и того же транспозона для разных репликонов может быть различной.

Транспозоны и IS-элементы перемещаются с частотой  $10^{-4}$  —  $10^{-7}$  на одно деление бактериальной клетки. Вероятность транспозиции зависит от свойств транспозона. Она резко отличается даже у транспозонов, имеющих одинаковый тип строения. Например, подвижность разных фланкированных IS1-элементами участков ДНК зависит от их размеров. При увеличении транспозона на 1 т. п. о частота его перемещений снижается в 2 раза.

Частота транспозиций для одного и того же транспозона может зависеть от характера донорного и реципиентного репликонов и от генома клетки-хозяина. Например, у *E. coli* были получены мутации, которые заметно подавляли транспозицию многих Tn-элементов (Т. С. Ильина и др., 1981). Кроме того, на перемещение транспозонов могут влиять факторы внешней среды (температура, УФ облучение, химические соединения). Так, было показано, что ацетат, диметилсульфоксид (DMSO) и некоторые детергенты (Brij 58, Nonident P4) усиливают транспозицию Tn9, а также Tn5 и Tn10. Ацетат играет важную роль в метаболизме жирных кислот, DMSO и детергенты затрагивают структуру мембран. В связи с этим предполагается участие в транспозиции липидов бактериальных мембран (А. Datta et al., 1983). Наконец, перемещение некоторых Tn-элементов, содержащих детерминанты устойчивости к ингибиторам роста, индуцируется этими ингибиторами. К примеру, сублетальные концентрации эритромицина стимулируют транспозицию Tn917, несущего ген устойчивости к этому антибиотику (D. Clewell et al., 1982).

Как уже отмечалось, IS-элементы содержат гены, необходимые для их перемещения. Обычно они кодируют белок, контролирующей транспозицию (*транспозазу*), а иногда еще белок-репрессор. Транспозоны образуются в результате включения некоторых генов между двумя одинаковыми IS-элементами, которые первое время сохраняют полную структуру (таков Tn9). **Перемещение транспозонов осуществляется за счет функции IS-элементов.** Причем, для того чтобы произошла транспозиция, достаточно активности одного IS-элемента. Поэтому эволюция транспозонов связана с постепенной дифференцировкой между двумя одинаковыми вставочными последовательностями. Так, в транспозоне Tn10 транспозазу кодирует преимущественно правый повтор (IS10R), а в транспозоне Tn5 — только правый повтор (IS50R). Вероятно, дальнейшая деградация второго IS-элемента привела к появлению транспозонов семейства Tn3. Эти транспозоны фланкированы короткими инвертированными повторами из 38—40 п. о., а транспозаза и репрессор закодированы в уникальной последовательности, которая, возможно, является частью одного сохранившегося IS-элемента.

Механизмы перемещения транспозонов окончательно не выяснены. До недавнего времени преобладало представление, что все транспозиции связаны с локальной репликацией мобильных генетических элементов. Оно основывалось на данных о том, что транспозиции Tn3, Tn7, IS1, IS2, IS4 и фага Mu не сопровождаются исключением их из мест исходной локализации в плазидах и хромосомах, а сопряжены с появлением дополнительных копий в новых сайтах. Показано, что перемещение Tn3 осуществляется в две ступени. Во время первой происходит слияние молекул донорной и реципиентной ДНК, сопровождающееся дупликацией транспозона. Образуется коинтегра́т, содержащий копии транспозона в местах слияния двух репликонов.

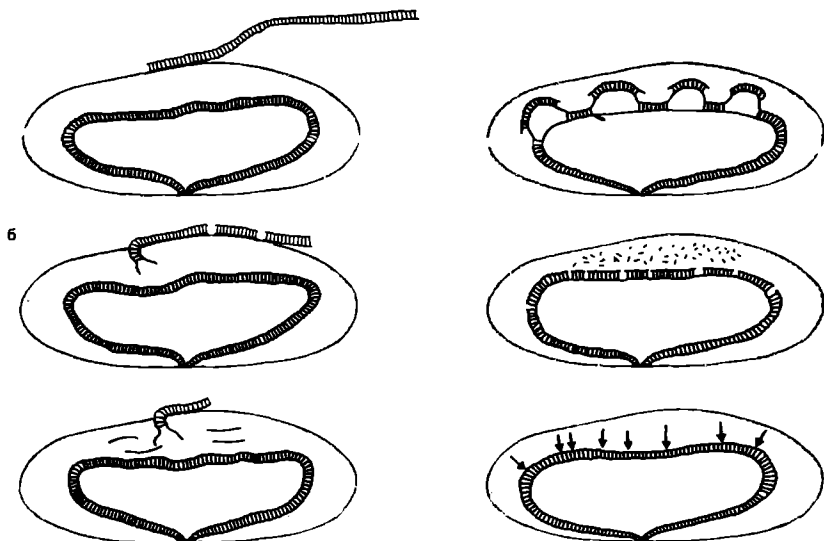


Рис. 16. Схема транспозиции через образование /А/ и разрешение /Б/ коинтеграта: серая стрелка — транспозон

Во время второй ступени репликоны разделяются благодаря реципрокной рекомбинации между идентичными участками (гес-сайтами) двух ТпЗ, расположенных в коинтеграте (рис. 16).

Для осуществления первой ступени совершенно необходима транспозаза (продукт гена *tnpA*) и два терминальных инвертированных повтора (ITR). Мутации, которые делегируют ITR, нарушают транспозицию. По-видимому, транспозаза распознает именно эти участки и специфически взаимодействует с ними в процессе транспозиции. Для разделения коинтегратов необходим продукт гена *tnpR* (резолваза), который кроме регуляторной функции осуществляет также сайт-специфическую рекомбинацию в гес-сайтах. Имеются данные о том, что некоторые IS-элементы (например, IS1) также кодируют ферменты, имеющие нуклеазную активность и участвующие в разрешении коинтегратов (L. McHattie, J. Shapiro, 1978; В. Н. Данилевич, 1985). Вместе с тем, коинтеграты, образующиеся при транспозиции других перемещающихся элементов, могут диссоциировать только в клетках  $\text{RecA}^+$  и стабильны в клетках  $\text{RecA}^-$ , т. е. разрешение их осуществляется при участии системы гомологичной рекомбинации.

Описанный механизм перемещения называется *репликативной транспозицией*. Наряду с ним существует способ транспозиции, предполагающий выщепление (эксцизию) перемещающегося элемента из молекул-донора и внедрение его (инсерцию) в молекулу-реципиент. Этот механизм получил наименование *консервативной транспозиции*. Очевидно, что фаг  $\mu$  или транспозон Тп916, первоначально проникающие в клетку в виде линейных молекул ДНК, должны включиться в хромосому в результате простой инсерции. По-видимому, в зависимости от условий один и тот же перемещающийся элемент может использовать, как

репликативный, так и консервативный механизм для транспозиции. Вместе с тем такие транспозоны, как Tn5 и Tn10 редко образуют коинтеграаты и, очевидно, перемещаются с помощью простых инсерций. Таким образом, способ транспозиции можно отнести к характерным признакам перемещающегося элемента (Т. С. Ильина, 1986).

Транспозаза, по-видимому, катализирует ступенчатые двуниевые разрывы ДНК в реципиентной молекуле, аналогичные тем, что образуются под действием некоторых рестриктаз (см. гл. 3). Кроме того, этот белок, вероятно, может осуществлять разрезы в концах транспозона и их соединение с концами разрыва реципиентной ДНК. При этом остаются бреши, которые застраиваются репаративными системами клетки. В результате по краям перемещающихся элементов всегда образуются **одинаковые короткие** (в 5—9 п. о.) **повторы участка ДНК-мишени**. Их длина строго постоянна для каждого перемещающегося элемента. Эти дубликации не нужны для последующих транспозиций.

Перемещения подвижных генетических элементов в пределах одного репликона ведут к образованию делеций и инверсий, которые являются внутримолекулярными эквивалентами коинтеграатов. Кроме того, делеции могут возникать и без транспозиции в результате присоединения одного из концов транспозона к одному из участков в прилегающей к транспозону последовательности ДНК. Межмолекулярная транспозиция иногда приводит к внедрению «инверсионного» транспозона, т. е. всей последовательности донорного репликона, за исключением генов, находящихся между внутренними концами IS-элементов транспозона. При рекомбинациях между одноименными элементами, расположенными в разных местах гомологичных молекул ДНК, образуются дубликации (а также делеции).

Таким образом, перемещающиеся генетические элементы индуцируют все виды хромосомных перестроек: слияние и диссоциацию репликонов, транслокации, делеции, инверсии и дубликации. Вместе с плазмидами и фагами они переносят гены между видами бактерий, подчас весьма отдаленными, и следовательно, играют важную роль в эволюции микроорганизмов. Новые возможности открывает использование мигрирующих элементов в генетическом конструировании. На основе их применения создаются *методы транспозонного мутагенеза и генетической инженерии in vivo*, существенно ускоряется разработка частной генетики бактерий, имеющих важное промышленное значение (N. Kleckner et al., 1977).

Как уже отмечалось, перемещающиеся элементы могут встраиваться во многие участки репликона. Если сайт включения оказывается в пределах какого-либо гена, то линейная непрерывность этого гена нарушается и он инактивируется. При встраивании в ген транспозонов, несущих детерминанты устойчивости к антибиотикам, появляются *мутанты с двойным фенотипом*. Впервые, инактивация гена сопровождается утратой функции,

которую он контролирует. Во-вторых, экспрессия генов встроенного транспозона приводит к появлению лекарственной устойчивости. Большую ценность представляют мутации аутокотрофности у бактерий, вызванные вставками транспозонов в гены, контролирующие синтез первичных метаболитов. Такие вставки могут применяться в самых разнообразных генетических манипуляциях с бактериями (N. Kleckner et al., 1977).

Чтобы осуществить транспозонный мутагенез, т. е. ввести транспозоны в хромосому (и другие репликоны) бактериальной клетки, необходимо иметь **донорную молекулу ДНК — переносчик, или вектор для доставки транспозона**. В качестве векторов обычно используют фаги или плазмиды, которые можно легко элиминировать из бактерии-реципиента. Приобретение клеткой устойчивости к антибиотику в этом случае связано с перемещением транспозона из молекулы-донора в бактериальную хромосому (или в какой-либо другой репликон, содержащийся в клетке).

Для получения фагов, несущих транспозоны с детерминантами устойчивости к антибиотикам, их размножают на клетках штаммов, содержащих соответствующие транспозоны в каком-либо репликоне. Фаголизат используют для заражения чувствительных бактерий и получают устойчивые к антибиотикам трансдуктанты. Затем среди них отбирают варианты, лизогенные по фагу, содержащему транспозон. Такой фаг при последующей инфекции сообщает устойчивость к антибиотикам всем лизогенным клеткам.

Производные конъюгативных плазмид, несущие транспозоны, чаще всего получают переносом этих плазмид в клетки, содержащие Tn-элементы в хромосоме. Затем полученные штаммы скрещивают с чувствительными к антибиотикам реципиентами и отбирают трансконъюганты, получившие устойчивость, детерминированную транспозоном. Перенос транспозонов в этом случае, как правило, связан с их перемещением в геном конъюгативной плазмиды. Это подтверждается тем, что в последующих скрещиваниях маркеры плазмиды и транспозона в 100% случаев передаются совместно.

Фаговые векторы создаются на основе мутантов умеренных фагов, например, фага  $\lambda$ , с нарушенной способностью к лизогенизации клетки-хозяина. Так, в экспериментах с *E. coli* используется мутант  $\lambda$ b221, у которого отсутствует 22% фаговой ДНК, причем делетированный фрагмент захватывает att-сайт и гены *int* и *xis*. Указанная делеция препятствует интеграции фага в хромосому, а также позволяет, не нарушая упаковку фага в белковые оболочки, включать в его геном транспозоны Tn5, Tn9, Tn10 и др. Кроме делеции b221, фаговый вектор может нести температурочувствительную мутацию в гене, контролирующем синтез репрессора (c1857) и мутацию в гене O (Oam29), снижающую гибель инфицированных клеток. Если осуществлять инфекцию при повышенной температуре, то такой дефектный фаг не сможет сохраняться в лизогенном состоянии, а благодаря мутации Oam29 значительная часть клеток останется жизнеспособной. Поэтому на селектив-

ных средах можно сразу отбирать мутанты бактерий, возникающие в результате перемещения транспозона в хромосому. Они появляются с частотой  $10^{-2}$ — $10^{-6}$  (в зависимости от транспозона), причем 1—2% из них составляют ауксотрофы.

Известны также фаговые векторы на основе фага P22 — для *S. typhimurium* — и фага P1 — для *E. coli* и некоторых других грамотрицательных бактерий. Например, фаг P1 может адсорбироваться на поверхности клеток *Mycococcus xantus* и вводить в них свою ДНК, но не способен в них размножиться. Поэтому при инфекции этих бактерий производным P1, несущим транспозон Tn5 (P1 Tn5) появляются трансдуктанты, устойчивые к канамицину, возникающие в результате транспозиции Tn5 в хромосому (J. Kupiec, D. Kaiser, 1982).

В качестве плазмидных векторов для доставки транспозонов используют температурочувствительные по репликации мутанты плазмид. Клетки, получившие такую плазмиду, содержащую транспозон, высевают на селективную среду и культивируют при повышенной температуре. В этих условиях плазида элиминируется и устойчивость к антибиотику может возникать в результате перемещения транспозона в хромосому. Другой способ избавления от плазмидного вектора связан с использованием реципиента, несущего плазмиду той же группы несовместимости. В условиях, исключающих утрату клетками резидентной плазмиды, ведут отбор трансконъюгантов по признаку, детерминируемому транспозоном. Их появление может быть обусловлено перемещением Tn-элемента в хромосому бактерии.

Многие транспозоны, обнаруженные первоначально у энтеробактерий и псевдомонад, оказались способными к транспозиции при введении в клетки различных грамотрицательных бактерий. В настоящее время на основе плазмид, имеющих широкий круг хозяев, созданы универсальные системы для транспозонного мутагенеза этих микроорганизмов. Одна из таких систем, предложенная для работы с пурпурными бактериями предполагает использование в качестве вектора плазмиды pAS8-121 (А. Н. Дубейковский, С. В. Каменева, 1983). Эта плазида, сконструированная во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (С. В. Урлапова, 1980) содержит tra-оперон RP1 и репликон ColE1. Она реплицируется в клетках *E. coli*, но не способна поддерживать в *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Процедура транспозонного мутагенеза сводится к межвидовому скрещиванию и отбору трансконъюгантов по признаку антибиотикоустойчивости, детерминируемому Tn-элементом. С использованием плазмиды pAS8-121 осуществлена транспозиция в хромосому *R. sphaeroides* Tn5 и Tn7, получены ауксотрофные и пигментные инсерционные мутанты этих бактерий.

Аналогичная система создана на основе гибридной (RK2 + ColE1) плазмиды pRK2013 (В. Елу, 1985), которая, по существу, сходна с pAS8-121. Плазида pRK2013 легко передается в клетки различных грамотрицательных бактерий, но способна

реплицироваться только в некоторых энтеробактериях. С ее помощью осуществлен транспозонный мутагенез *Caulobacter crescentus*, *Acinetobacter calcoaceticus* и *Rhizobium japonicum*. Как показали эти исследования, взаимодействие транспозонов с клеткой-хозяином играет важную роль в определении их способности к транспозиции в хромосому определенного вида бактерий.

Усовершенствованной модификацией последних двух методов является система для введения транспозонов в клетки грамотрицательных бактерий, созданная с помощью манипуляций *in vitro*. Была сконструирована плазида рSUP202, имеющая репликон ColE1 (производная рBR325), куда был введен *mob*-сайт (участок, опознаваемый эндонуклеазой системы переноса) плазмиды RP4. Мобилизация рSUP202 из клеток *E. coli* обеспечивается вставкой в бактериальную хромосому *tra*-генов плазмиды RP4. Как и другие плазмиды, созданные на базе ColE1, она способна реплицироваться только в ограниченном круге энтеробактерий. При межвидовом скрещивании, отбирая трансконъюганты по признаку, контролируемому транспозоном, можно получать мутанты, возникающие в результате внедрения Tn-элемента в хромосому (A. Puhler et al., 1984).

Системы транспозонного мутагенеза для грамположительных бактерий разработаны значительно хуже. Имеются сообщения об использовании с этой целью транспозонов Tn551 (у *S. aureus*) и Tn917 (у *Bac. subtilis*). В качестве вектора доставки транспозона в опытах с *Bac. subtilis* использовали температурочувствительную по репликации стафилококковую плазмиду рBD95, детерминирующую устойчивость к хлорамфениколу. Плазмиду вводили в клетки с помощью трансформации. Интеграция транспозона происходила во многие участки хромосомы, вызывая ауксотрофность и нарушая спорообразование (P Youngman, 1983). Это показывает перспективность использования Tn917 для транспозонного мутагенеза бацилл.

Транспозонный мутагенез имеет много преимуществ перед химическим мутагенезом. При высокой частоте мутаций здесь не происходит гибели организмов; мутации обычно одноступенчатые и сопровождаются полной утратой функции поврежденного гена; в районе локализации транспозона часто образуются делеции. **Интеграция транспозона в оперон сопровождается полярным эффектом.** Возможно точное вырезание транспозона с одновременной утратой устойчивости и восстановлением функции гена. Кроме того, можно осуществлять интеграцию транспозона не в сам интересующий исследователя ген, а рядом с ним.

Двойной фенотип мутаций, полученных с помощью транспозонного мутагенеза, делает их особенно полезными при конструировании штаммов *in vivo* (и *in vitro*). Такие мутации легко переносятся с помощью трансдукции и конъюгации в другие штаммы, поскольку можно прямо отбирать соответствующие рекомбинанты по их устойчивости к антибиотику. Например, мутацию в гене *metA*, вызванную интеграцией в него транспозона Tn10 (*metA* ::



Tn10) можно трансдуцировать в штамм, уже несущий мутацию *metE*, отбирая трансдуктанты, устойчивые к тетрациклину. Обычными методами совместить эти две мутации, имеющие одинаковое фенотипическое проявление, довольно сложно. Особенно удобно использовать транспозоны в работе с генами, мутационные повреждения которых не позволяют вести прямой отбор соответствующих мутантов и не сопровождаются заметными фенотипическими проявлениями.

Используя общетрансдуцирующие фаги, можно получать внедрение транспозона по соседству с **любым** геном. С этой целью осуществляют транспозонный мутагенез и отбирают от 500 до 2000 независимых клонов, содержащих транспозон в хромосоме. Затем на культуре бактерий, представляющей собой смесь всех этих клонов, размножают фаг. Полученный фаголизат используют для заражения клеток, несущих мутацию ауксотрофности в гене, рядом с которым желают внедрить транспозон. Отбирают прототрофные трансдуктанты и среди них находят такие, которые одновременно приобрели детерминируемую транспозоном устойчивость к антибиотику. Аналогичным способом можно внедрить транспозон по соседству с определенной, хорошо охарактеризованной мутацией, а затем переносить ее в другие штаммы. Например, для переноса мутации *gcsA*, нарушающей гомологичную рекомбинацию, транспозон Tn10 был интегрирован в соседний ген *srI*, контролирующий усвоение сорбитола (*srI* : Tn10). Трансдуктанты Tet<sup>r</sup>, полученных с помощью фага, размноженного на клетках этого штамма, с высокой частотой (до 50%) наследуют соседнюю мутацию *gcsA*.

Применение транспозонов расширяет возможности для осуществления *локализованного мутагенеза с использованием общетрансдуцирующих фагов*. Согласно первоначально разработанному методу (J.-S. Hong, B. Ames, 1971) фаголизат интенсивно обрабатывают химическим мутагеном, а затем используют его для трансдукции реципиентного штамма, несущего мутацию ауксотрофности в области, где желательно получить условно-летальные (например, температурочувствительные) мутации. Прототрофные рекомбинанты отбирают при пониженной температуре, а затем среди них находят те, которые не растут при высокой температуре. Используя транспозоны, можно таким же способом получать не только условно-летальные, но и любые другие мутации. С этой целью фаголизат получают на клетках штамма, несущего транспозон рядом с интересующим геном, интенсивно его мутагенизируют и используют для трансдукции какого-либо реципиентного штамма. На полноценной среде (если необходимо — при пониженной температуре) отбирают трансдуктанты, устойчивые к антибиотику и среди них ищут различные типы мутаций, затрагивающие этот ген (N. Kleckner et al., 1977).

Применение транспозонов облегчает картирование мутаций, поскольку инсерции транспозона ведут себя в скрещиваниях как точечные мутации. Особенно удобно использовать их для локали-

зации генов, повреждения которых проявляются только в присутствии определенных других мутаций, а также для картирования мутаций, не имеющих выраженного, легко тестируемого фенотипического проявления. Кроме того, Tn-элементы используются для получения делеций и дупликаций с фиксированными в районе интеграции транспозона концами; для конструирования специфически трансдуцирующих фагов, несущих определенные участки хромосомы; для получения F' (R')-эписом, содержащих интересные исследователя гены и для комплементационного анализа мутаций (N. Kleckner et al., 1977).

Наконец, транспозоны являются *перемещающимися районами гомологии*. Встраиваясь в разные репликоны, они обеспечивают возможность гомологичной рекомбинации между ранее не гомологичными участками. Как уже отмечалось, Hfg-штаммы, осуществляющие при конъюгации ориентированный перенос хромосомы, появляются в результате рекомбинации между бактериальной хромосомой и конъюгативной плазмидой (F-фактором) по участкам гомологии, создаваемым элементами IS1, IS3 и Tn1000. Кроме того, Hfg-штаммы могут возникать вследствие гомологичной рекомбинации между F'-факторами, несущими фрагмент бактериальной хромосомы, и соответствующим участком хромосомы. Такие доноры имеют начало переноса в районе области гомологии. Интегрируя транспозоны в F-фактор, можно получать Hfg-штаммы, осуществляющие перенос генов, начиная с любого сайта хромосомы, куда внедрен тот же самый Tn-элемент. Аналогичным образом на основе конъюгативных плазмид, имеющих широкий круг хозяев, можно создавать системы конъюгации для самых различных видов бактерий. Например, для построения генетической карты *Agrobacterium tumefaciens* была разработана система полярного переноса с помощью плазмиды pLR189 (P. Нооукаас et al., 1982). Эта плазида несет транспозон Tn5 и способна мобилизовать хромосому, начиная с сайта интеграции в нее Tn5.

Недавно создана, по-видимому, универсальная система для конъюгационного переноса генов различных грамотрицательных бактерий. В транспозон Tn5 с помощью методов генетической инженерии был вставлен mob-сайт плазмиды RP4. Используя обычную технику транспозонного мутагенеза, новый транспозон может быть внедрен в хромосому или криптические плазмиды различных грамотрицательных бактерий. Репликоны клетки-хозяина могут быть мобилизованы, если обеспечена в трансположении Tга-функция RP4. С помощью Tn5-mob-опосредованного переноса можно осуществлять эксперименты по картированию генов, вероятно, любого вида грамотрицательных бактерий. Кроме того, этот транспозон позволяет метить всевозможные криптические плазмиды с помощью селективируемого маркера устойчивости к канамицину и осуществлять мобилизацию их с высокой частотой в другие штаммы (R. Симон, 1985).

Приведенные примеры показывают, что применение транспо-

зонов расширяет возможности для генетического анализа и конструирования штаммов различных видов бактерий, представляющих интерес для микробиологической промышленности.

## § 6. Трансформация

*Трансформация — это процесс переноса генетической информации, при котором ДНК, выделенная из клетки-донора, поступает в клетку-реципиент.* Реципиентная клетка, в которой происходит экспрессия генетического материала донора, называется трансформантом. Трансформация может осуществляться как хромосомной, так и плазмидной ДНК. Процесс, при котором выделенная ДНК фагов поступает в бактериальные клетки и обуславливает образование в них зрелых фаговых частиц, называется *трансфекцией*.

Трансформация, впервые описанная у бактерий в 1928 г. Ф. Гриффитом, сыграла важную роль в выяснении природы генетического материала (O. Avery et al., 1944), в становлении и развитии молекулярной генетики, а также в разработке методологии генетической инженерии. Выделенная из донорных клеток ДНК может быть подвергнута манипуляциям *in vitro* (мутация, получение рекомбинантных молекул), а затем введена в реципиентные клетки. Таким образом, гибридизация с помощью трансформации, по существу, находится на границе методов работы *in vivo* и *in vitro*.

Генетическая трансформация не является чем-то совершенно искусственным для живых организмов. Как показали опыты со смешанными культурами бактерий, у некоторых видов этот процесс может происходить в естественных условиях и обеспечивать комбинативную изменчивость. При этом трансформирующая ДНК высвобождается в результате спонтанного лизиса части клеток популяции.

Микроорганизмы не всегда способны к трансформации. Трансформируются только *компетентные клетки*, которые могут адсорбировать и поглощать ДНК. У многих бактерий компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры — в стадии компетентности. Так, культуры *Streptococcus sanguis* находятся в этой стадии в ранней логарифмической фазе роста, культуры *Bac. subtilis* — на более поздних этапах. Однако у *Neisseria* клетки компетентны в любой фазе роста. С другой стороны, у *E. coli* и многих других видов микроорганизмов «естественная» компетентность отсутствует и поглощение ДНК происходит после определенной обработки клеток.

В компетентных культурах *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Strept. sanguis* способна к трансформации почти каждая клетка. В то же время у *Bac. subtilis* в этих условиях могут поглощать ДНК 5—10%, у *Micrococcus lysodeicticus* — 3—4%, у *Aspergillus niger* — 0,1—0,2%, у *Rhizobium japonicum* — до 0,1% всей популяции.

Хромосомная трансформация эффективно осуществляется

высокомолекулярной двухцепочечной ДНК. Чтобы ее получить, применяют различные методы разрушения клеток, нередко с предварительным ферментативным лизисом клеточной стенки (J. Margur, 1961). Наиболее часто используемые способы выделения трансформирующей ДНК подробно описаны (А. А. Прооров, 1980).

Активность трансформирующей и трансфецирующей ДНК уменьшается при любых воздействиях, разрушающих ее молекулы, в том числе в процессе очистки. Поэтому представляет определенный интерес способ трансформации, при котором к суспензии компетентных клеток добавляется заранее приготовленная взвесь протопластов, хранившихся в гипертоническом растворе (см. § 7, гл. 2.). Протопласты тут же лопаются, и высвобождаемая из них ДНК с большой молекулярной массой обеспечивает высокий выход трансформантов (G. Bettinger, F. Young, 1975).

Для трансформации компетентной культуры достаточно добавить к ней очень малые количества трансформирующей ДНК — начиная с сотых долей микрограмма. Оптимальная концентрация — 0,1—1 мкг/мл, и при дальнейшем ее увеличении рост числа трансформантов обычно прекращается, вероятно, в связи с насыщением всех находящихся в культуре компетентных клеток. Если добавлять смесь различных ДНК в насыщающих концентрациях, то, очевидно, происходит конкуренция за участки адсорбции на клеточной поверхности и количество трансформантов снижается. Следует отметить, что адсорбировать ДНК могут не только компетентные, но и некомпетентные клетки. Однако последние связывают ДНК непрочно (обратимо, или неспецифически).

Целый ряд данных свидетельствует о том, что как у *Bac. subtilis*, так и у *Strept. pneumoniae* фрагменты трансформирующей ДНК вначале прикрепляются к клетке на определенных участках ее поверхности (рецепторах) одним своим концом, в то время как другой остается свободным. Соответственно и процесс вхождения ДНК в клетку начинается всегда с одного конца, т. е. имеется известная полярность вхождения (M. Gabog, R. Hotchkiss, 1966). При адсорбции на компетентных клетках *Bac. subtilis* высокомолекулярная ДНК распадается на крупные (в 3—5 МД) дунитевые фрагменты (рис. 17). По-видимому, этот этап необходим для осуществления трансформации. Следует отметить, что каждая клетка может связывать несколько молекул трансформирующей ДНК, по разным данным, от 20 до 200. Это соответствует числу рецепторов на клеточной поверхности. Общее количество поглощаемой ДНК может быть равно или даже превышать ее содержание в геноме.

У *Bac. subtilis* и *Strept. pneumoniae* в процессе проникновения трансформирующей ДНК через клеточную оболочку одна из ее нитей разрушается, а в клетку поступает другая нить. Этот одностебельный фрагмент образует комплекс с гомологичным

участком ДНК реципиента — наступает так называемая стадия синапсиса. Донорную и реципиентную ДНК в этом комплексе удерживают только водородные связи. Затем происходит включение (интеграция) однонитевого фрагмента ДНК донора в хромосому. При этом соответствующий участок нити ДНК реципиента «выбрасывается» из хромосомы и формируется так называемый гетеродуплекс, в котором одна нить принадлежит донору, а другая — реципиенту. Процесс завершается образованием ковалентных связей с восстановлением непрерывной структуры молекулы ДНК (рис. 17).

У *Bac. subtilis* описано большое число так называемых гес-мутаций, нарушающих хромосомную трансформацию. Так, мутация гесЕ почти полностью подавляет включение донорной ДНК в хромосому реципиента (D. Dubnau, C. Cirigliano, 1974). Продуктом гена гесЕ, по-видимому, является белок RecBs, который, подобно белку RecA *E. coli*, играет важную роль в процессах репарации и генетической рекомбинации, а также контролирует экспрессию генов SOB-регулона, аналогичного SOS-регулону *E. coli* (P. Love, R. Yashbin, 1986). Следует отметить, что у RecE-мутанта не нарушены ни адсорбция ДНК, ни проникновение ее в клетку.

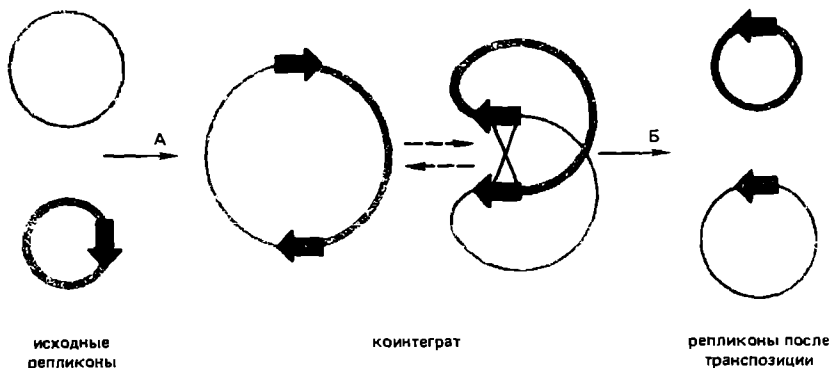


Рис. 17. Схема превращений трансформирующей ДНК в клетке-реципиенте у *Bac subtilis* (по А. А. Прозорову, 1980):

*a* — начало адсорбции двуниевой молекулы трансформирующей ДНК на поверхности компетентной клетки; *b* — образование двуниевых фрагментов ДНК и начало поглощения ее клеткой; *в* — образование однонитевых фрагментов ДНК внутри клетки; *г* — синапсис однонитевых фрагментов ДНК с хромосомой; *д* — включение ДНК донора в хромосому с возникновением лишь водородных связей; выбрасывание замещенных участков ДНК реципиента из хромосомы; *e* — возникновение ковалентных связей между ДНК донора и реципиента (показано стрелками)

При трансфекции компетентных клеток адсорбция ДНК фага и ее поглощение, видимо, происходят так же, как и при трансформации хромосомной ДНК. В процессе поступления в клетку фаговая ДНК фрагментируется. Затем наступает этап так называемой первичной рекомбинации, когда фрагменты фаговой ДНК воссоединяются, дополняя друг друга (N. Notani, 1973). Этот процесс требует присутствия в клетке нескольких молекул ДНК, дублирующих друг друга, поскольку некоторые участки одной молекулы могут быть повреждены при фрагментации. Например, для образования одной инфекционной частицы фага *H<sub>1</sub> Bac. subtilis* требуется, чтобы в клетку поступило 4—5 нативных молекул-геномов ДНК.

Следует отметить, что трансфекция может осуществляться также, если использовать хромосомную ДНК, содержащую профаг, выделенную из лизогенных клеток. При поглощении этой ДНК реципиентными клетками могут наблюдаться разные исходы, но чаще всего инфекция идет по литическому циклу с образованием зрелых фаговых частиц (W. Roming, 1968).

В какой-то мере трансформация плазмидной ДНК примыкает к трансфекции, если иметь в виду тот факт, что в обоих случаях, как правило, введенная ДНК не рекомбинирует с хромосомой реципиентной клетки и процесс завершается образованием репликаона фага или плазмиды. Механизмы плазмидной трансформации изучены недостаточно. Больше всего данных получено в работе с *Bac. subtilis*. Компетентные клетки этих бактерий можно трансформировать плазидами, несущими детерминанты устойчивости к антибиотикам, которые были обнаружены у *St. aureus* (S. Ehrlich, 1977, T. Gruzcan et al., 1978). Трансформация этими плазидами происходит с низкой частотой и в лучшем случае составляет всего несколько процентов от количества трансформаторов по хромосомным маркерам. Было показано, что в препаратах стафилококковых плазмид, в частности рС194, выделенных из клеток *Bac. subtilis*, имеются разные формы молекул ДНК:

- 1) мономеры — кольцевые молекулы, содержащие один полный геном плазмиды;
- 2) конкатамеры — кольцевые молекулы, содержащие два (и более) генома плазмиды, соединенных по схеме «голова — хвост»;
- 3) катенаны — образования, состоящие из нескольких кольцевых молекул, мономеров и конкатамеров, соединенных по схеме «кольцо через кольцо». (Эти формы, по-видимому, являются продуктами репликации плазмиды.)

Оказалось, что трансформирующая активность препаратов ДНК плазмид полностью определяется присутствием в них олигомерных форм, а мономерные кольцевые молекулы, а также димерные катенаны (т. е. мономер + мономер, соединенные «кольцо в кольцо») не способны трансформировать клетки *Bac. subtilis* (U. Canosi et al., 1978). Количество конкатамеров

в плазмидных препаратах различно в зависимости от вида плазмиды, способа ее выделения, генотипа клетки-хозяина и составляет 1—5% от общего количества ДНК в препарате.

Этапы, связанные с адсорбцией и проникновением ДНК в клетку *Bac. subtilis*, по-видимому, одинаковы как при хромосомной, так и при плазмидной трансформации. И в том, и в другом случае трансформирующая ДНК практически не чувствительна к системе рестрикции реципиента (D. Dubnau et al., 1980). Это может быть обусловлено тем, что в клетку поступает одонитевая ДНК, не подверженная действию эндонуклеаз рестрикции (см. гл. 3). Вскоре после проникновения в клетку в одонитевом виде плазмидная ДНК приобретает двойную структуру (W de Vos et al., 1981). Образование двунитевых молекул, по-видимому, происходит за счет объединения комплементарных нитей, происходящих из одной олигомерной молекулы или же за счет синтеза комплементарной нити при репликации. Завершение трансформации и образование в клетке плазмидного реплика в этом случае не требует функции гена *recE* (Gryczan et al., 1978). Следует отметить, что в генно-инженерных экспериментах обнаружена и *recE*-зависимая плазмидная трансформация (S. Contente, D. Dubnau, U. Canosi et al., 1981). Она напоминает хромосомную трансформацию, поскольку имеет сходную с ней стадию образования синаптических структур при взаимодействии двух молекул ДНК разного происхождения: одонитевой донорной (плазмидной) и двунитевой реципиентной (плазмидной или хромосомной).

Одним из важнейших этапов генетической трансформации является перенос молекул ДНК через оболочку клетки, обеспечивающий в конечном итоге процесс трансформации.

Как уже отмечалось, специфически адсорбировать и поглощать ДНК способны только компетентные клетки. На состояние компетентности влияют различные факторы внешней среды. Сюда относятся температура, рН, ионы металлов, осмотическое давление и др.

Компетентные клетки отличаются от некомпетентных изменением свойств клеточной оболочки. У них снижен поверхностный заряд, повышена чувствительность к осмотическому шоку. Последнее обстоятельство, обусловлено, по-видимому, тем, что у компетентных клеток обнажены участки цитоплазматической мембраны. Предполагается, что именно с ними и взаимодействует трансформирующая ДНК. Прямое доказательство роли частичного удаления клеточной стенки для трансформации клеток *Bac. subtilis* было получено Прозоровым (А. А. Прозоров, 1965). Он показал, что лизоцим в концентрации 1—2 мкг/мл заметно повышает выход трансформатов. При этом еще не происходит превращение клетки в протопласт. Более того, значительное удаление клеточной стенки подавляет компетентность.

В ряде последующих работ показана большая роль цито-

плазматической мембраны и ее образований в процессах адсорбции и поглощения ДНК. Так, было обнаружено, что у *Vac. subtilis* значительная часть трансформирующей ДНК, уже не чувствительная к обработке ДНКазой, связана с мезосомной фракцией цитоплазматической мембраны (E. Nester, D. Dooly, 1973). (Мезосомы — это выросты мембраны, вдающиеся внутрь клетки.) На клетках грамотрицательных бактерий *Haemophilus influenzae* были выявлены пузырьковидные мембранные структуры, получившие название трансформасом. Оказалось, что когда гомологичная (но не гетерологичная) ДНК добавляется к компетентным клеткам, она поступает в трансформасомы и затем постепенно перемещается из них в цитоплазму (M. Kahn et. al., 1983). При этом ДНК, по-видимому, проходит через мембрану трансформасом и через наружную и внутреннюю мембраны самой клетки.

Недавно было показано, что *Haemophilus parainfluenzae* также имеет поверхностные трансформасомы, которые в отличие от аналогичных образований *H. influenzae*, по-видимому, мигрируют в периплазму, как только они захватывают ДНК (F. Vaganu, M. Kahn, 1985). ДНК может длительное время находиться внутри этих образований, оставаясь не чувствительной к действию нуклеаз. Постепенно здесь образуются молекулы с односторонними концами или даже односторонние фрагменты ДНК, которые переходят в цитоплазму и вступают в гомологичную рекомбинацию с хромосомой.

С развитием компетентного состояния в клетках появляется ряд белков, которые участвуют в адсорбции и поглощении ДНК. Так, у *Vac. subtilis* эти процессы контролируются белковым комплексом с молекулярной массой 75 000 Д. Этот расположенный на мембране комплекс состоит из двух субъединиц ДНК-связывающего белка и двух субъединиц так называемой входной нуклеазы, обеспечивающей проникновение ДНК в клетку (B. Vosman, G. Venema, 1986).

В некоторых случаях видовая специфичность ДНК не влияет существенным образом на ее взаимодействие с соответствующими белками. Однако гемофильные бактерии, как уже было отмечено, избирательно адсорбируют и поглощают гомологичную ДНК (S. Goodgal, 1982). За специфическую адсорбцию ответственны определенные участки на молекулах ДНК, которые опознаются связывающими белками, расположенными, вероятно, на трансформасомах.

При трансформации источником энергии для перемещения ДНК через плазматическую мембрану, по-видимому, служит протонодвижущая сила, которая обеспечивает энергетически также процессы трансфекции и конъюгации. Вещества, снижающие мембранный потенциал, во всех этих случаях подавляют перенос ДНК в цитоплазму (Л. Л. Гринюс, 1983).

Таким образом, естественная компетентность бактерий обусловлена существованием специфических механизмов, которые



обеспечивают связывание, сохранение, своеобразный процессинг и транспорт трансформирующей ДНК через мембраны. Дальнейшее изучение регуляции этих процессов позволит сознательно их контролировать и повышать эффективность трансформации.

Микроорганизмы, у которых отсутствует естественная компетентность, тем не менее также могут быть трансформированы. Для этого их клетки обрабатывают тем или иным способом, индуцируя у них способность к поглощению ДНК. Наибольшую известность приобрел метод индукции компетентности у *E. coli* с помощью ионов кальция (M. Mandel, A. Higa, 1970). Клетки выдерживают в присутствии 50 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  при 0°C с последующим кратковременным тепловым воздействием при 37 или 42°C. В этих условиях возникает общее состояние компетентности и появляется возможность осуществления трансфекции, хромосомной и плазмидной трансформации (S. Cohen et al., 1972; S. Cosloy, M. Oishi, 1973). В ряде последующих работ этот метод был усовершенствован. Выяснилось, что эффективность трансформации повышается при совместном действии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Rb}^+$ , длительном инкубировании с ионами кальция, а также при добавлении диметилсульфоксида. Описана совокупность условий, при которых частота трансформации увеличилась в 100—1000 раз по сравнению с обработкой одним  $\text{CaCl}_2$ . Согласно этому методу клетки *E. coli* выращивают до середины логарифмической фазы в богатой среде с повышенным содержанием ионов  $\text{Mg}^{2+}$ , а затем смешивают при 0°C с трансформирующей (плазмидной) ДНК в присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Rb}^+$  (или  $\text{K}^+$ ), а также гексаминкобальтхлорида, диметилсульфоксида и дитиотреитола. В этих условиях на каждые 400 плазмидных молекул образуется один трансформант и для трансформации клетки достаточно, чтобы в нее проникла одна молекула (D. Hanahan, 1983).

Процесс трансформации и трансфекции в присутствии ионов кальция заметно стимулирует двунитевая РНК (дн-РНК) (Р. А. Захарян и др., 1986). Эффект дн-РНК связан с тем, что она значительно повышает в популяции число компетентных клеток. Причем действие дн-РНК проявляется в присутствии 10 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , т. е. при концентрации, которая сама по себе недостаточна для индукции компетентности.

Получение компетентных клеток с помощью ионов кальция и других щелочно-земельных металлов осуществлено также у нетрансформируемых штаммов псевдомонад, азотфиксатора *Azospirillum brasilense* и других грамотрицательных бактерий. Имеются сообщения о том, что аналогичным образом можно индуцировать компетентность и у грамположительных бактерий, в частности у *Brevibacterium lactofermentum* (Т. Tsuchida et al., 1981) и у *Bac. subtilis* (Т. Hara, S. Ueda, 1982).

Клетки дрожжей и мицелиальных грибов становятся ком-

патентными после обработки их солями лития (H. Ito et al., 1984). Так, для трансформации *N. crassa* линейными молекулами ДНК прорастающие конидии обрабатывают раствором (100 мМ) ацетата лития и 40%-ным полиэтиленгликолем (ПЭГ), а перед высевом на селективные среды подвергают тепловому шоку (J. Paietta, G. Marzluf, 1985).

Другой метод индукции компетентности предполагает инкубирование клеток в трис-НСI буфере при рН 8,3—8,9 в течение 30—40 мин. Например, после такой обработки удалось трансформировать плазмидной ДНК вегетативные клетки *Bac. thuringiensis*. Наилучшие результаты были получены, если буфер содержал 20%-ную сахарозу, а культуры выращивались до определенной оптической плотности. При этом частота трансформации составляла  $10^{-5}$  (A. Heierson et al., 1986). Трансформация термофильного анаэроба *Clostridium thermohydrosulfuricum* стафилококковыми плазмидами рUB110 и рGS13 после инкубации клеток в трис-НСI буфере при рН 8,3 происходит в присутствии ПЭГ (E. Soutschekbauer et al., 1985).

Наконец, еще один способ индукции компетентности — это глубокое замораживание с последующим оттаиванием клеток, что обеспечивает проникновение в них фаговой, плазмидной и хромосомной ДНК. Явление получило наименование соответственно криотрансфекции и криотрансформации (Б. Н. Ильяшенко и др., 1986). Чтобы получить трансформанты с помощью этого метода, смесь реципиентных клеток и ДНК в присутствии криопротектора (0,5% твина-80) замораживают до  $-196^{\circ}\text{C}$ , а затем отогревают при  $42^{\circ}\text{C}$  и высевают на селективные среды. Таким образом удалось осуществить трансформацию различных видов бактерий: *E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum* и др.

Механизмы индукции компетентности остаются не изученными. Предполагается, что высокие концентрации ионов кальция и других металлов вызывают структурную реорганизацию клеточных мембран, а также плазмолиз (сжатие цитоплазмы в связи с потерей воды). При этом усиливается мембранная проницаемость, увеличиваются размеры периплазматического пространства. Действительно, показано, что обработка ионами  $\text{Ca}^{2+}$  стимулирует поступление из среды в периплазму белка, связывающего у мальтозу (БСМ), и восстановление транспорта мальтозы у соответствующих мутантов *E. coli* (J. Brass et al., 1983). ДНК подавляет этот процесс, а БСМ снижает эффективность трансформации. Это свидетельствует о том, что обработка ионами  $\text{Ca}^{2+}$  усиливает поступление в периплазму ДНК и белка, которые конкурируют друг с другом за входение. Исследование структуры мембран бактерий, обработанных ионами щелочно-земельных металлов, обнаружило образование в них полиморфных изменений, участков соединения и слияния мембран (А. Г. Сабельников и др., 1985). В связи с этим предполагается, что ДНК поступает в цитоплазму сквозь дефекты мем-

бран, а также участки слияния мембран. Возможно, что аналогичные изменения возникают в клетках и под влиянием других воздействий, индуцирующих компетентность. Высказывается предположение, что в процессе замораживания — оттаивания молекулы ДНК поступают в цитоплазму путем пассивной диффузии через временные быстро репарируемые дефекты мембран (Б. Н. Ильяшенко и др., 1986).

Вместе с тем не исключено, что при индуцированной компетентности перенос ДНК через клеточную оболочку может осуществляться с помощью специфических систем транспорта, предназначенных или для самой ДНК, или же для других субстратов. Так, характеристики процесса трансформации, обнаруженные в работе Д. Ханахана, противоречат предположению о пассивной диффузии. В связи с выраженным стимулирующим эффектом гексаминкобальтхлорида, который, по-видимому, является аналогом кобаламина (витамина  $V_{12}$ ), и ингибирующим действием самого витамина  $V_{12}$  на трансформацию высказывается предположение, что ДНК может транспортироваться в клетки *E. coli* через каналы для  $V_{12}$ . Обработка же ионами  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  создает возможность для такого транспорта, поскольку экранирует фосфатные группы нуклеиновой кислоты (D. Hanahan, 1983). Согласно данным других исследователей, перенос ДНК может быть сопряжен с переносом ионов  $Ca^{2+}$ , возможно, через кальциевые каналы в виде Са-преципитата, поскольку в цитоплазме трансформированных клеток обнаруживается нераспавшийся комплекс ДНК с  $Ca^{2+}$  (A. Louter et al., 1982). По-видимому, трансмембранный перенос ДНК при различных способах обработки и у различных микроорганизмов может происходить и в результате пассивной диффузии, и с помощью активного транспорта, а также при их сочетании и при участии других механизмов (пиноцитоз, слияние мембран).

Таким образом, используя естественную компетентность или индуцируя компетентное состояние клеток, можно осуществлять генетическую трансформацию различных видов микроорганизмов, имеющих промышленное значение. Когда же трансформировать клетки не удается, с этой целью получают их протопласты.

Хромосомная трансформация применяется при картировании генов и в конструировании штаммов микроорганизмов. С ее помощью можно вводить в геном определенные маркеры и элиминировать нежелательные мутации. Так, используя трансформацию, удалось избавиться от гес-мутации, снижающей жизнеспособность клеток в штамме *Bac. subtilis*, продуцирующем триптофан. В результате заметно возросла его продуктивность (Н. И. Жданова и др., 1972).

Как уже отмечалось, методы генетической инженерии в значительной степени основаны на использовании плазмидной трансформации и трансфекции (см. гл. 3).

## § 7. Слияние протопластов

В последние годы в генетико-селекционной работе все чаще используются микробные протопласты. С помощью слияния протопластов можно получать генетические рекомбинанты у тех видов и штаммов микроорганизмов, у которых не обнаружены собственные системы обмена наследственной информацией и которые в естественных условиях никогда не скрещиваются между собой. Трансформация протопластов, по-видимому, является универсальным способом введения молекул ДНК в клетки бактерий, актиномицетов, дрожжей и грибов.

Термин «протопласты» применяют для обозначения структур, которые образуются после полного удаления клеточной стенки у клеток растений и микроорганизмов (С. Weibull, 1958). Когда нет уверенности в том, что клеточная стенка целиком отсутствует, или когда электронно-микроскопические исследования прямо указывают на сохранение каких-то ее элементов, говорят о «сферопластах» и соответственно о слиянии и трансформации сферопластов. Таким образом, сферопласты — это частичные протопласты. Следует отметить, что в некоторых случаях эффективность процессов слияния и трансформации при неполном удалении клеточной стенки заметно снижается.

Для получения протопластов у микроорганизмов (этот процесс называют протопластированием) используют несколько методов. Одни из них основаны на подавлении синтеза клеточной стенки структурными аналогами ее компонентов и антибиотиками. С этой целью используют пенициллин и фосфомицин или высокие концентрации аминокислот глицина, метионина, треонина и др. Указанные соединения так или иначе нарушают синтез пептидогликана — основного компонента ригидной оболочки бактерий. У дрожжей для получения протопластов применяют 2-дезоксиглюкозу — аналог глюкозы, препятствующий образованию у них клеточной стенки. В настоящее время эти методы в основном утратили самостоятельное значение.

Вторая группа методов предполагает ферментативный лизис клеточной стенки. С этой целью у бактерий широко используют фермент лизоцим, который растворяет пептидогликан. В некоторых случаях эффективность образования бактериальных протопластов повышается, если дополнительно обрабатывать клетки протеолитическими ферментами и липазами. У грамотрицательных бактерий обработку лизоцимом ведут в присутствии этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и только в этом случае получают удовлетворительные результаты (R. Weiss, 1976). Иногда используют более специфические ферментные препараты: лизостафин — для получения протопластов у стафилококков (R. Novick et al., 1980), мутанолизин — для получения протопластов у молочнокислых бактерий (J. Konda, L. McKay, 1982).

Для протопластирования мицелиальных грибов и дрожжей применяют литические ферменты из актиномицетов или грибов

базидиомицетов (J. Аппе, 1977). Клеточная стенка дрожжей эффективно растворяется также пищеварительным соком виноградной улитки *Helix pomatia* («геликаза»), который содержит несколько десятков различных ферментов. Кроме того, используют ферментные смеси, состоящие из геликазы, целлюлазы, гемицеллюлазы, хитиназы, пектиназы и других ферментов.

Нередко для получения протопластов клетки вырабатывают сначала в присутствии ингибиторов синтеза клеточной стенки, а затем обрабатывают их литическими ферментами. Например, протопластирование коринебактерий с помощью лизоцима осуществляют после культивирования их в среде с низкими (субингибирующими) концентрациями пенициллина (Н. Капеко, К. Sakaguchi, 1979). Преинкубация дрожжевых клеток с 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом повышает выход их протопластов. Предполагается, что тиоловые соединения разрушают дисульфидные мостики в белках клеточной стенки дрожжей.

Протопласты, имеющие только эластичную цитоплазматическую мембрану, сохраняют целостность и жизнеспособность в гипертонических средах, где они приобретают сферическую форму. В гипотонических растворах, например в дистиллированной воде, происходит лизис протопластов, и это является одним из показателей их образования. Поэтому получение протопластов и все манипуляции с ними проводят в присутствии осмотических стабилизаторов, которые добавляют в концентрациях (0,2—0,5 моль), компенсирующих внутриклеточное давление. В качестве осмотических стабилизаторов используют минеральные соли (KCl, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>), соли органических кислот (сукцинат натрия), многоатомные спирты (маннитол, сорбитол), углеводы (сахароза, рамноза, ксилоза и др.). Природа и концентрация осмотического стабилизатора могут влиять как на эффективность образования протопластов, так и на их стабильность. Например, протопластирование коринебактерий, проводят в среде, содержащей 0,41 М сахарозы. При более низких и более высоких концентрациях выход протопластов и их жизнеспособность снижаются. Кроме того, образование и сохранение протопластов зависят от температуры и pH среды, концентрации литического фермента и времени инкубирования с ним, возраста (фазы роста) протопластируемой культуры. Так, очень хорошо протопластируются старые культуры пенициллов и плохо — старые бактериальные культуры.

Оптимальной для образования протопластов бактерий является середина логарифмической фазы роста, а для многих актиномицетов — конец логарифмической фазы роста (R. Baltz, 1978).

В ядре (хромосоме) протопластов содержится вся информация, необходимая для восстановления (регенерации) клеточной стенки и для возвращения их (реверсии) к клеточной форме с характерной морфологией. Клеточная стенка у пенициллов восстанавливается в любых средах, даже в голодных — за счет

внутриклеточных ресурсов. Однако в большинстве случаев процесс реверсии очень сильно зависит от состава среды. На эффективность регенерации влияет ряд факторов: природа и концентрация осмотического стабилизатора, концентрация агара в среде, наличие микроэлементов, витаминов и белков-протекторов, температура и рН, уровень клеточного метаболизма.

Выбор того или иного осмотического стабилизатора и его концентрации определяется природой организма. Иногда даже для разных штаммов одного вида оптимальная концентрация и вид осмотического стабилизатора могут отличаться. Очень важным фактором, влияющим на реверсию протопластов, является плотность окружающей среды. В генетических экспериментах жидкие среды для регенерации практически не применяются, поскольку в этих условиях невозможен клональный анализ обрзающихся рекомбинантов. Кроме того, для эффективной регенерации клеточной стенки, очевидно, необходим контакт цитоплазматической мембраны с каким-либо поддерживающим каркасом. Показано, что реверсия протопластов бацилл и актиномицетов происходит гораздо лучше на средах, содержащих 2% агара, чем на средах с 0,7—0,8 агара. Значительно повышает частоту регенерации применение двухслойного метода. Протопласты ресуспендируют в мягком (0,4—0,7%) агаре или легкоплавкой агарозе и помещают на твердую агаризованную среду (1,5—2% агара). Показано также, что эффективность и скорость реверсии протопластов существенно повышается, если их высевать не на свежеприготовленные, а на частично (на 10—20%) дегидратированные (подсушенные) чашки.

Добавление в среду бычьего сывороточного альбумина, лошадиной сыворотки, 0,5% желатина положительно влияет на регенерацию клеточной стенки. Кроме того, эффективность этого процесса зависит от присутствия аминокислот, витаминов и микроэлементов. Вместе с тем на очень богатых средах уровень реверсии снижается, вероятно, в связи с несбалансированностью процессов роста протопластов и синтеза компонентов клеточной стенки.

Протопласты очень чувствительны к повышенной температуре, и поэтому даже кратковременное ее воздействие резко снижает эффективность реверсии.

Варьируя соответствующие параметры, можно, по-видимому, подобрать условия для получения и реверсии протопластов самых разных видов микроорганизмов. Однако, как считает Л. Альфёльди, эта работа до сих пор остается больше искусством, чем наукой (L. Alföldi, 1981). Следует подчеркнуть, что только определив условия, обеспечивающие удовлетворительную реверсию протопластов (обычно, не ниже 0,1%) к клеточной форме, можно приступать к их слиянию и трансформации.

Использование протопластов в генетических экспериментах стало возможным после того, как было обнаружено, что эффективным индуктором их слияния является полиэтиленгликоль

(ПЭГ) — хорошо растворимый в воде полимер (К. Као, М. Mischayluk, 1974). Поверхность клеток и протопластов заряжена отрицательно и окружена водным слоем. Эти факторы препятствуют контакту и слиянию мембран. Действие ПЭГ сводится к тому, что он, по-видимому, снижает поверхностный заряд протопластов и отбирает у них воду. Тем самым создаются условия для тесного контакта и слияния мембран. В местах слияния происходит разрыв мембран и содержимое двух соседних протопластов объединяется. Образующиеся структуры сохраняют способность к восстановлению клеточной стенки. В результате появляются гибридные клетки.

ПЭГ оказался универсальным агентом, вызывающим слияние протопластов различных видов эукариотических и прокариотических микроорганизмов, а также обеспечивающим их трансформацию и трансфекцию. Чаще всего с этой целью применяют полимер со средней молекулярной массой от 1000 до 6000 Д в концентрации 30—50% (масса/объем). При этих концентрациях осмотические стабилизаторы можно не использовать, поскольку эту функцию выполняет сам ПЭГ. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  повышают частоту слияния протопластов, и при pH 7,5 оптимальная их концентрация составляет 10 мМ. Ионы  $\text{Mn}^{2+}$  обычно ингибируют слияние. Кроме того, этот процесс подавляется высокими концентрациями ионов  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$   $\text{Cl}^-$   $\text{NO}_3^-$  и небольшими примесями EDTA, который иногда добавляют при протопластировании клеток. Слияние протопластов идет уже при 4°C, и эффективность его увеличивается при повышении температуры до 30°C. В этих условиях для успешного завершения процесса достаточно 2—5 мин инкубации с ПЭГ

В опыты по слиянию протопластов берут генетически маркированные штаммы микроорганизмов, часто несущие мутации ауксотрофности и устойчивости к антибиотикам (рис. 18). Перед обработкой ПЭГ суспензии протопластов исходных (родительских) штаммов смешивают и осаждают центрифугированием, что повышает частоту слияния. Затем смесь ресуспенсируют и высевают на гипертонические среды. Продукты слияния протопластов называются фузантами (от англ. fusion — слияние). При прямой селекции фузанты отбирают сразу на селективных гипертонических средах, где не могут ревертировать протопласты родительских штаммов. При непрямой селекции смесь протопластов, обработанную ПЭГ, высевают на неселективную гипертоническую среду, а для отбора фузантов выросшие колонии переносятся на селективные среды, не содержащие осмотического стабилизатора. Специфика отбора рекомбинантов, возникающих при слиянии протопластов, состоит в том, что необходимо создать подходящие условия не только для их селекции, но и для реверсии их к клеточной форме. Часто эти два процесса не могут эффективно осуществляться на минимальных средах. Поэтому во многих работах используется непрямой метод селекции фузантов. В этих условиях рекомбинанты у бацилл составляют до

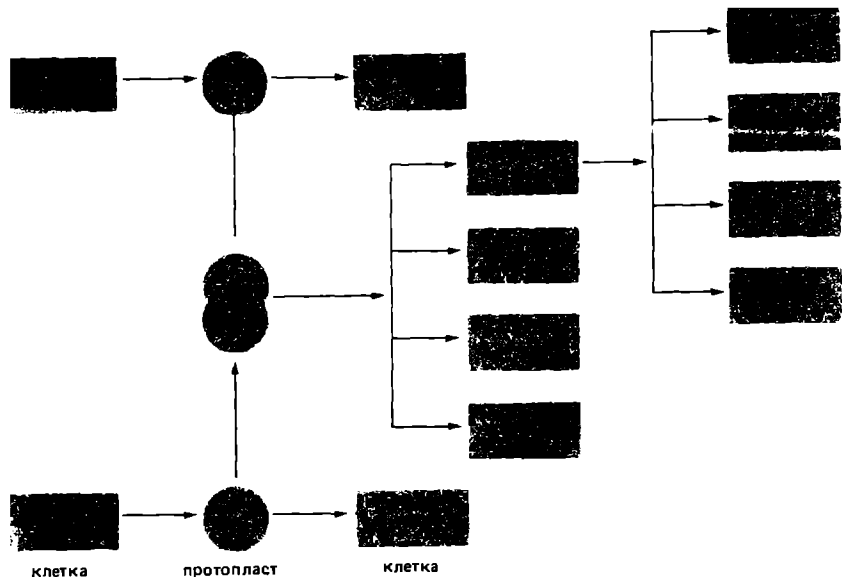


Рис. 18. Схема слияния протопластов (по L. Alföldi, 1981)

0,4%, а у актиномицетов — до 60% от суммарного титра ревертировавших протопластов. Таким образом, при слиянии протопластов гибридные клетки появляются с очень высокой частотой.

Следует указать на ряд особенностей метода слияния протопластов как способа генетического обмена. В отличие от конъюгации, трансдукции и трансформации у бактерий, при которых в реципиентную клетку попадает лишь часть наследственного материала донора, при слиянии протопластов объединяются и взаимодействуют целые геномы, а также все компоненты цитоплазм родительских клеток. Кроме того, в акте слияния может участвовать более двух протопластов разных штаммов и в результате сразу появляются рекомбинанты, наследующие признаки трех (и более) родителей. Образующиеся диплоидные, полиплоидные формы и гетерокарионы (у эукариот) обычно не стабильны и в неселективных условиях выщепляют гаплоидные рекомбинанты и исходные родительские формы (рис. 18). Это относится как к эукариотическим микроорганизмам, так и к бактериям и актиномицетам, у которых гаплоидизация может происходить в ранние сроки. Так, потомство первичных колоний, образовавшихся на селективной среде после слияния протопластов *Vac. megaterium*, состоит из следующих классов: 1) колоний, дающих смешанную популяцию нестабильных форм; 2) колоний, дающих смешанную популяцию стабильных форм; 3) колоний, дающих однородное и стабильное потомство (K. Fodor, L. Alföldi, 1976). Первые два класса, очевидно, образованы диплоидными клетками, которые могут существовать в течение многих генераций. При этом ро-



дительские геномы могут комплементировать, не рекомбинируя друг с другом, и диплоидные клетки как в селективных, так и в неселективных условиях дают жизнеспособное потомство, опять же диплоидное. Кроме того, у бактерий возможен еще один вариант взаимодействия геномов слившихся протопластов: они могут долгое время наследоваться совместно, не комплементируя друг друга. В опытах с протопластами *Bac. subtilis* было обнаружено, что 1—4% колоний, образовавшихся в результате реверсии слившихся протопластов, растут на средах, селективных для каждого из партнеров слияния в отдельности, но не способны расти на минимальной среде (R. Hotchkiss, M. Gabor, 1981). Эти колонии, названные впервые обнаружившими их авторами двуродительскими (biparental), не являются смесью родительских клеток. Они состоят из некомплетирующих диплоидов, которые существуют на протяжении 35—80 генераций и выщепляют клетки с обоими родительскими, рекомбинантными и двуродительскими генотипами. Необычное поведение таких диплоидных клеток объясняется тем, что одна из родительских хромосом находится в «репрессированном» состоянии и соответствующие ей генетические маркеры фенотипически не проявляются. Аналогичное явление наблюдали также при слиянии протопластов *E. coli* и *Clostridium acetobutlicum*. В то же время у кориннебактерий и стафилококков диплоидная фаза, очевидно, очень короткая и все потомство первичных колоний, полученных на селективных средах, представляет собой стабильные гаплоидные клетки.

У мицелиальных грибов первичные продукты слияния протопластов представляют собой комплементирующие гетерокарионы, которые легко распадаются на исходные родительские формы (L. Ferecszy, 1981). Иногда происходит слияние ядер и образование диплоидных конидий. У *Cephalosporium acremonium* за очень непродолжительной диплоидной стадией следует образование гаплоидных рекомбинантов (P. Hamlyn, C. Ball, 1979). Формирование прототрофных диплоидов, выщепляющих гаплоидные родительские и рекомбинантные формы, наблюдалось и при слиянии протопластов ауксотрофных штаммов *A. nidulans* (J. Anne, J. Peberdy, 1976).

У большинства дрожжей стадия гетерокариона очень непродолжительна и часто первичные продукты слияния представляют собой диплоиды (или триплоиды и даже тетраплоиды). Однако у некоторых видов, например у *Candida tropicalis*, так же как и у грибов, образуются более или менее стабильные гетерокарионы.

К настоящему времени способы получения и слияния протопластов описаны для многих десятков видов бактерий, актиномицетов, грибов и дрожжей. Как уже отмечалось, с помощью этого метода можно получать гибридные формы у тех видов микроорганизмов, у которых не обнаружены природные механизмы обмена наследственной информацией, но которые имеют важ-

ное значение для микробиологической промышленности. Тем самым созданы предпосылки для их генетического изучения и значительно расширены возможности для селекционной работы с ними. Техника слияния протопластов позволяет преодолевать специфические барьеры для гибридизации клеток, которые связаны с поверхностными структурами и компонентами клеточной стенки. Благодаря этому появляется возможность для получения межвидовых и межродовых гибридов, а также для скрещивания более далеких друг от друга в таксономическом отношении форм микроорганизмов.

Нестабильность фузантов затрудняет использование метода слияния протопластов для генетического анализа. Однако там, где образующиеся рекомбинанты — стабильные гаплоиды, например у некоторых видов актиномицетов и у стафилококков, этот метод успешно применяется для картирования генов и построения генетических карт (R. Baltz, 1980; M. Stahl, P. Pattee, 1983).

Слияние протопластов позволяет исследовать и выявлять цитоплазматическую детерминацию признаков. Например, высокая частота наследования фузантами способности к образованию актиномицина D при скрещивании продуцирующих и непродуцирующих штаммов *Streptomyces parvulus*, а также независимость передачи этого признака от хромосомных маркеров свидетельствуют об участии плазмид в регуляции синтеза указанного антибиотика (K. Ochi, E. Katz, 1980). Протопластирование и регенерация протопластов нередко сопровождаются утратой внехромосомных генетических элементов. С помощью такой процедуры получают бесплазмидные штаммы бактерии (R. Novick et al., 1980; M. Gasson, 1983). Однако процессы протопластирования и регенерации могут каким-то образом индуцировать также хромосомные перестройки и мутации, поэтому изменение фенотипа в этом случае не обязательно связано с избавлением клетки от плазмид.

Фузанты содержат в объединенной цитоплазме продукты генов обоих родительских штаммов, которые могут взаимодействовать между собой. На этом основано применение слияния протопластов для комплементационного анализа. Так, с помощью этого метода исследовали различные аспорогенные и олигоспорогенные мутанты *Bac. subtilis* (B. Danser, J. Mandelstam, 1981), ауксотрофные по аминокислотам мутанты *Candida albicans* (S. Kakar, P. Madee, 1982). На основании полученных данных все мутации были разбиты на определенное число групп комплементации.

Передача компонентов цитоплазмы при слиянии протопластов у дрожжей иногда ведет к появлению таких форм, как «гетероплазмы», или «гибриды», которые содержат ядерный геном одного из исходных штаммов и объединенный цитоплазматический материал обоих родителей (A. Morgan et al., 1982; A. Goodney, E. Revan, 1983). С другой стороны, можно выделять ядра из

клеток одного штамма и, инкубируя их в присутствии ПЭГ с протопластами другого штамма, добиться перехода очищенных ядер в протопласты реципиента (L. Ferenczy, M. Pesti, 1982). На основе таких экспериментов изучаются ядерно-цитоплазматические взаимодействия.

Как уже было отмечено, с помощью слияния протопластов можно получать межвидовые грибы. Частота образования, жизнеспособность и стабильность фузантов в этих экспериментах зависят от степени родства скрещиваемых штаммов. Поэтому указанный метод можно использовать для таксономического изучения микроорганизмов. Например, глутаматпродуцирующие бактерии *Cor glutamicum*, *Br flavum* и *Brevibacterium divaricatum* при слиянии протопластов эффективно скрещиваются между собой и приблизительно с одинаковой частотой дают стабильные гаплоидные рекомбинанты (В. А. Лившиц и др., 1981). Этот результат свидетельствует о высокой степени гомологии ДНК указанных бактерий и их принадлежности к одному и тому же виду. В то же время при слиянии протопластов *Bac. subtilis* и *Bac. licheniformis* вероятность образования межвидовых рекомбинантов на один-два порядка ниже, чем внутривидовых (Т. Akamatsu, J. Sekiguchi, 1983). При межвидовой гибридизации *Aspergillus fumigatus* и *A. nidulans* частота образования фузантов составляет  $10^{-5}$ , тогда как при внутривидовой — 40—60% по отношению к числу восстановивших клеточную стенку протопластов родителей (L. Ferenczy et al., 1977).

При межвидовом (межродовом) слиянии протопластов дрожжей нередко наблюдаются аномалии в распределении хромосом, образование abortивных продуктов, так называемых межвидовых анеуплоидов, очень нестабильных и имеющих сниженную жизнеспособность. Однако иногда возникают более стабильные abortивные продукты. Например, при слиянии протопластов *Saccharomyces diastaticus* и *Shizosaccharomyces pombe* выщеплялись анеуплоиды, содержащие геном *Sacchar. diastaticus* и одну хромосому *S. pombe*, которая неизменно сохранялась в потомстве (Н. Tamaki, 1982).

Универсальность, относительная простота и доступность метода слияния протопластов делают особенно полезным его применение в селекции промышленных микроорганизмов. Как уже отмечалось, генетическая рекомбинация в сочетании с мутагезом создает огромное многообразие форм и резко увеличивает материал для отбора. Тем самым значительно повышается производительность работы по получению новых штаммов с улучшенными свойствами. Метод слияния протопластов позволяет объединять в одном геноме мутации, положительно влияющие на продуктивность и полученные в разных селекционных линиях, в том числе такие, которые трудно или даже невозможно последовательно индуцировать в одной и той же клетке, а также избавляться от вредных мутаций, снижающих жизнеспособность штаммов-продуцентов. Во многих отношениях этот метод является более эф-

фактивным, чем все другие способы обмена наследственной информацией. Так, при слиянии протопластов актиномицетов частота образования рекомбинантов на 3—4 порядка превосходит вероятность их появления при конъюгации и иногда приближается к 100%. В этих условиях не требуются специальных приемов для контрселекции родительских штаммов. Кроме того, для применения протопластов практически нет никаких ограничений, в то время как конъюгация наблюдается только у отдельных видов. Все это делает метод слияния протопластов очень перспективным для селекционной работы с актиномицетами, которые являются продуцентами многих важных антибиотиков. Появились сообщения о том, что с помощью этого метода сконструированы эффективные штаммы-продуценты, например штамм *Streptomyces lactamdurans*, обладающий повышенной способностью к продукции цефамицина С (А. Wesseling, 1982).

Интересно, что в некоторых случаях повышение уровня синтеза антибиотиков происходит уже в результате одного или нескольких циклов протопластирования — регенерации протопластов штамма-продуцента. Так, штамм *Streptomyces fradiae*, синтезирующий тилозин, после двух раундов такой обработки втрое увеличил свою продуктивность (Н. Ikeda et al., 1983). Причины этого явления пока не исследованы.

Новые возможности для создания штаммов микроорганизмов с полезными и необычными свойствами открывает получение межвидовых и межродовых гибридов. Уже имеются примеры конструирования на основе межвидового слияния протопластов эффективных штаммов дрожжей, используемых в пивоварении, фагоустойчивых штаммов бактерий и актиномицетов. При слиянии протопластов *Vac. subtilis* и *Cellulomonas uda* получены грамположительные спорообразующие фузаны, способные усваивать целлюлозу в качестве единственного источника углерода. Очевидно, гены, контролирующие синтез целлюлаз, были перенесены в клетки сенной палочки (D. Gokhalle et al., 1983).

Передача признаков при слиянии протопластов разных видов бактерий, имеющих низкую гомологию ДНК, может быть связана с их локализацией на плаزمиде или транспозонах. Кроме того, нельзя исключать возможность транспозиции фрагментов (блоков) хромосомы, фланкированных IS-элементами. Внутривидовой и межвидовой перенос плазмид наблюдали при слиянии протопластов бактерий, принадлежащих к разным видам, родам и семействам. Так, стафилококковая плаزمида pC221, детерминирующая устойчивость к хлорамфениколу, передавалась от *Vac. subtilis* к *Vac. megaterium*, *Vac. lecheniformis* и *Vac. polymixa* (B. Dancer, 1980), а плаزمида RSF 1010 — между псевдомонадой и кишечной палочкой (Р. А. Желдакова и др., 1980). Сообщается также о переносе плазмид при слиянии протопластов *Streptococcus pneumoniae* и *Vac. subtilis*, *E. coli* и *Vac. subtilis*, об экспрессии в клетках *Strept. lactamdurans* стафилококковой плазмиды pUB110. Передача плазмид является одним из направ-

лений при конструировании штаммов с использованием метода слияния протопластов. Этот процесс не чувствителен к ДНКазе и может применяться в тех случаях, когда трансформация протопластов невозможна из-за высокой активности нуклеаз.

Метод плазмидной трансформации протопластов, разработанный первоначально для *Streptomyces coelicolor* (M. Bibb et al., 1978), *Sacchar. cerevisiae* (A. Hinneken et al., 1978) и *Bac. subtilis* (S. Chang, S. Cohen, 1979), в настоящее время стал универсальным способом введения молекул ДНК в клетки различных микроорганизмов. Согласно этому методу, протопласты смешивают с плазмидной ДНК, подвергают кратковременной обработке ПЭГ и высевают на гипертонические среды для регенерации клеточной стенки. В этих условиях трансформация идет с очень высокой частотой. Например, у *Bac. subtilis* на 1 мкг ДНК плазмиды образуется  $4 \times 10^7$  трансформантов, так что 80% всех регенеровавших протопластов оказываются трансформированными. Эффективными для трансформации являются как мономерные, так и олигомерные ковалентно замкнутые кольцевые молекулы плазмид. Показано, что плазмидная ДНК проникает в протопласты в двунитевой форме и для трансформации одной клетки достаточно одной молекулы. Линейные молекулы плазмид и фрагменты хромосомной ДНК также могут трансформировать протопласты, однако с низкой эффективностью. Вероятно, они более подвержены действию нуклеаз (W. de Vos, G. Venema, 1981). На основе использования плазмидной трансформации протопластов разрабатываются методы генетической инженерии многих промышленно важных микроорганизмов.

Таким образом, применение протопластов резко расширило возможности для генетического конструирования микроорганизмов *in vivo* и *in vitro*.

# Глава 3

## МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ *in vitro* /ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ/

---

Стремительное развитие молекулярной биологии и генетики микроорганизмов привело в первой половине 70-х годов нашего века к возникновению новой экспериментальной технологии, которая получила название *генетическая инженерия*, *генная инженерия* или работа с «рекомбинантной ДНК». Все три названия эквиваленты. В СССР большее распространение имеют первые два названия, на западе — последнее.

Суть этой технологии заключается в воссоединении фрагментов ДНК *in vitro*, т. е. «в пробирке», с последующим введением новых («рекомбинантных») генетических структур в живую клетку. Так как с химической точки зрения ДНК всех организмов однотипна, то *in vitro* возможно воссоединение фрагментов ДНК из любых организмов. В этом смысле рекомбинация *in vitro* отличается от обычной генетической рекомбинации, которая требует гомологии ДНК и, как правило, осуществляется в пределах одного или близкородственных видов. Другими словами, обычные методы обмена генетической информацией позволяют провести обмен генами внутри одного вида, тогда как генетическая инженерия, в принципе, открывает возможность, для перемещения генов в пределах всех живых организмов. Техника генетической инженерии впервые позволила получать индивидуальные фрагменты ДНК в достаточных количествах из генов любой степени сложности. В сочетании с методами быстрого определения последовательности оснований в ДНК эта техника впервые открыла исследователям путь к выяснению строения генов высших организмов, в том числе и человека.

Знакомство с генетической инженерией следует начать с выяснения основных принципов этой техники. Главным философским итогом развития современной биологии явилось выявление удивительной универсальности жизни на молекулярном уровне. Действительно, во всех живых системах носителем генетической информации являются нуклеиновые кислоты (ДНК или реже

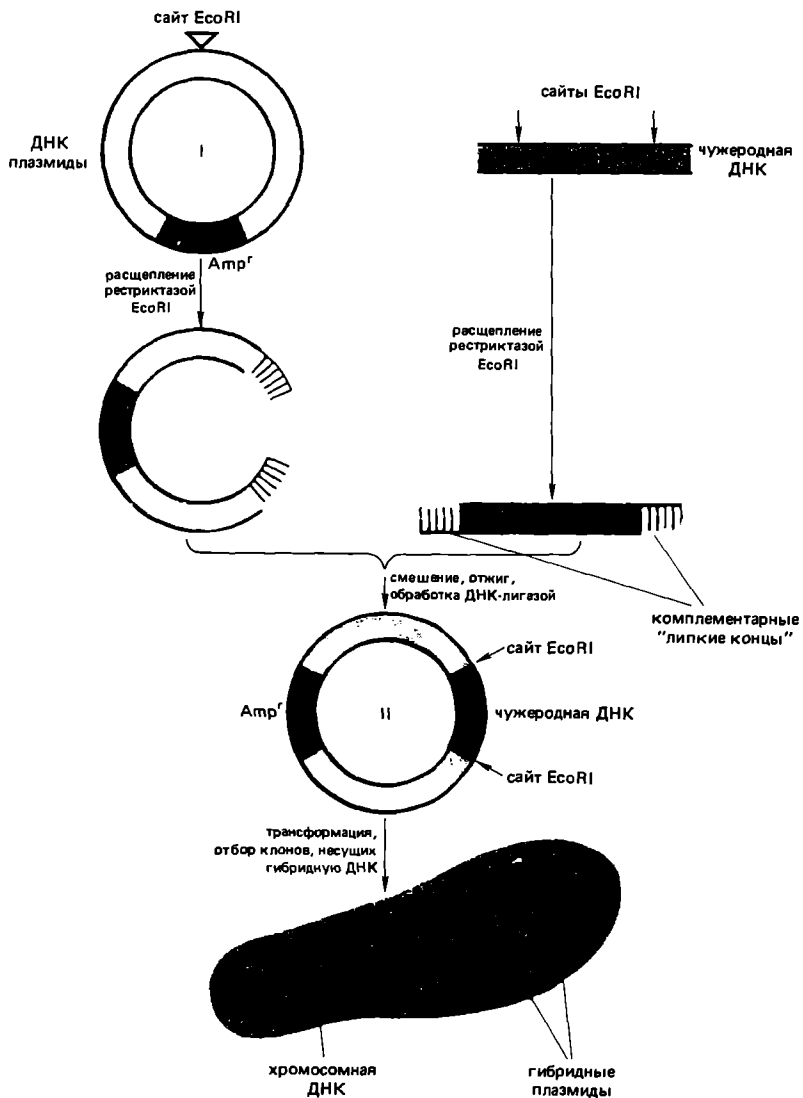


Рис. 19. Схема типового опыта по генной инженерии: Amp<sup>r</sup> — устойчивость к ампициллину — генетический маркер плазмиды

РНК), причем эта информация записана на языке универсального генетического кода. Молекула АТФ является общим переносчиком энергии во всех живых клетках. Двадцать аминокислот составляют белки всех живых организмов и т. д. Для исследователя особенно важно, что воспроизведение макромолекул в живых системах также подчиняется общим принципам. Так, для

процесса удвоения ДНК (репликация), матричного синтеза РНК (транскрипция) и синтеза белка (трансляция) существенными являются последовательности нуклеотидов матрицы в районе начала и окончания процессов и малое значение имеет последовательность, заключенная между этими специфическими сайтами (см. рис. 1). Именно это обстоятельство позволяет создать такие гибридные молекулы ДНК, которые будут стабильно реплицироваться после внедрения в реципиентную клетку, и даже такие, в которых чужеродная генетическая информация будет экспрессироваться, т. е. управлять синтезом чужеродного белка.

Типовой эксперимент в генной инженерии состоит из следующих этапов: 1) получение фрагмента (или смеси фрагментов) ДНК; 2) конструирование *in vitro* рекомбинантных молекул ДНК, состоящих из фрагментов, полученных на первом этапе, и небольших автономно реплицирующихся в клетке-реципиенте структур (плазмид, фагов, вирусов), носящих название *векторов*; 3) введение рекомбинантных молекул ДНК в клетку-реципиент; 4) отбор клонов, несущих нужную рекомбинантную молекулу. Схема такого эксперимента приведена на рис. 19. Плаزمид-вектор (I) и чужеродная ДНК расщепляются эндонуклеазой рестрикции (в данном случае EcoRI), образуя фрагменты линейной двунитчатой ДНК с комплементарными «липкими» концами. В процессе отжига\* могут образоваться различные комбинации фрагментов, в том числе и кольцевая структура (II), содержащая вектор и искомый фрагмент чужеродной ДНК. Обработка лигазой делает кольцо ковалентно замкнутым. После трансформации и высева на селективную среду отбирают колонии, несущие гибридную плазмиду.

Рассмотрим подробнее каждый из этапов, приведенных на рисунке.

## § 1. Источники ДНК для клонирования

Существует три различных источника молекул ДНК, используемых в генной инженерии. Первым, важнейшим из них, являются *фрагменты генетического материала различных организмов*. Вторым источником могут быть *двунитевые дезоксирибонуклеиновые кислоты*, полученные на основе однонитевой ДНК комплементарной мРНК эукариотических организмов (дн-кДНК).

Подобные копии применяются для экспрессии в бактериях важных с медицинской точки зрения белков человека и животных, таких, как инсулин, ренин, гормон роста и др. В данном случае фрагменты генома нельзя использовать. Это связано с тем, что у эукариот отдельные части некоторых структурных генов разобщены: кодирующие последовательности (экзоны) чередуются с некодирующими вставочными последовательностями (интроны). Ген целиком транскрибируется с образованием первичного транскрипта РНК, затем транскрипты интронов выщепляются, а последовательности соответствующие экзонам, сши-

---

\* В данном случае — процесс реассоциации молекул ДНК с образованием водородных связей между комплементарными основаниями.



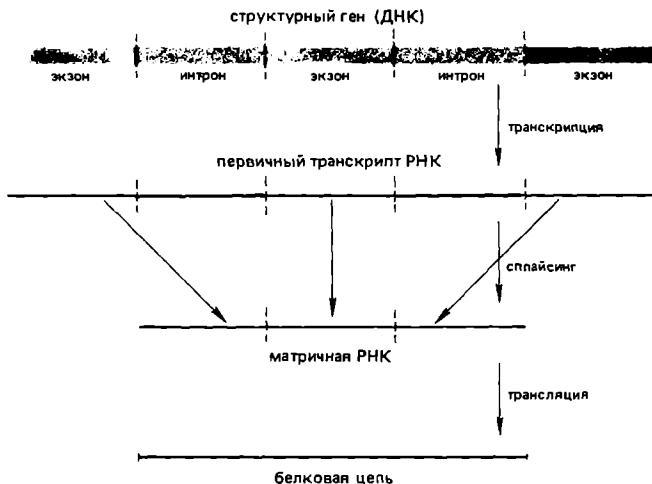


Рис. 20. Схема экспрессии генов у эукариот

ваются с образованием матричной РНК (рис. 20). Этот процесс созревания мРНК называется *сплайсингом*. Прокариотические организмы не способны осуществлять сплайсинг.

Синтез дн-кДНК достаточно сложен. Этапы синтеза двуниевой кДНК схематически приведены на рис. 21. Полиаденилированная мРНК отжигается с олиго-дТ, который служит затравкой при копировании нити обратной транскриптазой. РНК-нить удаляется гидролизом — щелочью. По не выясненным до конца причинам на 3'-конце кДНК образуется шпильчатая структура, которая может использоваться как затравка при построении второй нити ДНК. Для построения второй нити используют фрагмент Клёнова ДНК-полимеразы *E. coli* (у этого фрагмента отсутствует 5'→3'-экзонуклеазная активность). Для удаления олиго-дТ и односторонней петли используют S1-нуклеазу, расщепляющую одностороннюю ДНК. При соблюдении условий синтеза возможно получение полноразмерных копий мРНК в несколько тысяч пар оснований.

Следует отметить, что отечественная промышленность выпускает сегодня все ферменты, необходимые для такого синтеза. Большой вклад в разработку процесса, в создание ферментной базы для него сыграл проект «Ревертаза»\*, осуществленный в 1975—1980 гг. под руководством академика В. А. Энгельгардта.

Третий источник молекул ДНК для клонирования — химический, вернее, *химико-ферментативный синтез генов*. В настоящее время методы синтеза нуклеотидов успешно развиваются. Ил-

\* Ревертаза — слово, предложенное В. А. Энгельгардтом для обозначения фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (другое название — обратная транскриптаза).

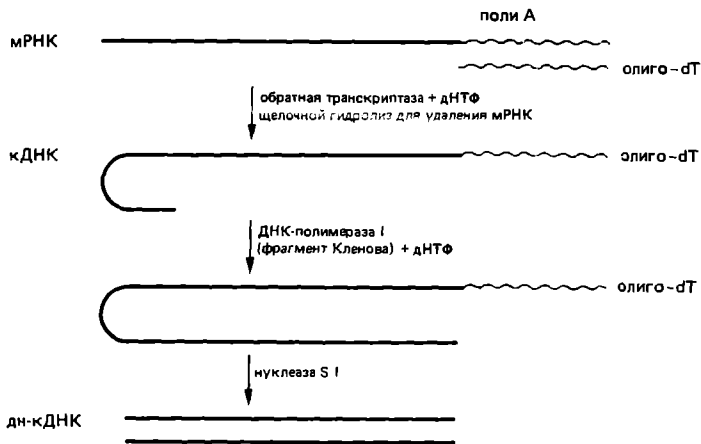


Рис. 21. Синтез двунитевой копии ДНК по матрице зрелой информационной РНК

люстрацией этому является синтез гена лейкоцитарного интерферона человека (более 600 п. о.), осуществленный в нашей стране в 1982—1984 гг. под руководством академика М. Н. Колосова и члена-корреспондента АН СССР Л. С. Сандахчиева.

Чтобы синтезировать ген, нужна предварительная информация о его нуклеотидных последовательностях, или об аминокислотных последовательностях в соответствующем белке. Определение нуклеотидных последовательностей, в свою очередь, требует клонирования фрагмента ДНК, особенно в случае генов большой сложности, каковыми являются даже геномы бактерий.

Как уже было отмечено, важнейшим источником генов являются геномы живых организмов. Строение и размер геномов в целом отражают положение организма в эволюционном ряду. Геном бактерии *E. coli* состоит из кольцевой двуспиральной молекулы ДНК размером  $5 \cdot 10^6$  п. о., что соответствует около  $3 \times 10^9$  Д. Геном человека и высших животных содержит в тысячи раз большее количество ДНК, распределенное по нескольким десяткам хромосом. До появления метода генетической инженерии, т. е. до 1972 г., единственным способом фрагментации ДНК было ее гидродинамическое дробление. Препараты очищенной ДНК, как правило, имеют молекулярную массу в пределах  $30—50 \cdot 10^6$  Д, т. е. в процессе выделения происходит 100 разрывов на хромосому *E. coli*. Достаточно простыми методами (пропуская раствор ДНК многократно через иглу шприца) можно получить фрагменты ДНК в  $1—5 \cdot 10^6$  Д, т. е. размером со средний ген. Гидродинамические разрывы происходят в произвольных точках молекулы ДНК, что приводит к образованию чрезвычайно сложной смеси неидентичных фрагментов. Достаточная выборка

фрагментов, полученных таким способом, достоверно перекрывает весь геном, что и используется в генной инженерии для создания представительных *клонотек* — *банков генов*. Однако соединить такие фрагменты с молекулами-векторами достаточно сложно, что и определило сравнительно редкое использование в современной генной инженерии гидродинамического способа фрагментации ДНК.

Становление генной инженерии связано с открытием и использованием специального класса ферментов — специфических *эндонуклеаз*, или *рестриктаз*. Ферменты этого типа являются составной частью системы рестрикции — модификации прокариотических клеток. Различают три основных класса рестриктаз: I, II и III. Все рестриктазы узнают на двуспиральной ДНК строго определенные нуклеотидные последовательности. Однако рестриктазы класса I осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, а рестриктазы классов II и III узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. Ферменты типов I и III имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей — модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной. Ферменты II-го класса состоят из двух отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. В силу указанных причин в **генной инженерии используют исключительно рестриктазы класса II.**

Существование системы рестрикции — модификации связано с защитой клеток от проникновения чужеродной ДНК. В норме системы модификации осуществляет метилирование ДНК немедленно после репликации. Важно, что рестриктаза, узнающая тот же сайт, что и соответствующая метилаза, практически не расщепляет ДНК, если хотя бы одна из цепей метилирована. Чужеродная ДНК, попавшая в клетку, атакуется рестриктазой, так как эта ДНК либо не модифицирована, либо модифицирована в системе с другой специфичностью (метилирована, но по другим сайтам). Парадоксально, что рестриктазы, предназначенные защищать клетку от проникновения чужеродной ДНК, послужили мощным инструментом преодоления межвидовых барьеров переноса генетической информации.

Большинство рестриктаз класса II узнают на ДНК последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, обладающих осью симметрии второго порядка. В 1973 г. американские исследователи Х. Смит и Д. Натанс предложили номенклатуру для обозначения ферментов системы рестрикции — модификации. В соответствии с этой номенклатурой, которая сегодня является общепринятой, первая буква рода и две первые буквы вида образуют состоящие из трех букв сокращения источника выделения фермента. Эндонуклеазы обозначают символом R, метилазы — M. Если из одного типа клеток выделены два или больше ферментов рестрикции, то их нумеруют соответственно римскими цифрами. Исходя из этой номенклатуры рестриктазы *E. coli*

Таблица 2. Некоторые рестриктазы, используемые в генной инженерии

Обозначение рестриктазы	Последовательность, узнаваемая рестриктазой	Обозначение рестриктазы	Последовательность, узнаваемая рестриктазой
EcoRI	G <sup>↓</sup> AATTC CTTAA <sub>↑</sub> G	XhoI	C <sup>↓</sup> TCGAG GAGCT <sub>↑</sub> C
Hind III	A <sup>↓</sup> AGCTT TTCGA <sub>↑</sub> A	Hind II	GPyC <sup>↓</sup> GPuC CPuG <sub>↑</sub> CPyG
BamHI	G <sup>↓</sup> GATCC CCTAG <sub>↑</sub> G	Sau 3A	<sup>↓</sup> GATC CTAG <sub>↑</sub>
Bgl II	A <sup>↓</sup> GATCT TCTAG <sub>↑</sub> A	Pvu II	CAG <sup>↓</sup> CTG GTC <sub>↑</sub> GAC
Bal I	TGG <sup>↓</sup> CCA ACC <sub>↑</sub> GGT	Kpn I	GGTAC <sup>↓</sup> C C <sub>↑</sub> CATGG
Pst I	CTCGA <sup>↓</sup> G G <sub>↑</sub> AGCTC	Xba I	T <sup>↓</sup> CTAGA AGATC <sub>↑</sub> T
Sal I	G <sup>↓</sup> TCGAC CAGCT <sub>↑</sub> G	Sac I	GAGCT <sup>↓</sup> C C <sub>↑</sub> TCGAG
EcoR II	<sup>↓</sup> CCAGG GGTCC <sub>↑</sub>	Cfr 6I	CAG <sup>↓</sup> CTG GTC <sub>↑</sub> GAC
EcoR V	GAT <sup>↓</sup> ATC CTA <sub>↑</sub> TAG	Cfr 9I	C <sup>↓</sup> CCGGG GGGCC <sub>↑</sub> C
BsuR I	GG <sup>↓</sup> CC CC <sub>↑</sub> GG	Dpn I	GA <sup>↓</sup> TC CT <sub>↑</sub> AG

обозначаются как EcoRI, EcoRV и т. д., а рестриктаза из *Bac. subtilis* BsuI и т. д.

В табл. 2 приведены некоторые из рестриктаз, широко используемых в генной инженерии, и их характеристики. Разрывы цепей ДНК могут осуществляться либо по оси симметрии, и тогда образуются фрагменты с «тупыми» концами (например, рестриктаза Bal I), либо на некотором расстоянии от оси, и тогда образуются фрагменты с выступающими «липкими» односторонними 5' (рестриктаза EcoRI)-или 3' (рестриктаза PstI)-концами.

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз класса II, однако среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары или группы называют *изошизомерами*. Различают истинную изошизомерию, когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрезают ДНК в одних и тех же точках, и ложную, когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность (сайт) из четырех нуклеотидов,

должна встречаться в среднем один раз через каждые 256 п. о., а для ферментов, узнающих шесть нуклеотидов, — через 4096 п. о. Очевидно, что если сайт рестрикции окажется внутри гена, то обработка ДНК рестриктазой приведет к его инаktivации. Вероятность такого события очень велика при использовании мелкощепящих рестриктаз (узнающих четверки нуклеотидов) и значительна при употреблении крупнощепящих (узнающих шестерки нуклеотидов). Поэтому с целью получения неповрежденного гена расщепление проводят поочередно несколькими крупнощепящими рестриктазами либо применяют прием «недорестрикции», т. е. рестрикцию осуществляют в таких условиях, при которых происходит расщепление лишь в одном сайте из нескольких возможных.

Особую ценность для геной инженерии представляют рестриктазы, под действием которых образуются фрагменты с самокомплементарными «липкими» концами: они эффективно используются при конструировании рекомбинантных молекул.

## § 2. Методы воссоединения фрагментов ДНК

Наиболее простой и широко применяемый метод соединения фрагментов ДНК — это отжиг фрагментов, полученных после обработки ДНК рестриктазой, образующей «липкие» комплементарные одностебельные концы, с последующей обработкой ДНК-лигазой. Лигаза катализирует образование фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами, т. е. восстанавливает ковалентную непрерывность цепей ДНК (см. рис. 19). Наличие «липких» концов не является обязательным условием для воссоединения фрагментов ДНК-лигазой. Так, ДНК-лигаза, кодируемая фагом T4 (но не лигаза *E. coli*), способна соединять и полностью двунитевые фрагменты. Однако, для того чтобы эта реакция протекала эффективно, необходимо наличие высокой концентрации ДНК и значительно большей (приблизительно в 10 раз) концентрации фермента.

Представим ситуацию типичного опыта, при котором смешиваются фрагменты ДНК, полученные из хромосомы *E. coli* (или другой бактерии) после обработки крупнощепящей рестриктазой с ДНК плазмиды-вектора, подвергнутого той же обработке. Векторы устроены таким образом, что чаще всего при обработке рестриктазой образуют один линейный фрагмент, зато хромосомная ДНК будет представлена набором приблизительно в 1000 разных фрагментов. При отжиге и лигировании такой смеси образуются не только гибридные молекулы, но и исходные векторы, что затрудняет дальнейшую работу, так как обычно селекция клеток, трансформированных рекомбинантной плазмидой, ведется на первом этапе по маркерам вектора. В этом случае клетки, получившие исходный вектор и рекомбинантную молекулу, неразличимы.

Разработаны специальные методы воссоединения фрагментов

ДНК, позволяющие направить процесс преимущественно в сторону получения гибридных молекул. Один из методов основан на расщеплении ДНК вектора несколькими рестриктазами, с тем чтобы уменьшить вероятность самосборки исходного вектора *in vitro*. Этот метод используется в том случае, когда при расщеплении ДНК вектора нужной рестриктазой образуется несколько фрагментов, не все из которых необходимы для обеспечения жизнеспособности будущей рекомбинантной молекулы.

Другой эффективный метод, позволяющий предотвратить воссоединение кольцевой векторной молекулы при обработке ДНК-лигазой, заключается в отщеплении концевых фосфатных групп от линейной ДНК под действием щелочной фосфатазы. Образование ДНК-лигазой кольцевых молекул ДНК *in vitro* в этом случае возможно только в присутствии фрагментов донорной ДНК, имеющих неповрежденные 5'-фосфатные группы на 5'-концах. В результате создаются гибридные кольцевые молекулы с одонитевыми разрывами в комплементарных нитях ДНК, которые репарируются клеткой *in vivo*. Метод фосфатазной обработки широко используется при воссоединении фрагментов как по липким, так и по тупым концам.

Часто у экспериментатора возникает потребность клонирования фрагмента ДНК, полученного расщеплением одной рестриктазой, в векторе, имеющем сайт расщепления для другой рестриктазы. С этой целью широко применяются короткие синтетические двуспиральные олигонуклеотиды, имеющие в своем составе сайты узнавания для одной или нескольких рестриктаз. Такие олигонуклеотиды называют *линкерами* или *полилинкерами* (см. рис. 27) соответственно.

Еще один метод воссоединения фрагментов основан на свойстве фермента — терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы — достраивать нуклеотидные последовательности к 3'-ОН-концам фрагментов ДНК (коннекторный метод). Сущность метода заключается в присоединении к концам одного из соединяемых фрагментов ДНК одонитевого полинуклеотида, например поли А (dA), а к другому — комплементарного ему, например поли Т (dT). Достроенные таким образом фрагменты смешивают и отжигают для образования кольцевых структур. Возможные бреши ликвидируют обработкой экзонуклеазой III, ДНК-полимеразой и лигазой, в результате чего получают ковалентно замкнутые кольцевые молекулы.

Основными достоинствами коннекторного метода являются возможность его применения независимо от природы и способа получения фрагментов ДНК и высокий выход рекомбинантных молекул. Важно, что при таком способе воссоединения фрагментов ДНК не могут образоваться исходные кольцевые векторные молекулы.

К недостаткам метода следует отнести трудности, которые возникают при точном вырезании клонированных фрагментов. Кроме того, протяженные гомополимерные участки могут отри-

цательно влиять на стабильность плазмид из-за внутримолекулярной рекомбинации, а также на экспрессию генов, если она контролируется промотором вектора.

### § 3. Векторные молекулы

**Вектором** называется та часть рекомбинантной ДНК, которая обеспечивает ее проникновение и репликацию в клетке-хозяине. Векторная молекула должна обеспечивать также стабильное наследование гибридных молекул. Для обеспечения интеграции чужеродной ДНК в векторной молекуле необходимо присутствие сайтов расщепления рестриктазами, которые должны локализоваться в области, не существенной для репликации векторной молекулы. Наконец, векторная молекула должна нести хотя бы один генетический маркер, позволяющий фенотипически определить ее присутствие в клетке-хозяине. Любая молекула ДНК, обладающая данными свойствами, может использоваться как вектор.

На самом деле, реальные векторы должны обладать еще целым рядом свойств в зависимости от целей их применения. Так, очень важно, чтобы вектор позволял осуществлять вставку чужеродной ДНК различной молекулярной массы и чтобы свойства вектора давали возможность различать клоны бактерий, несущих исходные векторные и рекомбинантные молекулы. Удобно работать с небольшими по размеру векторами, которые к тому же дают большое число копий на клетку, что облегчает выделение и очистку векторной и рекомбинантной ДНК. Векторная молекула должна иметь как можно больше единичных последовательностей, узнаваемых различными рестриктазами, что может обеспечиваться введением полилинкеров. Лучшее всего разработана система вектор — хозяин для бактерий *E. coli*. В этом случае используется четыре типа векторов: 1) плазмиды; 2) бактериофаг  $\lambda$ ; 3) производные бактериофага  $\lambda$  (космиды и фазмиды)\*; 4) бактериофаг M13.

**Плазмиды.** Как уже отмечалось (см. гл. 2), плазмиды представляют собой внехромосомные генетические элементы, которые встречаются во многих видах бактерий. Они существуют обычно в виде ковалентно замкнутых кольцевых суперспиральных молекул ДНК, что является физической особенностью, которая лежит в основе ряда методов очистки плазмид. В качестве векторов используются обычно небольшие плазмиды размером до 15—20 т. п. о., чаще всего от 2 до 10 т. п. о.

Как правило, репликация плазмидной ДНК осуществляется при участии тех же ферментов, что и дупликация бактериальной хромосомы. Обычно молекулы плазмиды содержат один или несколько генов, которые кодируют белки, регулирующие репликацию. Кроме того, плаزمида должна содержать специальный участок инициации репликации, который называется *ori*. Область

\* Другое название — фагемиды, плазмидофаги.

ДНК плазмиды Col E1 и ее производных, ответственная за репликацию, насчитывает 580 п. о.

Различают строгий и нестрогий контроль репликации плазмид. При строгом контроле репликация плазмид сопряжена с репликацией хромосомы хозяина так, что в каждой бактериальной клетке присутствует лишь одна или немного копий плазмиды. Число копий плазмид, находящихся под ослабленным контролем, составляет 10—200. Это число можно увеличить до нескольких тысяч, если подавить синтез белков бактериальной клетки (например, обработав клетки хлорамфениколом). В отсутствие синтеза белка репликация плазмид с ослабленным контролем продолжается, а репликация хромосомной ДНК и плазмид, находящихся под строгим контролем, прекращается.

Для *E. coli* создано очень большое число векторных плазмид. Особенно большое распространение получили производные плазмиды ColE1, такие как pBR 322 (рис. 22 и табл. 3). Для pBR 322 установлена полная нуклеотидная последовательность, что значительно облегчает анализ рекомбинантных молекул. Размер плазмиды — 4362 п.о. Плазмиды кодирует устойчивость клеток к ампициллину и тетрациклину, содержит единичные сайты для рестриктаз *Ava*I, *Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Nde*I, *Nru*I, *Pst*I, *Pvu*I, *Pvu*II, *Sal*GI, *Sna*I, *Sph*I, *Fth*III, *Xma*III, *Bal*I.

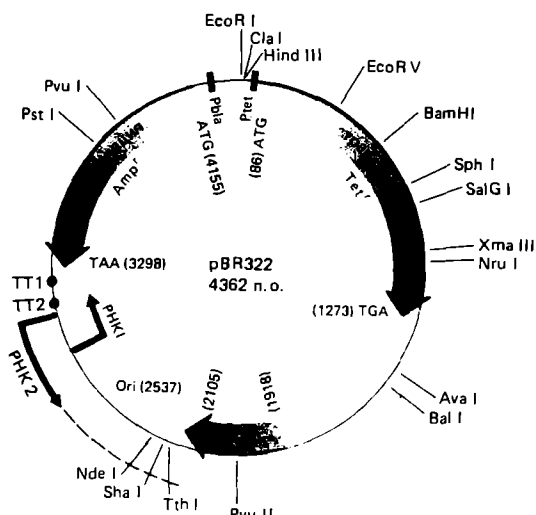


Рис. 22. Рестрикционная карта плазмиды pBR 322:

цифрами указаны нумерация нуклеотидов; тонкие черные стрелки — единичные сайты, узнаваемые рестриктазами; красные стрелки — направление транскрипции; *Phe*I — промотор гена *Amp<sup>r</sup>* — устойчивости к ампициллину; *Pst*I — промотор гена *Tet<sup>r</sup>* — устойчивость к тетрациклину *Tt*1 — Rho-независимый терминатор транскрипции (положение 3140—3160); *Tt*2 — положение 3080—3110; *ROP* — белок, способствующий образованию дуплексов между *PHK* 1 и *PHK* 2 (негативный регулятор копияности); *PHK* 1 — контрольная РНК, (контролирует копияность плазмиды); *PHK* 2 — «праймерная» РНК (служит затравкой для репликации); толстые черные стрелки — направление транскрипции *PHK* 1 и *PHK* 2



Таблица 3. Некоторые векторы, сконструированные на основе плазмиды Col E1

Наименование вектора	Размер, МД	Селективные маркеры	Единичные сайты для рестриктаз
pBR 322	4,3	Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	Ava I, Pst I, Bam HI, Pvu II, Cla I, Sal I, EcoR I, Hind III
pXf 3	3,16	Ap <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>	EcoR I, Cla I, Hind III
pInk 322	3,8	Ap <sup>r</sup>	Cla I, Hind III, Xba I, Bgl II, Bam HI
pМК 16	4,6	Col E1 <sup>imm</sup> Kn <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Bam HI, Sma I, EcoR I, Xho I, Hinc II, Sal I, Bst E II
pКС 7	5,8	Ap <sup>r</sup> , Kn <sup>r</sup>	Sma I, Xho I, Bst E II, Bam HI, Pvu II, EcoR I, Hind III, Bgl II, Bcl I
pUC 19	2,7	Ap <sup>r</sup>	EcoR I, Pst I, Sal I, Bam HI, Sph I, Xba I, Sac I, Kpn I, Hind III, Acc I, Hind III
pTG 29	4,4	Cm <sup>r</sup> , Amy <sup>+</sup>	Pst I, EcoR V, Hind II, Hind III, Kpn I, Bam HI
pML 2.1	3,2	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> , lac OP <sup>+</sup>	EcoRI, Bam HI, Pst I, Pvu I, Hind II, Acc I

Клонирование в PstI-сайте инактивирует ген устойчивости к ампициллину, а клонирование в BamHI-, HindIII-, SalGI- и EcoRV-сайтах инактивирует ген устойчивости к тетрациклину. Таким образом, при трансформации клеток *E. coli* смесью молекул ДНК, полученных в результате рекомбинации *in vitro* (см. рис. 19) при использовании указанных рестриктаз можно фенотипически отличить трансформанты, получившие векторную молекулу (клетки устойчивы к двум антибиотикам), от клеток с рекомбинантными молекулами (устойчивость к одному антибиотику). Этот прием часто используется в генной инженерии и называется *инактивирующей маркера в результате вставки*.

Хотя векторы, несущие два (или более) селектируемых маркера, и позволяют в большинстве случаев отбирать бактерии, содержащие гибридные плазмиды, по инаktivации одного из маркеров, однако для этого требуется перенос клонов трансформантов с одной среды на другую методом отпечатков. Это трудоемкая операция, особенно при анализе большого числа клонов. Поэтому в настоящее время сконструированы векторы, позволяющие производить прямой отбор клонов, несущих гибридные молекулы. Для этого в векторную молекулу вводят ген, выражение которого в определенных условиях вызывает гибель клетки. Инаktivация этого гена путем интеграции в него чужеродной ДНК делает трансформанты, содержащие гибридные молекулы, жизнеспособ-

ными. В качестве генов-киллеров используют *kil*-гены фага *Mu*, ген рестриктазы *EcoRV*, ген синтеза колицина.

Наибольшее распространение для прямого отбора клонов получила другая система на основе известного явления  $\alpha$ -комплементации в гене *Z lac*-оперона. Феномен  $\alpha$ -комплементации заключается в том, что  $\text{NH}_2$ -концевой фрагмент  $\beta$ -галактозидазы размером в 146 аминокислот способен комплементировать определенную мутантную  $\beta$ -галактозидазу бактериальной клетки. Если такой фрагмент вносится в мутантную клетку, то в клетке образуется активная  $\beta$ -галактозидаза и в присутствии индуктора (ИПТГ) и хромогенного субстрата *X gal* колонии приобретают голубую окраску. Можно поместить в ген *lac Z* полилинкер для клонирования чужеродной ДНК, не нарушающий  $\alpha$ -комплементацию. Если в область полилинкера происходит вставка чужеродной ДНК, то  $\alpha$ -комплементация нарушается и клетки, получившие рекомбинантную ДНК, образуют неокрашенные колонии (см. рис. 27).

Большинство векторных плазмид содержит по одному уникальному сайту узнавания для двух (или более) рестриктирующих ферментов. Введением полилинкера в один из уникальных сайтов можно создать дополнительные участки для распознавания различными рестриктазами. Иногда целесообразно расщепить ДНК-вектор двумя рестриктазами таким образом, чтобы образовались два фрагмента, один из которых не несет никакой важной генетической информации. Далее можно разделить два фрагмента, например электрофорезом, в агарозном геле. Так, при расщеплении плазмиды *pBR322* (рис. 22) рестриктазами *Hind III* и *BamHI* образуется два фрагмента: большой (4,0 т.п.о.) и малый (0,3 т.п.о.). Большой фрагмент можно рассматривать как усовершенствованный вектор. Действительно, из-за того, что концы линейного фрагмента не самокомплементарны (разные рестриктазы), фрагмент не может замкнуться сам на себе, что снижает фон нерекомбинантных молекул. Далее, при расщеплении чужеродной ДНК той же парой рестриктаз **фрагменты будут встраиваться только в одной ориентации.**

У плазмид на основе репликона *ColEI* есть и недостатки. Одним из них является снижение числа копий на клетку при увеличении молекулярной массы гибридной плазмиды. Для плазмид этого типа **выход рекомбинантов падает с ростом молекулярной массы вставки. Это обстоятельство делает малоэффективным клонирование в плаزمидах фрагментов ДНК, превышающих 10 т.п.о.** Для клонирования фрагментов большей длины используют фаговые векторы, космиды и фазмиды.

Важным этапом в молекулярном клонировании является процесс введения рекомбинантной ДНК в бактериальные клетки. Плазмиды вводят в клетки посредством трансформации. Выход трансформантов зависит от штамма *E. coli*, размеров ДНК плазмиды, условий проведения эксперимента и колеблется от  $10^5$  до  $5 \cdot 10^8$  на 1 мкг интактной ДНК *pBR322*. **В трансформации участвует приблизительно одна из 1000—10 000 молекул ДНК.** Низкая эффек-

тивность трансформации не является серьезными препятствием при клонировании, особенно при наличии селективных маркеров в векторной плазмиде и в клонируемом фрагменте ДНК, но затрудняет создание клоновок геномов. В последнем случае должны применяться другие системы введения рекомбинантной ДНК в клетку.

**Векторы на основе бактериофага  $\lambda$ .** Бактериофаг  $\lambda$  — это вирус, размножающийся на бактериях *E. coli*. За последние 30 лет он стал излюбленным и наиболее изученным объектом генетиков и молекулярных биологов. Геном фага  $\lambda$  представлен двуцепочечной ДНК размером в 48,5 т.п.о., которая упакована в головку фага в виде линейной молекулы с одонитевыми комплементарными концами длиной в 12 п.о. (липкие концы). После проникновения в клетку липкие концы объединяются и ДНК замыкается в кольцо. Кольцевая ДНК является репликативной формой. Возможность создания векторов на основе фага  $\lambda$  связана с тем его свойством, что гены центральной части (от I до N) несущественны для литического развития. Уже более 20 лет известны способы замещения центральной части фага сегментами бактериальной хромосомы путем определенных генетических манипуляций *in vivo*. Созданные таким образом специализированные трансдуцирующие фаги хорошо изучены. Идея провести манипуляцию замены центральной части ДНК фага  $\lambda$  *in vitro* на чужеродные фрагменты послужила поэтому логическим продолжением опытов *in vivo*.

Первые фаговые векторы были созданы уже в 1974 г. Важным методическим приемом, обеспечивающим широкое применение фаговых векторов, явилось открытие способа упаковки ДНК фага в зрелый капсид *in vitro*. После проведения такой процедуры с рекомбинантной ДНК ее можно вводить в клетку методом инфекции, что намного эффективнее трансформации. При этом методе инфекционной становится каждая десятая молекула ДНК (а не одна из 500—1000, как это в лучшем случае имеет место при трансформации).

Важно то, что в капсид упаковывается ДНК определенного размера не выше 53 и не ниже 38 т. п. о. Таким образом, **фаговые векторы имеют верхний и нижний пределы размеров клонируемых фрагментов ДНК** (рис. 23). Кроме того, так как фаговые векторы сами являются жизнеспособными фагами, они не могут содержать в геноме ДНК короче 38 т.п.о., хотя гены, необходимые для успешного литического развития, занимают 29 т.п.о.

При использовании фага  $\lambda$  в качестве вектора возникают специальные задачи, связанные с удалением из него «лишних» сайтов рестрикции. В настоящее время такие манипуляции хотя и трудоемки, но возможны. Наиболее простые по конструкции фаговые векторы содержат один сайт для крупнощепящей рестриктазы, куда и проводится вставка чужеродного фрагмента ДНК. Такие векторы называют *векторами внедрения*. Максимальная емкость таких векторов 15,2 т.п.о. (рис. 23).

С целью увеличения емкости были сконструированы так назы-

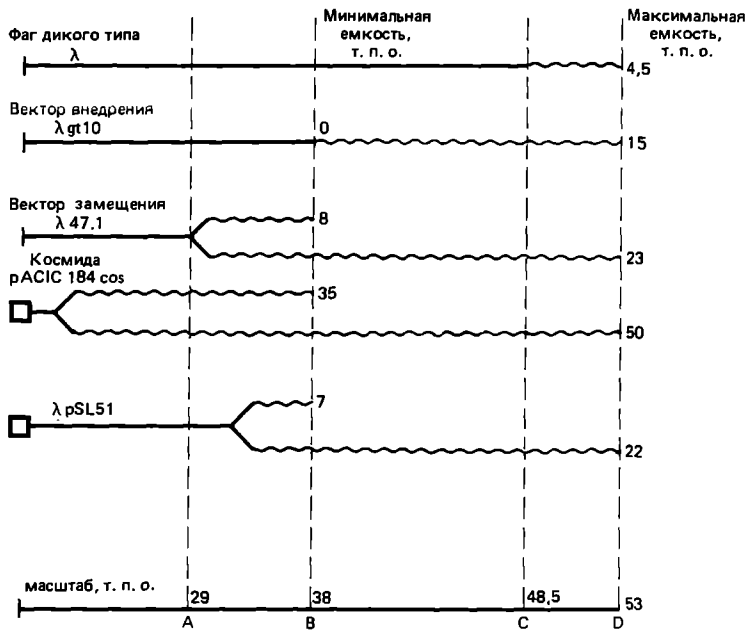


Рис. 23. Соотношение размеров молекул вектора и вставки для векторов, созданных на основе фага  $\lambda$ .

A — 29 т.п.о. — сумма длин генов, существенных для литического развития;  
 B — минимальный размер пакуемой ДНК; C — размер ДНК фага дикого типа (100%); D — максимальный размер пакуемой ДНК, равный 53 т.п.о.

ваемые *векторы замещения*. В таких конструкциях между левым и правым плечами фаговой ДНК находится балластный фрагмент, ограниченный сайтами для крупнощепящих рестриктаз. В процессе конструирования рекомбинантных ДНК балластный фрагмент удаляется и замещается на клонируемый фрагмент. Роль балластного фрагмента — сохранение физической величины ДНК фагового вектора, обеспечивающей ее нормальную упаковку в зрелую фаговую частицу. Емкость таких векторов достигают 23—24 т. п. о. (рис. 23).

Удаление балластного фрагмента — достаточно трудоемкая процедура, требующая фракционирования фрагментов ДНК либо электрофорезом в агарозном геле, либо центрифугированием в градиенте сахарозы. Тем не менее векторы замещения большой емкости обладают тем преимуществом, что очищенные «плечи», даже после объединения, дают слишком короткую ДНК для упаковки в фаговые частицы, т. е. такие «ненужные» молекулы, не содержащие вставки, не упаковываются в головку фага и не образуют негативные колонии. В практической работе, особенно при получении клонотек геномов, желательно создать такие условия, при которых негативные колонии на чувствительном газоне

бактерий образовали бы только рекомбинантные фаги. Для селекции рекомбинантных клонов (или контрселекции клонов, получивших исходный вектор) часто используют то обстоятельство, что фаги  $\lambda$  дикого типа не развиваются в клетках *E. coli*, лизогенных по фагу P2. Такой фенотип фага  $\lambda$  обозначается  $\text{Spi}^+$  (от англ. sensitive to P2 interference — чувствительность к подавлению фагом P2). Однако фаги  $\lambda$ , лишённые двух генов *ged* и *gam*, имеют фенотип  $\text{Spi}^-$  и растут в штаммах, лизогенных по фагу P2. При удалении балластного фрагмента, как правило, удаляются гены *ged* и *gam* и рекомбинантные фаги имеют, следовательно, фенотип  $\text{Spi}^-$  и могут быть отобраны при высевах на газон клеток *E. coli*, лизогенных по фагу P2.

Векторы на основе фага  $\lambda$  особенно удобны для создания клонотек, но мало приспособлены для тонких манипуляций с клонированными фрагментами ДНК. Обычно для детального изучения и преобразования фрагменты ДНК после обнаружения в клонотеке переклонировуют в плазмидные векторы.

**Космиды.** В 1978 г. Дж. Коллинз и В. Хон описали новый тип векторных молекул, получивших название «космиды». *Космиды* — это плазмиды, несущие *cos*-участок (липкие концы) ДНК фага  $\lambda$ . Наличие в составе космид участка *cos* позволяет производить упаковку ДНК в головку фага *in vitro*. Таким образом, космиды могут быть введены в клетку не с помощью трансформации, а путем обычной инфекции. Эффективность последнего процесса превышает эффективность трансформации по меньшей мере в 100 раз.

При упаковке рекомбинантных молекул в частицы бактериофага максимальная длина ДНК может составлять 53 т.п.о., минимальная — 38 т.п.о. В космидных векторах можно клонировать фрагменты чужеродной ДНК размером от 33 до 49 т.п.о. **Космиды — векторы с наибольшей емкостью, и поэтому они специально предназначены для клонирования больших фрагментов эукариотической ДНК и создания клонотек геномов.** Так, клонотека *E. coli* на космидном векторе будет состоять всего из 300—400 клонов. Схема клонирования на космидном векторе изображена на рис. 24. Как видно из рисунка, в фаговые частицы упаковываются кантенантные структуры, в которых чужеродная ДНК соединена с молекулами космиды таким образом, что оба сайта *cos* находятся в одной ориентации и клонируемый материал расположен между этими *cos*-сайтами. В процессе упаковки *in vitro* сайты *cos* расщепляются под действием функции *ter* белка А бактериофага  $\lambda$ , а расположенная между ними ДНК упаковывается в зрелые фаги. После инфекции рекомбинантная ДНК с помощью липких концов фага замыкается в кольцо и поддерживается в клетке как плаزمида за счет области космиды, ответственной за репликацию (*ori*).

**Фазмиды.** Фазмидами называют гибриды между фагами и плазмидами, способные развиваться и как фаг, и как плазмида. Такая двойственная форма существования, в отличие от существова-

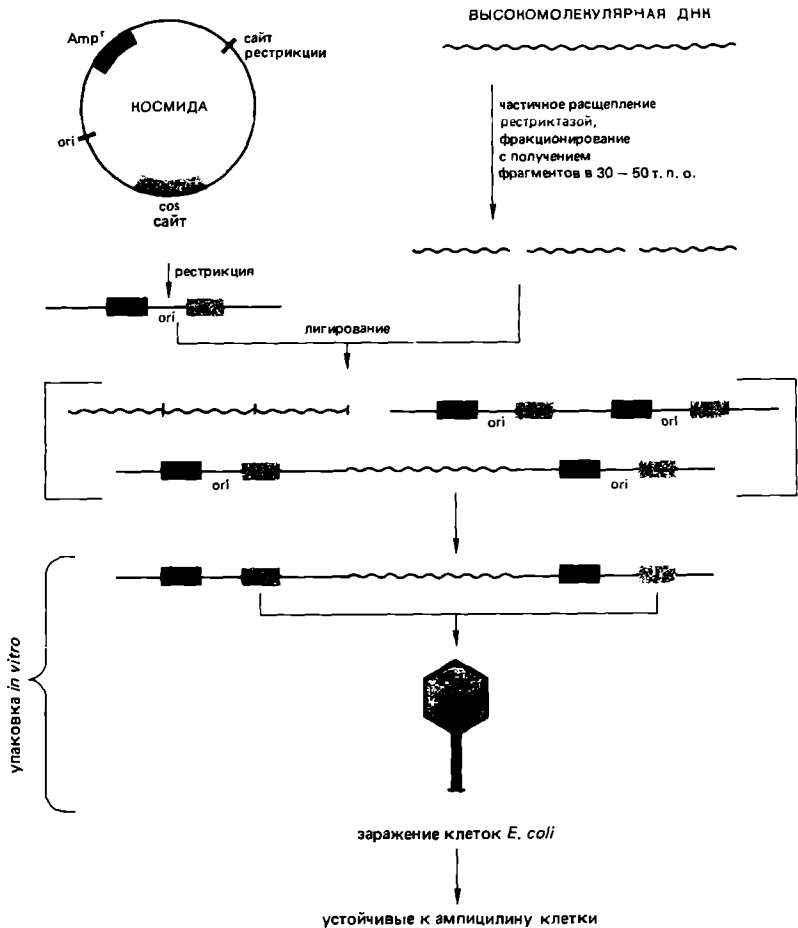


Рис. 24. Клонирование в космидах (по Т. Манниатису и др., 1984)

ния с клеткой-хозяином, не является чисто искусственным изобретением. Известны природные бактериофаги, например фаг P1 *E. coli*, который в виде профага не интегрирует в хромосому, а существует в плазмидной форме. Еще более разнообразны возможности фага P4 *E. coli*, который в зависимости от экспериментальных условий может существовать как литический фаг, интегрированный в хромосому профага или как плазмида.

По клонирующей емкости фазмиды сравнимы с векторами на основе фага  $\lambda$  и значительно уступают космидам (см. рис. 23). Однако возможность смены фаз, т. е. экспериментально регулируемая возможность развития по фаговому или плазмидному пути, дает ряд преимуществ фазмидным векторам. Преимущества эти осознаны и использованы лишь недавно, хотя гибриды между

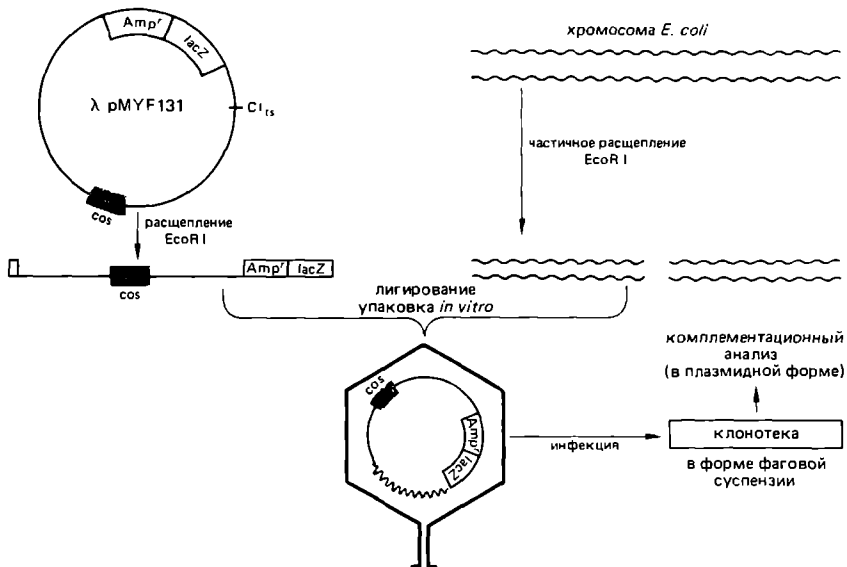


Рис. 25. Фазмидный вектор  $\lambda$ р MYF 131  
 Емкость вектора 4,4 — 19,6 т.п.о. (по Н. К. Янковскому, 1985)

фагом  $\lambda$  и плазмидами получены уже более 10 лет назад (Л. П. Тихомирова и др., 1975). На рис. 25 приведены фазмидный вектор и способы его использования. Фазмида содержит в своем составе все гены, необходимые для литического развития фага, и гены, необходимые для репликации и селекции плазмиды. Следует напомнить, что фаговые векторы могут паковаться в капсид, а космиды способны паковаться в виде мультимеров. ДНК фазмиды слишком коротка для упаковки в капсид фага в мономерной форме и слишком велика для упаковки в форме димера. Последнее обстоятельство очень важно для фазмидных векторов, поскольку негативные колонии могут образовать только рекомбинантные молекулы, так как только они соответствуют размерам пакуемой ДНК.

Итак, сам вектор способен существовать в виде плазмиды, а клонотека получается и хранится в виде суспензии гибридных фагов.

Главное преимущество фазмид — относительная простота комплементационного анализа. Действительно, как уже отмечалось, первичное клонирование больших фрагментов ДНК удобно проводить на фаговых векторах, а комплементационный анализ, реорганизацию фрагментов — с использованием плазмидных векторов. Фазмиды дают уникальную возможность отказаться от переклонирования генов из фаговых в плазмидные векторы, а вместо этого применять для комплементационного анализа первич-

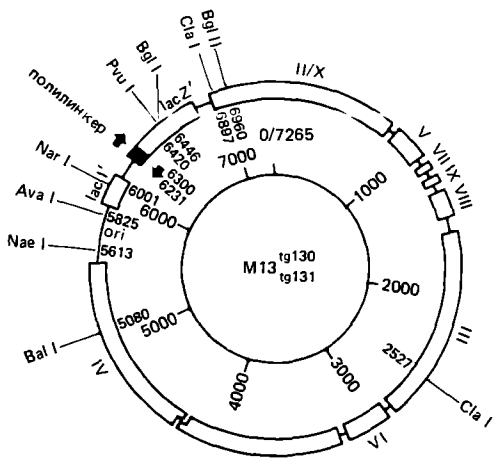


Рис. 26. Векторы на основе фага M13  
 Арабскими цифрами указана нумерация нуклеотидов; римскими — гены фага; *lac I* — С-концевой участок гена, кодирующий *lac*-репрессор; *lacZ'* — N-концевой участок гена, кодирующего  $\beta$ -галактозидазу, которая становится активной в тесте на  $\alpha$ -комplementation (полилинкер может быть вставлен в вектор в двух противоположных ориентациях, указанных стрелками, по *EcoRI*-сайтам, которые соответствуют нуклеотидам 6231 и 6300 (по M. Kieny et al., 1983)

синтезируется лишь одна нить ДНК, которая входит в состав зрелого фага. Фаг M13 не убивает клетку, но лишь замедляет ее деление. Частицы зрелого фага непрерывно выделяются в среду, и их титр в культуральной жидкости может достигать  $10^{12}$  в 1 мл.

Основное преимущество фага M13 как вектора заключается в том, что выделяемые клеткой частицы бактериофага содержат одноцепочечную ДНК, гомологичную одной из двух комплементарных цепей клонируемой ДНК. Такая ДНК непосредственно может быть использована для определения последовательности оснований ДНК (секвенирование) по методу Сэнгера (дидеоксиметод).

На рис. 26 приведен один из векторов на основе фага M13. Следует отметить, что для репликации этого фага используется весь его геном, за исключением небольшой области (507 п.о.), названной межгенной последовательностью. Именно только в эту область можно встроить чужеродную ДНК. Обычно вставляют полилинкер (рис. 27), что делает вектор более универсальным, так как появляется возможность применять для клонирования разные рестриктазы. В приведенном на рисунке векторе и во многих других в межгенной области находится N-концевой участок гена  $\beta$ -галактозидазы со встроенным в него полилинкером.

ную клонотеку; при этом гибридные молекулы ДНК в исследуемых клетках существуют в плазмидной форме.

**Векторы на основе бактериофагов, содержащих одноцепочечную ДНК.** Лучшие векторы такого типа разработаны на основе фага M13. В зрелую фаговую частицу входит одноцепочечная ДНК длиной 6500 нуклеотидов. После проникновения в клетку одноцепочечная ДНК фага превращается в двухцепочечную репликативную форму (РФ), которую выделяют из клеток и используют как вектор для клонирования. В инфицированной клетке накапливается 100—200 копий РФ ДНК. После этого синтез становится асимметричным и



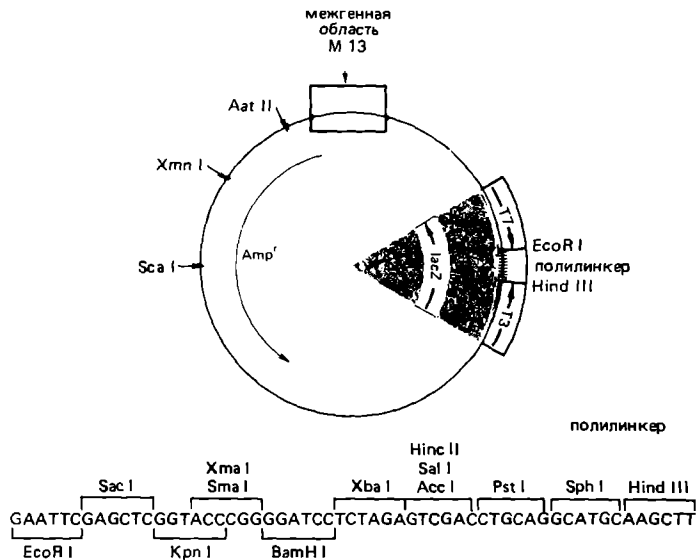


Рис. 27 Универсальный вектор для клонирования Bluescribe M13  
Внизу представлена последовательность оснований в полилинкере

Отбор рекомбинантных фагов основан на нарушении  $\alpha$ -комплементации при встраивании в полилинкер дополнительного фрагмента ДНК. При инфекции клеток вектором образуются голубые колонии, рекомбинанты бесцветны.

После знакомства с различным типом векторов приведем пример современного универсального вектора для клонирования чужеродной ДНК (рис. 27). Он содержит сильные промоторы фагов T3 и T7. Эти промоторы были синтетизированы химически с наименьшей гомологией между ними для предотвращения образования шпилечных структур. Вставка любого фрагмента ДНК в полилинкер эффективно транскрибируется под контролем промотора фага T7 или T3 (в зависимости от ориентации клонированного фрагмента).

В описываемом векторе промоторы фагов T3 и T7 встроены в рамку считывания гена *lacZ*, кодирующего  $\beta$ -галактозидазу. Наличие вставки в полилинкер распознается визуально по нарушению  $\alpha$ -комплементации. Фрагменты ДНК, встроенные в рамку считывания гена *lacZ*, могут быть экспрессированы, и белки, ими кодируемые, определены иммунологически.

В этот вектор также вставлен межгенный район однонитевого фага M13. При лизисе клеток, содержащих такую гибридную плазмиду (фазмиду), и суперинфицированных специальным фагом-помощником M13, образуются гибридные однонитевые ДНК в высоком титре (и в том числе клонированный ген), которые могут быть использованы для определения последовательности оснований. Преимущество такой конструкции перед фагом

M13, применяемым в качестве вектора, заключается в ее небольшом размере, позволяющем встраивание больших фрагментов ДНК без нарушения стабильности. Однонитевые ДНК являются к тому же идеальной мишенью для сайт-специфического мутагенеза (см. «Локализованный и сайт-специфический мутагенез»).

Таким образом, с помощью данной конструкции можно проводить клонирование, секвенирование и экспрессию генов под контролем сильных промоторов, а также прямой отбор рекомбинантов и сайт-специфический мутагенез.

#### **§ 4. Методы идентификации клонов, содержащих рекомбинантные молекулы**

В большинстве экспериментов по молекулярному клонированию используется сложная смесь фрагментов ДНК. Существуют специальные приемы, позволяющие отобрать клоны, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК. Например, при использовании фазмид дают урожай исключительно фаговые корпускулы, в головки которых пакуются рекомбинантные молекулы. При применении плазмид отбирают клоны с рекомбинантными ДНК по инаktivации одного из маркеров плазмиды и т. д. Гораздо сложнее найти среди рекомбинантов клон, несущий нужный исследователю ген.

В том случае, когда ожидается с высокой вероятностью экспрессия клонированного гена, методы скрининга рекомбинантных клонов основываются либо на изменении фенотипа клетки под влиянием вновь синтезированного белка, либо просто на свойствах самого белка. Например, если необходимо изолировать гены *E. coli*, ответственные за биосинтез какой-либо аминокислоты, то отбирают рекомбинантные клоны, трансформируя гибридные плазмиды в ауксотрофные по биосинтезу аминокислот мутанты и получая прототрофные клоны. Это и есть тест на комплементацию. Прием очень удобный, но он используется обычно при «самоклонировании», т. е. при переносе генов на многокопийных плазидах в тот же микроорганизм, и требует наличия штаммов с хорошо охарактеризованными мутациями искомого гена.

Если исследователь может получить продукт гена, т. е. белок, то возможен отбор нужного клона иммунологическим методом. Наиболее эффективен метод *прямой радиоиммунологической детекции колоний*. Для этого колонии клеток, несущие рекомбинантные молекулы, лизируют на поверхности агара, а затем отпечатывают на поливиниловую пластинку, на которой адсорбированы антитела. После отмывки диски обрабатывают мечеными <sup>125</sup>I антителами к белку искомого гена. Таким образом, образуется комплекс антигена с двумя молекулами антитела, одна из которых мечена иодом, а вторая присоединена к пластинке. Образование комплекса тестируется радиоавтографически. Метод очень чувствителен и дает положительный ответ при наличии в клетке всего одной или нескольких молекул искомого белка.

В случае отсутствия экспрессии клоны могут быть идентифицированы по первичной структуре ДНК или по характеру белка, синтезированного в подходящей системе (ооциты лягушки, бесклеточные экстракты). Тестирование первичной структуры ДНК осуществляется гибридизацией с меченой очищенной мРНК. Трудности метода связаны прежде всего со сложностью получения гомогенных препаратов мРНК. Кроме того, клоны, дающие позитивный ответ при гибридизации, не обязательно содержат нужный ген или его часть.

Важной модификацией метода является так называемая *гибридизационная селекция*. При этом способе денатурируют клонированную ДНК, иммобилизуют ее на твердой матрице и гибридизуют с препаратом мРНК. Дуплекс ДНК — РНК нагревают для освобождения мРНК, которую затем добавляют в бесклеточные белоксинтезирующие системы или вводят в ооциты лягушки для трансляции. Продукты трансляции идентифицируют или по биологической активности, или иммуноприцепитацией. Последний метод чрезвычайно трудоемок, но позволяет обнаружить в библиотеке клоны, содержащие кДНК, мРНК которых представлена в количестве 0,03—0,01 % от суммарной клеточной мРНК.

Если известна первичная структура гена или кодируемого им белка, или хотя бы их фрагментов, то для скрининга клонов можно использовать синтетические олигонуклеотиды — зонды. Экспериментально установлено, что зонды не должны быть короче 14—15 п. о. Лучше брать два зонда одновременно к разным участкам одного и того же гена. В силу вырожденности кода, если известна только аминокислотная последовательность, приходится синтезировать набор олигонуклеотидов, из которых один будет полностью комплементарен к искомому гену.

## § 5. Экспрессия чужеродных генов в микроорганизмах

Механизмы экспрессии генов у прокариот сегодня достаточно хорошо изучены и понятны благодаря многолетним фундаментальным молекулярно-биологическим исследованиям бактерий *E. coli* и некоторых ее фагов.

Первым этапом экспрессии является процесс транскрипции, при котором фермент РНК-полимераза распознает на ДНК специфические последовательности, называемые *промоторами* (см. гл. 1). Присоединившись к ДНК в области промотора, РНК-полимераза расплетает двойную спираль ДНК и в присутствии субстратов НТФ начинает синтезировать нить мРНК, комплементарную одной из нитей ДНК. Копируемая нить называется «значащей» нитью. Как уже отмечалось, промоторы работают с разной эффективностью, т. е. при одинаковых условиях с одних промоторов (сильных) синтез РНК начинается часто, с других (слабых) инициация начинается редко. В настоящее время расшифрованы нуклеотидные последовательности более 100 промоторов из *E. coli* и ее фагов и многие десятки — из других бактерий.

Считается, что нуклеотидные последовательности в консервативных областях (районы «—10» и «—35», см рис. 1) и расстояние между ними определяют силу промотора. Следует отметить, что даже в консервативных областях, например в области «—10» (Прибнов-бокс), которая имеет усредненную последовательность для *E. coli* — TATAAT, или в области «—35» (усредненная последовательность TTGACA), у разных промоторов наблюдаются отличия по 1—3 нуклеотидам. Последовательности между консервативными областями кажутся весьма случайными, хотя не исключено, что они могут влиять на вторичную структуру мРНК и таким образом изменять эффективность трансляции. Промоторы разных бактерий довольно близки по строению, что подтверждается не только структурой, но и их способностью инициировать транскрипцию при переносе в другой вид бактерий. Правда, эффективность работы промотора может быть изменена (как правило, снижена) в десятки раз при таком переносе. Так как эффективность определяется строением и специфичностью РНК-полимеразы клетки хозяина, то наблюдается нераспространенность при перекрестном переносе генов. Так, почти все гены бацилл, перенесенные в клетки *E. coli* вместе со своими промоторами, экспрессируются в этом организме, хотя почти все гены *E. coli*, перенесенные в *Bac. subtilis*, не экспрессируются. Это может означать более широкую специфичность РНК-полимеразы *E. coli* по сравнению с РНК-полимеразой *Bac. subtilis*. Последнее предположение находит подтверждение при исследованиях *in vitro* с очищенными РНК-полимеразами и фрагментами ДНК из *Bac. subtilis* и *E. coli*. Сигналы инициации транскрипции высших эукариот не распознаются РНК-полимеразами бактерий. Следовательно, первым условием экспрессии чужеродного гена в микроорганизмах должно быть наличие перед этим геном сильного промотора, распознаваемого РНК-полимеразой клетки-хозяина.

Следует отметить, что высокий уровень транскрипции может привести к нестабильности плазмидной репликации, если за активно транскрибируемым геном не расположены сайты эффективной терминации транскрипции. Для практических целей удобно использовать *регулируемую экспрессию*, так как не только сверхсинтез РНК, но и особенно сверхсинтез многих белков может оказаться губительным для клетки. При таком подходе в процессе периодической ферментации в первой ее фазе, когда происходит рост клеток и накопление биомассы, экспрессия клонированных чужеродных генов не происходит. Затем на втором этапе внешний индуктор (химическое вещество, температура) запускает сверхсинтез нужного белка.

В генной инженерии часто используют сильные промоторы *E. coli* [лактозного оперона — lac UV5, триптофанового — trp, гибридный промотор tac (trp—lac)], промоторы фага  $\lambda$ —P<sub>R</sub> и P<sub>L</sub>, некоторые сильные промоторы фагов T5, T7,  $\phi$ X174 и т. д.

Следует отметить, что сильная и регулируемая транскрипция — необходимое, но далеко не достаточное условие высокой продук-

тивности клетки. Вторым условием является наличие перед геном чужеродного белка оптимального сайта инициации трансляции мРНК. У бактерий этот сайт включает последовательность из 3—9 нуклеотидов, называемую последовательностью Шайн-Делгарно (SD), комплементарную 3'-концу рибосомной 16S РНК; иницирующий кодон AUG\* и от 3 до 11 нуклеотидов между SD и AUG. Считается, что «хороший» сайт инициации трансляции имеет выраженную комплементарность к 3'-концу 16S РНК оптимальное расстояние между последовательностью SD и AUG-кодоном и при этом 5'-конец мРНК должен обладать определенной вторичной структурой. Если в одной и той же конструкции методом сайт-специфического мутагенеза подставлять по очереди все три кодона инициации, то конструкция, в которой в качестве иницирующего кодона служит AUG, оказывается наиболее эффективной, UUG — наименее, а GUG — промежуточной. Такая работа была проделана в 1985 г. группой американских ученых на примере гена аденилатциклазы *E. coli*.

На сегодня существуют три способа конструирования, обеспечивающие трансляцию чужеродной генетической информации в клетках бактерий. Первый способ — внедрение чужеродного структурного гена, лишенного собственных регуляторных областей, внутрь хорошо экспрессируемого бактериального гена. Точка внедрения должна быть достаточно удалена от места инициации трансляции, чтобы новая нуклеотидная последовательность не мешала эффективной инициации транскрипции и трансляции бактериального гена. При такой конструкции можно ожидать, что уровень экспрессии «гибридного белка» будет близок уровню экспрессии исходного гена. Недостаток метода — трудность последующего расщепления гибридного белка и выделения конечного продукта (рис. 28, а).

Второй путь — создание «гибридного сайта» связывания с рибосомами. В этом случае проводят расщепление в молекуле бактериальной ДНК между последовательностью SD и кодоном инициации. Чужеродный структурный ген несет собственный кодон инициации и несколько нуклеотидов перед ним. Объединение *in vitro* таких конструкций дает «гибридный сайт» связывания с рибосомами (рис. 28, б). Преимущество метода состоит в том, что в клетке синтезируется нормальный полноразмерный чужеродный белок. Недостаток связан с тем, что нельзя создать унифицированный, подходящий для всех белков гибридный сайт инициации трансляции. Это обстоятельство сопряжено с необходимостью оптимизации вторичной структуры мРНК. На практике в каждом случае варьируют расстояние от SD до AUG и меняют нуклеотиды между ними.

Третий путь, который лишен недостатков первых двух и объединяет их достоинства, разработан недавно в нашей стране и

\* Существует три кодона инициации трансляции: AUG, GUG и UUG. Как правило, у *E. coli*, бактерий, эукариот используется AUG. Тем не менее у *E. coli* известны 9 примеров использования GUG и 3—UUG.

6

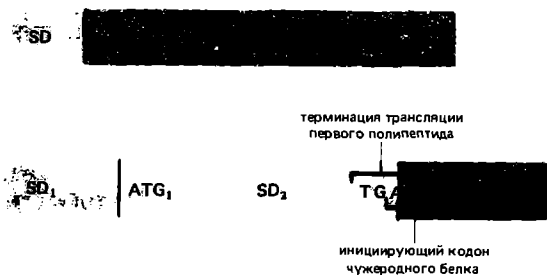


Рис. 28. Три способа обеспечения эффективной трансляции чужеродной генетической информации

Розовым цветом обозначен бактериальный ген; серым — чужеродный

носит название метода *гибридного оперона* (С. В. Машко и др., 1985). В конструкции используется принцип «перекрывания» генов (overlapping), который обнаружен у бактерий и фагов. В этих случаях терминирующий кодон проксимального к промотору гена является одновременно частью иницирующего кодона дистального гена оперона. При этом SD-последовательность второго гена расположена непосредственно в кодирующей области первого. Такая ситуация наблюдается в триптофановом опероне *E. coli* между генами *trpE* и *trpD*. Если вместо дистального гена в этой конструкции поместить чужеродный ген, то следует ожидать, что его трансляция будет не хуже, чем у проксимального гена. Есть данные о том, что рибосомы (или по крайней мере 30S-субъединицы) не отсоединяются от РНК в этой ситуации и инициация трансляции второго гена начинается с эффективностью, близкой к 100 %. Кроме того, возможна дополнительная инициация с собственной последовательности SD (рис. 28, в). В данной конструкции нивелируется отрицательное влияние неблагоприятной вторичной структуры РНК, так как рибосомы, транслирующие первый белок, способны «расплавить» возможные шпилечные структуры.

Получение штамма-сверхпродуцента чужеродного белка обычно не заканчивается конструированием плазмид, в которых чужеродный ген снабжен эффективными сайтами инициации транскрипции и трансляции. Для получения высокого выхода белка важно обеспечить стабильность мРНК и подавить пролеиз белков.

Стабильность мРНК в клетках *E. coli* повышается при введении мутаций, инактивирующих клеточные РНКазы. Гены *gpa*, *gpb* и *gpc*, кодирующие РНКазы I, II и III *E. coli* картируются

соответственно на 14, 28 и 55-й минутах генетической карты. Недавно открыт новый ген — *ams* (alteration of mRNA stability), который картируется на 23-й минуте генетической карты и сильно влияет на стабильность мРНК (Chauda et al., 1985). В клетках температурно-чувствительного мутанта по гену *ams* время полужизни мРНК при 42°C увеличивается от 0,5—2 до 10—12 мин. Природа белка, кодируемого этим геном, не известна.

Не ясно, каким образом, но полинуклеотидфосфорилаза (*rpr*) также сильно влияет на стабильность мРНК. Очень интересен тот факт, что в отличие от мутаций по генам *gpa* и *ams* мутации в гене *rpr* изменяют стабильность мРНК чужеродных белков, не влияя на стабильность мРНК *E. coli*. Например, при экспрессии гена *HIS3* (D-эритроимидазолглицерофосфатгидролаза) *Sacchar. cerevisiae* в клетках *E. coli*, несущих мутацию *rpr7*, время полужизни соответствующей мРНК увеличивается с 1,5 до 18,7 мин, а выход белка — в 4,5 раза.

Как уже отмечалось в гл. 1, серьезным препятствием при получении штаммов-сверхпродуцентов может явиться протеолиз чужеродных белков в клетке. Так, есть данные о том, что время полужизни человеческого проинсулина в клетках *E. coli* составляет всего 2 мин (K. Talmadge, W. Gilbert, 1982). Для стабилизации чужеродных белков и пептидов можно получить мутации типа *lop* или *hptR* и (или) клонировать в реципиентный штамм гены, контролирующие синтез ингибиторов протеиназ (например, ген *pin* фага T4).

## § 6. Локализованный и сайт-специфический мутагенез

Многие успехи современной молекулярной биологии и селекции микроорганизмов основаны на применении индуцированного мутагенеза *in vivo* (см. гл. 2). Типичная схема опыта по получению мутантов бактерий и фагов заключается в обработке клеток мутагеном и скрининге среди потомков клеток с измененным фенотипом. Далее следует огромная работа, связанная с картированием мутаций, доказательством отсутствия других мутаций, влияющих на фенотип. Хотя метод этот чрезвычайно трудоемок, он обладает тем преимуществом, что не нуждается в предварительных гипотезах и знаниях относительно роли того или иного белка в проявлении данного фенотипа. Метод мутагенеза и ступенчатого отбора позволяет вести селекцию продуктивных штаммов микроорганизмов, недостаточно генетически изученных, и получать продуценты метаболитов, для которых не установлен путь биосинтеза. Велико значение индуцированного мутагенеза как поставщика новой информации для исследователей, занимающихся молекулярной биологией и биохимией. Расшифровка на молекулярном уровне новых мутантных фенотипов открывает возможности выяснения путей биосинтеза и регуляции метаболизма нормальной клетки.

Однако при индуцированном мутагенезе *in vivo* воздействию мутагена подвергается весь геном, в силу чего этот метод имеет ряд недостатков. Главный из них — образование множественных мутаций, что приводит к большим трудностям при интерпретации результатов. Постоянной мечтой генетиков был локализованный мутагенез, при котором действию мутагена подвергается только определенная часть генома. Частично эта проблема решается с использованием транспозонов, а также трансдуцирующих фагов и F'(R')-эписом, содержащих определенные участки бактериального генома. Однако не у всех бактерий гены можно переводить на трансдуцирующие фаги и эписомы и использовать транспозонный мутагенез. Эти методы не применимы к микроорганизмам, для которых трансдукция и конъюгация не известны.

С появлением методологии геной инженерии метод *локализованного мутагенеза* становится доступным для широкого круга микроорганизмов. В наиболее простом варианте клонированный фрагмент ДНК, ограниченный удобными сайтами рестрикции, может быть выделен и подвергнут мутагенезу *in vitro*. Вследствие проведения реакции *in vitro* дозы мутагена могут быть достаточно высокими, что сильно повышает частоту мутагенеза. Такой подход использован при создании штамма-продуцента гомосерина (см. гл. 4). Для получения стабильных не reverтирующих мутаций в определенном гене можно применить метод инсерционного локализованного мутагенеза. С этой целью инактивируемый ген клонируют на плазмиде и встраивают в него детерминант устойчивости к антибиотику (рис. 29). Затем компетентные клетки трансформируют сконструированной гибридной плазмидой (или полученной при ее расщеплении линейной молекулой ДНК), содержащей указанный детерминант, фланкированный последовательностями, гомологичными хромосомному гену. В результате двойного кроссинговера происходит интеграция гена лекарственной устойчивости в гомологичный район хромосомы. Искомые трансформанты отбирают на селективных

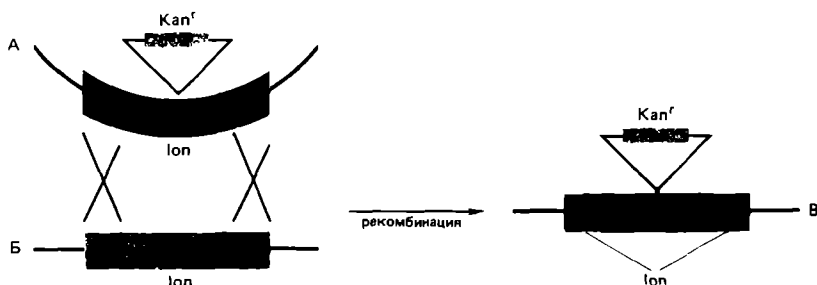


Рис. 29. Инсерционный локализованный мутагенез:

1 — рекомбинантная плазмида, несущая ген *lon* со вставкой детерминанта устойчивости к канамидину; 2 — хромосома, несущая ген *lon* дикого типа; 3 — хромосома, несущая инактивированный ген *lon*



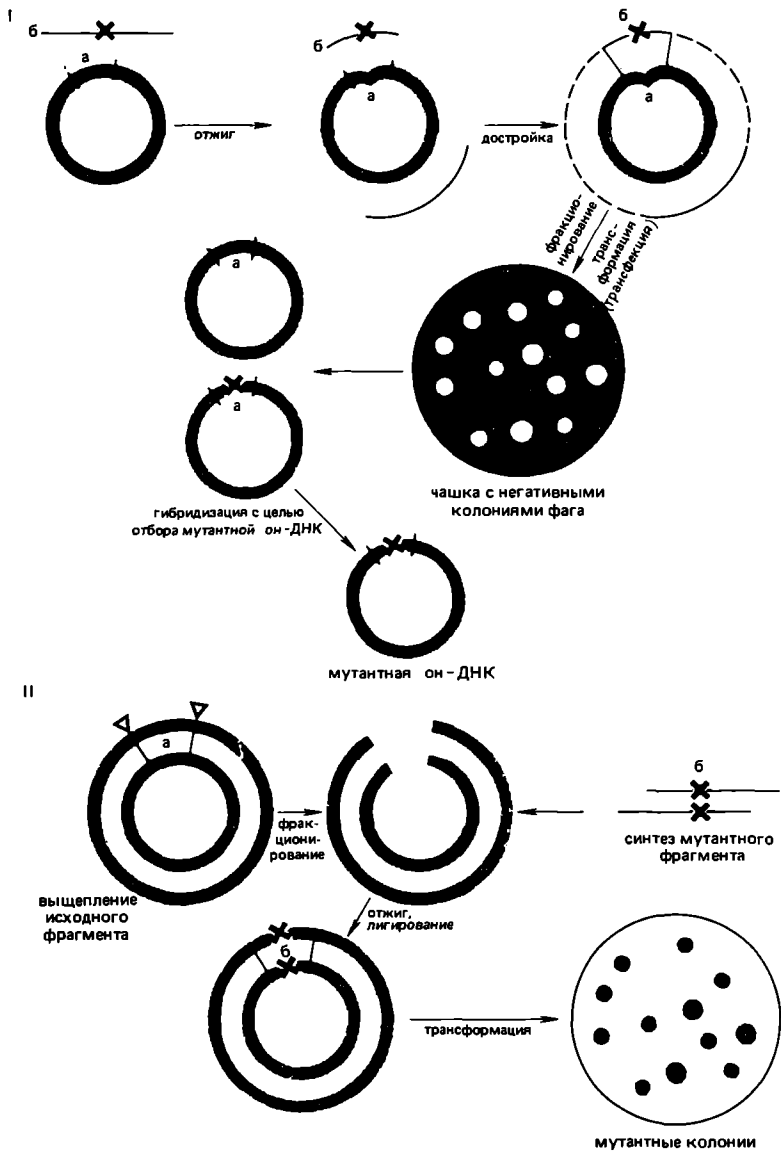


Рис. 30. Схема сайт-специфического мутагенеза:

*a* — фрагмент ДНК, в котором получают мутацию; *b* — олигонуклеотид с частично комплементарной последовательностью оснований

средах с соответствующими антибиотиками. В опытах с *E. coli* трансформацию проводят линейными молекулами ДНК и в качестве реципиентов берут штаммы RecBC, SbcB. Инактивированный ген с помощью трансдукции может быть затем перенесен в другие штаммы.

В последние годы разработана техника *сайт-специфического мутагенеза*, позволяющего вводить мутации в точно определенный участок гена. Другое название этого метода — *олигонуклеотиднаправленный мутагенез*. Суть метода сводится к следующему. Фрагмент ДНК, в котором желают получить мутацию, переводится в одностороннюю форму, например, на векторе фага M13. Синтезируется олигонуклеотид размером 14—21 п. о. комплементарный области, в которую должна быть введена мутация. В центре олигонуклеотида располагают нуклеотид, не комплементарный исходной последовательности ДНК. Производят отжиг олигонуклеотида с кольцевой односторонней ДНК. Затем с помощью ДНК-полимеразы и лигазы достраивают вторую цепь и замыкают кольцо (рис. 30, I). Чтобы облегчить получение кольцевых двуспиральных замкнутых форм ДНК, часто используют второй олигонуклеотид, что сокращает путь ДНК-полимеразы. Кольцевые замкнутые формы ДНК затем очищаются и ими трансформируются бактериальные клетки. После трансформации такой кольцевой ДНК и раунда репликации в потомстве должны находиться формы, несущие родительскую и мутантную ДНК, в соотношении 1 : 1. Далее, отдельные колонии бактерий или негативные колонии фага используют для скрининга мутантных форм.

Очень важной модификацией метода является *гибридизационный скрининг с радиоактивно меченным олигонуклеотидом*, который применяется для мутагенеза. В данном случае этот олигонуклеотид служит зондом. Показано, что прочность гибридов сильно различается из-за того, что при гибридизации олигонуклеотид-зонд полностью комплементарен мутантной форме ДНК, а дикой форме ДНК одна пара оснований не комплементарна. На практике переносят отпечатки негативных колоний с чашки Петри на нитроцеллюлозный фильтр, проводят гибридизацию с олигонуклеотидным зондом при условиях, когда гибридизуются обе формы ДНК. Затем фильтр последовательно промывают при все более высокой температуре. Можно, таким образом, подобрать условия, при которых на радиоавтографе фильтра зоны почернения будут отвечать только мутантным формам ДНК. Этот метод особенно ценен тем, что позволяет **изолировать мутации без их фенотипического проявления**.

По мере разработки методов олигонуклеотидного синтеза, по-видимому получит развитие другая стратегия, основанная на синтезе двуспиральных фрагментов, содержащих измененную пару оснований (рис. 30, II). Из-за необходимости синтеза двуспиральных олигонуклеотидов метод становится более трудоемким; кроме того, возможны осложнения, связанные со встав-

кой фрагмента, в случае отсутствия удобных сайтов для рестриктаз. Преимуществом метода является 100 %-ная эффективность мутагенеза.

Развитие методов сайт-специфического мутагенеза открывает новые возможности исследования функций регуляторных элементов у микроорганизмов, позволяет «увеличить» силу промоторов, оптимизировать сайты связывания с рибосомами и т. д. Одно из основных применений данной методологии — это *белковая инженерия*, т. е. реконструкция белковых молекул. Примеры практически значимого конструирования белков пока немногочисленны, но это направление интенсивно развивается во многих лабораториях мира. Так, в 1984 г. группа английских исследователей (Фершт и др.) изменила активный центр фермента тирозил-ТРНК-синтетазы путем замены треонина на пролин, что привело к увеличению каталитической активности фермента в 25 раз. Другой пример связан с микробиологическим синтезом фибробластного интерферона человека ( $\beta$ -интерферона). Клонирование соответствующего гена в *E. coli* приводит к синтезу белкового продукта с низкой удельной активностью, около  $3 \cdot 10^7$  ед/мг. Природный  $\beta$ -интерферон имеет удельную активность, равную  $(2 \div 5) \cdot 10^8$  ед/мг. В белковом продукте, полученном в *E. coli*, обнаруживается значительное количество олигомерных форм, что, возможно, связано с образованием межмолекулярных S — S-связей и неправильным замыканием таких связей внутри молекулы. Молекула  $\beta$ -интерферона имеет три цистеиновых остатка в положениях 17, 31 и 141. Исследователи из американской генно-инженерной фирмы «Cetus» в 1984., используя метод сайт-специфического мутагенеза, заменили остаток цистеина в положении 17 на серин. После такой замены удельная активность  $\beta$ -интерферона возросла и составила  $2 \cdot 10^8$  ед/л, т. е. приблизилась к активности природного белка, при этом практически отсутствовали олигомерные формы. В настоящее время препарат проходит клинические испытания.

В области инженерии белков усилия направлены на изменение термостабильности ферментов, что весьма важно для их практического использования. Так получен термолабильный химозин (ренин), употребляемый в сыроварении. После завершения коагуляции молока с помощью химозина требуется его быстрая инактивация, чему и способствует полученная модификация белка. Ведутся работы по созданию термостабильной  $\alpha$ -амилазы (для осахаривания крахмала) и протеазы, используемой в стиральных порошках. Инженерия белков находится на начальном этапе своего становления. В будущем можно ожидать создания ферментов с измененной специфичностью.

## **§ 7. Генная инженерия промышленно важных микроорганизмов**

Многие микроорганизмы обладают чрезвычайно ценным комплексом свойств, который определяется большой группой ге-

нов, что делает трудным или невозможным перенос этого комплекса в другой организм. К такого рода важным организмам относятся: актиномицеты — продуценты большей части известных на сегодня антибиотиков; бациллы, используемые в производстве ферментов, витаминов, антибиотиков, средств борьбы с насекомыми; дрожжи, широко применяемые в виноделии, хлебопечении, пивоварении, в производстве микробиологического белка для кормления сельскохозяйственных животных; псевдомонады, с которыми связываются надежды на разработку эффективных биологических мер охраны окружающей среды. Возможность применения к этим видам микроорганизмов методов генной инженерии во многом определит успех селекционных работ в ближайшем будущем. Рассмотрим «готовность» переносимых групп микроорганизмов к генно-инженерным преобразованиям. При этом следует помнить, что в настоящее время генные инженеры предпочитают иметь дело с наиболее генетически и физиологически изученными видами. Так, для дрожжей — это *Sacchar cerevisiae*, для бацилл — *Bac. subtilis*, для псевдомонад — *Ps. putida* и *Ps. aeruginosa*, для актиномицетов — *Streptomyces lividans* и *Streptomyces coelicolor*. Переход к любому другому виду данного рода часто требует длительных и трудных дополнительных исследований.

**Бактерии рода *Pseudomonas*** широко распространены в природе и в силу своих биохимических возможностей могут найти применение в разнообразных биотехнологических процессах. Они характеризуются большим разнообразием катаболических путей. Например, вид *Ps. cepacia* утилизирует более чем 100 различных субстратов (из 146 проверенных веществ). Род *Pseudomonas* объединяет около 30 видов, среди которых наряду с почвенными непатогенными бактериями встречаются фитопатогены и патогенные для человека и животных виды. Наличие у них плазмид, несущих гены биodeградации различных органических соединений, включая и не встречающиеся в природе (инсектициды, гербициды), делает перспективным использование бактерий этого рода для разработки технологий, направленных на охрану окружающей среды. Способность некоторых видов *Pseudomonas* употреблять в качестве единственного источника углерода для роста такие субстраты, как углеводороды, метиловый и этиловый спирты, открывает широкие возможности использования данного вида бактерий для производства белка, который может применяться как ценная добавка к кормам сельскохозяйственных животных.

В настоящее время наиболее изучены два представителя этого рода: *Ps. aeruginosa* (штамм PAO) и *Ps. putida*. Для генетического анализа псевдомонад используются конъюгативные плазмиды, способные мобилизовать перенос хромосомных генов, и неконъюгативные плазмиды. Разработаны методы индукции инсерционных или делеционных мутаций при внедрении транспозонов и других мигрирующих элементов. Система клонирования

основана на применении векторов широкого круга хозяев (преимущественно с репликасами IncP4 и IncP1) (M. Bagdasarian, K. Timmis, 1982).

Группа IncP4 объединяет плазмиды RSF1010, R1162, R300B и некоторые другие. Эти плазмиды обеспечивают устойчивость клеток к сульфонамидам (Su) и стрептомицину (Sm), близки по размерам (8,3—8,9 т. п. о.), могут мобилизоваться и стабильно поддерживаться практически во всех грамотрицательных бактериях. Плазмиды IncP4 присутствуют в *E. coli* в количестве 15—20 копий, в *Rs. putida* копияемость RSF1010 достигает 160 копий на клетку и составляет 22% клеточной ДНК. В качестве векторов для клонирования природные плазмиды IncP4 имеют ряд существенных недостатков: практически отсутствуют удобные сайты для рестриктаз; гены, кодирующие устойчивость к Su и Sm, организованы в единый оперон, поэтому при инактивации одного маркера второй часто также становится неселектируемым. На основе плазмид IncP4 сконструировано более 40 векторов, содержащих различные независимо транскрибируемые гены лекарственной устойчивости, удобные для клонирования сайты рестрикции. Наряду с векторами для инсерционной инактивации маркеров сконструированы специализированные векторы (для отбора промоторов, космиды, вектор для прямой селекции рекомбинантных молекул). Один из векторов для инсерционной инактивации маркеров pAYC39 представлен на рис. 31. Векторы на основе плазмид IncP4 обладают значительной репликативной емкостью.

Так, вставка чужеродной ДНК размером в 10 т. п. о. не меняет числа копий плазмиды. Космидные производные RSF1010 позволяют клонировать фрагменты ДНК размером 25—30 т. п. о.

Введение рекомбинантных плазмид в бактерии рода *Pseudomonas* возможно методом кальциевой трансформации, хотя эффективность этого процесса несколько ниже, чем у *E. coli*. Некоторые виды, такие, как *Ps. putida*, *Ps. alcaligenes* и др., способны к естественной трансформации.

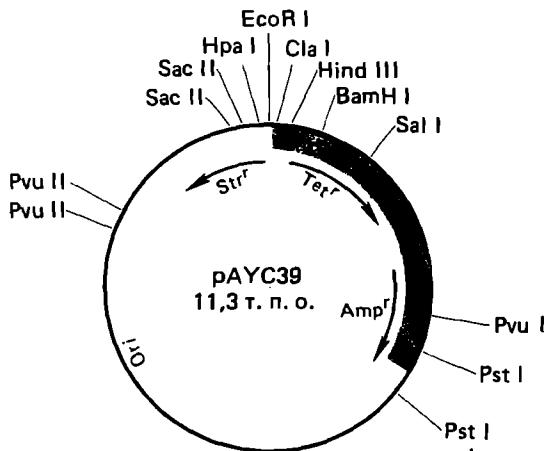


Рис. 31. Рестрикционная карта вектора широкого круга хозяев, сконструированного на основе плазмиды RSF1010 (по Ю. Д. Цыганкову и А. Ю. Чистосердову, 1986)

Красный цвет — ДНК-pBR322; серый — ДНК-Tn1; тонкая черная линия — ДНК-RSF1010; Str<sup>r</sup> — ген устойчивости к стрептомицину

Так как промежуточным хозяином для манипуляций с рекомбинантной ДНК являются бактерии *E. coli*, то наиболее эффективный путь введения — мобилизация гибридных плазмид в *Pseudomonas* с помощью конъюгации. Следует отметить, что гены *E. coli*, как правило, эффективно экспрессируются в *Pseudomonas*. Под контролем активных промоторов *E. coli* в штаммах *Ps. putida* достигнута продукция ряда эукариотических генов. Гены биосинтеза аминокислот *E. coli* комплементируют соответствующие ауксотрофные мутации штаммов *Ps. putida* и *Ps. aeruginosa*. Напротив, эффективность экспрессии генов *Pseudomonas* оказывается чрезвычайно низкой или отсутствует в клетках *E. coli*. Так, уровень активности ферментов, кодируемых TOL-плазмидой в *E. coli*, составляет 1—2 % от уровня в *Ps. putida*, а скорость роста *E. coli* на толуоле как единственном источнике углерода в этом случае в 10 раз ниже, чем *Ps. putida*. Последнее обстоятельство следует учитывать при клонировании генов *Pseudomonas*.

**Актиномицеты** — почвенные грамположительные бактерии, отличительной чертой которых является наличие в их жизненном цикле нескольких стадий дифференцировки, что не характерно для большинства прокариот. После прорастания спор актиномицеты образуют полигеномный субстратный мицелий, воздушный мицелий, который далее преобразуется в цепочки спор. Геном актиномицетов организован сложнее, чем у других бактерий и превосходит по размерам геном *E. coli* приблизительно в три раза. Другая отличительная черта актиномицетов — высокое содержание GC-пар в их ДНК, достигающее 73 %.

С практической точки зрения актиномицеты важны тем, что свыше 70 % всех известных антибиотиков продуцируется именно этим родом бактерий. Производство антибиотиков является на сегодня крупнейшей подотраслью промышленной микробиологии. Большой вклад в изучение проблем генетики актиномицетов и разработку принципов селекции высокоактивных штаммов внесли работы советских генетиков, возглавляемых С. И. Алиханяном.

Наиболее генетически изученными среди актиномицетов являются штаммы *St. coelicolor* АЗ(2) и *St. lividans* 66.

Применение методов молекулярного клонирования к актиномицетам оказалось возможным благодаря разработке эффективных способов получения и регенерации протопластов, трансформации протопластов плазмидной ДНК и трансфекции фаговой ДНК, конструированию векторных молекул на основе плазмид и фагов.

Для трансформации и трансфекции протопласты и ДНК смешивают и обрабатывают ПЭГ. На эффективность проникновения ДНК в клетки влияет ряд факторов: температура выращивания и возраст мицелия, концентрации литических ферментов, ионов  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и сахарозы и т. д. Оптимальные условия различны для разных штаммов *Streptomyces*. Максимально полу-

ченная эффективность —  $10^7$  трансформированных клеток на 1 мкг ДНК плазмиды размером в 5 т. п. о., что сравнимо с эффективностью Са-зависимой трансформации у *E. coli*.

Для актиномицетов разработаны как плазмидные, так и фаговые векторы. Плазмидные векторы сконструированы на основе плазмид актиномицетов. Первой используемой плазмидой была плазида SLP1.2 размером в 14,5 т. п. о., выделенная из *St. lividans* 66 (M. Bibb et al., 1981). Плазмиды серии SLP1.2 обуславливают конъюгационный перенос, присутствуют в клетке в небольшом числе копий (4—5). В качестве селективируемых маркеров они содержат гены устойчивости к антибиотикам неомицину (aph), тиострептону (tsr), виомицину (vph). Недостатком плазмид этой серии является узкий спектр хозяев, что, по-видимому, зависит от наличия в хромосомах многих видов актиномицетов последовательностей, родственных плазмиде SLP1.2, которые определяют несовместимость.

Другая серия векторов создана на основе половой плазмиды *St. coelicolor* A3(2) — SCP2 (31 т. п. о.). Эта плазида была первой изолирована из актиномицетов и изучена достаточно полно. Определены районы плазмиды, ответственные за репликацию, стабильность, трансмиссивные свойства, фертильность. Выделен минимальный репликом плазмиды SCP2 размером в 1,35 т. п. о. Показано, что репликация негативно регулируется двумя сегментами ДНК, удаление которых приводит к увеличению копийности в 1000 раз. Большим преимуществом векторов серии SCP2 является возможность клонирования в них протяженных участков ДНК (до 20 т. п. о.). Круг хозяев этих векторов достаточно широк. К настоящему времени на основе реплика SCP2 создана коллекция векторов, несущих селективируемые маркеры, удобные сайты рестрикции. Созданы челночные векторы, способные реплицироваться в актиномицетах и *E. coli*. Вектор для прямого отбора клонов несет ген *mel*, контролирующий синтез тирозиназы — фермента, превращающего тирозин в меланиновый пигмент. При вставке чужеродной ДНК ген *mel* инактивируется, что приводит к изменению цвета колоний (E. Katz et al., 1983).

Ряд векторов получен на основе многокопийной конъюгативной плазмиды pSB24.1 (8,4 т. п. о.), выделенной из штамма *Strept. cyanogenus* и имеющей широкий круг хозяев (В. Н. Даниленко и др., 1984; И. В. Бирюкова, Н. Д. Ломовская, 1985).

Большое число векторов создано на основе плазмиды *Strept. lividans* 66 pIJ101 (M. Bibb et al., 1985) (рис. 32). На основе одной из плазмид серии pIJ получена космида pR4C1, содержащая фрагмент с липкими концами (cos) актинофага R4. Эффективность трансдукции космиды в штамм *Strept. lividans* 66 составляет  $10^{-3}$  на одну частицу фага R4. Так как плазида pIJ и фаг R4 имеют широкий круг хозяев, полученная космида пригодна для переноса генов в штаммы актиномицетов, не имеющие разработанной системы молекулярного клонирования.

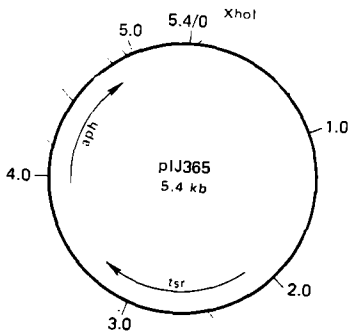


Рис. 32. Плазмидный вектор pIJ 365 для клонирования генов в *Streptomyces*:

t<sub>sr</sub> — ген устойчивости к тиострептонону; aph — ген устойчивости к неомицину; цифрами обозначены т. п. о. (P. Pouwels et al., 1985)

Фаговые векторы актиномицетов сконструированы главным образом на основе фага ØС31, который в течение долгих лет был предметом генетических и молекулярно-биологических исследований и сегодня занимает такое же положение в генетике актиномицетов, как фаг λ в генетике и молекулярной биологии *E. coli* (N. D. Lomovskaya et al., 1980). Размер генома ØС31 составляет 41,5 т. п. о. Фаговая ДНК имеет липкие концы (cos) и несет непрерывную область размером 8 т. п. о., несущественную для литического развития. Минимальный размер молекул ДНК, способных упаковываться в фаговую головку, — 35 т. п. о., максимальный — не превышает размеров молекул ДНК фага, т. е. 41,5 т. п. о.

Использование фаговых векторов открывает большие перспективы для клонирования генов биосинтеза антибиотиков с помощью метода *мутационного клонирования*. Сущность метода заключается в возникновении мутантов, не способных к синтезу антибиотика (Ant<sup>-</sup>) при включении ДНК фага по гомологии с клонированным фрагментом в структурную часть гена(ов) ant реципиентного штамма, в результате нарушения их целостности. Фаговое потомство мутантных штаммов, образуемое при вырезании профага по фланкирующим гомологичным повторам, содержит в составе фаговых геномов клонируемый фрагмент с геном ant или частью этого гена (K. Chater, C. Bruton, 1983).

С помощью метода мутационного клонирования выделены гены биосинтеза антибиотика метиленомицина (mty). Все гены оказались сцепленными и локализуются на плазмиде SCP1. Плазмида SCP1, как и некоторые другие, может находиться как в автономном виде, так и в интегрированном в хромосому состоянии. Возможно, высокая нестабильность признаков антибиотикообразования, наблюдаемая у многих видов актиномицетов, связана с локализацией генов биосинтеза антибиотиков на таких элементах хромосомы, которые способны к вырезанию. Такая ситуация наблюдается, например, у продуцентов тилозина *S. fradiae*. В 1986 г. группой исследователей в США показано, что все гены биосинтеза этого антибиотика сцеплены и находятся на крупной плазмиде (свыше 100 т. п. о.). Обнаружены также кластеры генов биосинтеза и устойчивости к окситетрациклину (*S. rimosus*), эритромицину (*S. erytreus*), клавулоновой кислоте (*S. clavuligerus*).



Интересная особенность строения генома актиномицетов — явление амплификации части генома. Амплифицированные последовательности (АП) имеют размер от 50 т. п. о. до примерно 0,2 т. п. о. и от 10 до 500 tandemно повторяющихся копий. В сумме они могут составлять до 30 % генома. По крайней мере в некоторых случаях повторяющаяся единица фланкирована прямыми повторами. Возможно, повторы имеют функции IS-элементов. Рекомбинация по прямым повторам может приводить к вариантам, имеющим отличную от исходной локализацию генов, расположенных между ними, вариантам с разным числом копий этих генов и полностью утратившим эти гены. Все это приводит к возникновению мутантных фенотипов. Возможно, это вторая причина помимо интеграции и вырезания плазмид, приводящая к реверсильной и нереверсильной генетической нестабильности у актиномицетов.

Явление амплификации сегментов хромосомной ДНК у актиномицетов может быть использовано для конструирования интегративных амплифицирующихся векторов, в которых чужеродный ген включается внутрь АП.

Гены *E. coli* и бацилл, как правило, экспрессируются в стрептомицетах с использованием собственных регуляторных элементов, т. е. промоторов и сайтов инициации трансляции. Так, вставка промоторов *lac UV5*, *trp*, гена *gcsA E. coli* или промотора гена пенициллиназы *Bac. licheniformis* перед геном *cat* (не содержащим промотора) на специальной плазмиде приводит к устойчивости к хлорамфениколу штамма *S. lividans* 66. Актиномицентные гены, напротив, не экспрессируются в *E. coli*.

В настоящее время исследуется возможность применения актиномицетов в качестве промышленных продуцентов чужеродных белков и биологически активных веществ. Проведение таких работ основано на том, что промышленность имеет богатый опыт культивирования актиномицетов; кроме того, актиномицеты обладают достаточно мощной системой секреции белков в окружающую среду. Так, в 1984 г. группой американских авторов была предпринята попытка сконструировать штамм-продуцент гормона роста быка (BGH) на основе *S. lividans* 66 и многокопийной плазмиды pIJ702. Был получен нормальный белок, однако выход его был ниже ожидаемого. В 1985 г. во ВНИИ генетика была осуществлена работа по экспрессии в актиномицетах части гена дифтерийного токсина *Corynebacterium diphtheriae*. В результате этих экспериментов получена достаточно эффективная экспрессия и, главное, высокая (около 92 %) секреция белкового продукта в культуральную среду. Экспрессия и секреция осуществлялись за счет собственного промотора и сигнальной последовательности белка-токсина. Таким образом, разработка генной инженерии актиномицетов открывает широкие перспективы.

**Бациллы** становятся в настоящее время одним из важнейших объектов генно-инженерных исследований. Это связано с рядом

особенностей этих микроорганизмов. Во-первых, в течение длительного времени промышленность использует способность бацилл секретировать во внешнюю среду многие ферменты, такие, как протеиназа,  $\alpha$ -амилаза. (Количество секретируемых ферментов достигает нескольких граммов на 1 л КЖ.) Существует крупнотоннажное производство вышеназванных ферментов, и промышленность имеет богатый опыт культивирования этих микроорганизмов. Другим преимуществом является глубокая генетическая и биохимическая изученность бактерий вида *Bac. subtilis*, что облегчает развитие генно-инженерных манипуляций с данным микроорганизмом.

Клонирование в бациллах имеет ряд особенностей. Несмотря на то что у многих видов бацилл были обнаружены плазмиды, большинство из них оказались криптическими, т. е. не кодировали известной нам функции. В 1977 г. французский исследователь С. Эрлих показал, что некоторые плазмиды *St. aureus*, определяющие устойчивость к антибиотикам, могут реплицироваться и экспрессировать свой генетический материал в *Bac. subtilis*. В настоящее время создано много векторов на основе репликонов плазмид *St. aureus*, часть из которых приведена в табл. 4. Большое распространение получили челночные векторы, способные реплицироваться как в *Bac. subtilis*, так и в *E. coli*. Такие плазмиды содержат два репликона, один из которых контролирует репликацию в клетках *Bac. subtilis*, а второй — в клетках *E. coli* (см. рис. 33). Созданы также векторы инсерционной инактивации (например pHV33).

Таблица 4. Некоторые векторные плазмиды, используемые для клонирования в *Bac. subtilis*

Плаزمида	Устойчивость к антибиотикам	Молекулярная масса $\times 10^6$	Происхождение
pC194	Cm <sup>r</sup>	2,0	<i>St. aureus</i>
pT127	Tc <sup>r</sup>	2,9	То же
pE194	Em <sup>r</sup>	2,3	»
pUB110	Km <sup>r</sup>	3,0	»
pSAO501	Sm <sup>r</sup>	2,8	»
pHV11	Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	3,5	pC194 + pT127
pBD6*	Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	5,9	pUB110 + pSAO501
pBC16	Tc <sup>r</sup>	4,25	<i>Bac. cereus</i>
pHV33**	Tc <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	—	pBR322 + pC194

\* В плазмиде pBD6 возможно клонирование по Bam HI, BglII, Hind III, Taq I, причем клонирование по BglII инактивирует Km<sup>r</sup>, а клонирование по HindIII — Sm<sup>r</sup>.

\*\* Это пример челночного вектора. В *E. coli* выражаются все три устойчивости, но в *Bac. subtilis* экспрессируется только Cm<sup>r</sup>.

Несмотря на то что *Bac. subtilis* классический объект изучения хромосомной трансформации и в компетентном состоянии до 5% клеток способны поглощать чужеродную ДНК, плазмидная трансформация имеет ряд особенностей. Такая трансформация идет с низкой частотой, и было показано, что мономерные кольцевые формы плазмидной ДНК вообще не способны трансформировать компетентные клетки (см. гл. 2). Наблюдаемые частоты трансформации целиком связаны с примесями димерных (олигомерных) форм плазмидной ДНК.

Трудности клонирования в *Bac. subtilis* частично были преодолены с помощью метода, названного *рекомбинационным спасением маркера*. Метод основан на том, что ДНК гибридной плазмиды (возможно, и в линейной форме) вводится в компетентные клетки, уже содержащие реципиентную плазмиду, гомологичную исходному вектору. Вследствие гесЕ-зависимой рекомбинации в реципиентной клетке появляется гибридная плазида. В процессе достройки односторонней ДНК происходит исправление дефектов донорной ДНК. В данном методе важно, чтобы включаемый негомологичный фрагмент был окружен гомологичными последовательностями. Метод был применен для клонирования в *Bac. subtilis* фрагментов ДНК *Bac. licheniformis*, несущих *trp*-маркеры и гены рибофлавинового оперона (Ю. Иомантас и др., 1980).

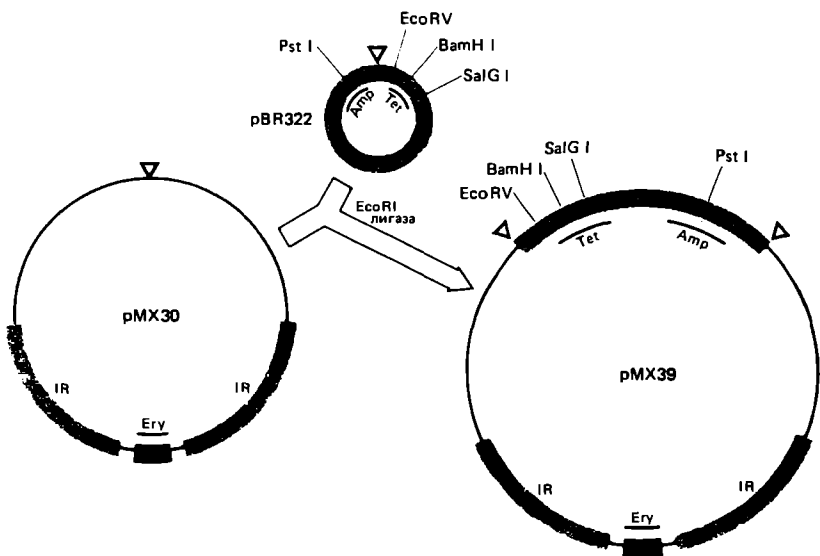


Рис. 33. Плазида pMX30 (делеционный вариант плазмиды pSM19035) и получение на ее основе двурепликонного (*E. coli*—*Bac. subtilis*) вектора pMX39 (по М. Я. Хайкинсону и др., 1982):

IR — инвертированные повторы; Ery — ген устойчивости к эритромицину, треугольником указаны сайты EcoRI

Оказалось, что нет необходимости использовать олигомерные формы; достаточно, чтобы векторы содержали прямые или обратные повторы ДНК. Такие векторы, созданные на основе плазмиды рSM19035 из *Str. sanguis* (Challis), способны трансформировать клетки *Bac. subtilis* с высокой эффективностью в мономерной форме (рис. 33).

Альтернативным методом введения плазмид является трансформация мономерными плазмидами протопластивированных клеток в присутствии ПЭГ. Частоты трансформации достаточно высоки при использовании векторных молекул, но быстро падают с ростом молекулярной массы плазмид. Метод, следовательно, недостаточно эффективен при клонировании протяженных фрагментов ДНК. При трансформации протопластов ДНК попадает в клетку в двуспиральной форме, поэтому могут встретиться ограничения, связанные с наличием во многих штаммах бактерий систем рестрикции — модификации. В случае природной трансформации, когда ДНК попадает в клетку в одонитевой форме, не чувствительной к рестрикции, наличие рестриктазы в реципиентном штамме не служит препятствием. Так, частоты трансформации немодифицированной ДНК плазмиды рUB110 в клетки штамма *Bac. subtilis*, несущего рестриктазу *Bsu*, падали только в 10 раз по сравнению с частотой трансформации модифицированной ДНК. Сам факт падения частоты трансформации связан с тем, что не все одонитевые молекулы ДНК успели подвергнуться метилированию соответствующей метилазой.

Вследствие высокой эффективности рекомбинации между гибридной плазмидой и хромосомой возникают трудности клонирования в клетках *Bac. subtilis* собственных генов. Эту трудность обычно обходят путем клонирования в *Bac. subtilis* одонименных генов из родственных видов бактерий (*Bac. licheniformis*, *Bac. amyloliquefaciens*), которые тем не менее не обладают близкой гомологией последовательностей ДНК с *Bac. subtilis*.

Для большинства научно-исследовательских задач плазмиды, используемые в качестве векторов для *Bac. subtilis*, достаточно стабильны. Однако в крупномасштабных ферментациях можно использовать штаммы, которые устойчиво сохраняют плазмиды. Поддержание плазмид обеспечивается тремя процессами: 1) репликация; 2) клеточное деление; 3) распределение плазмид по дочерним клеткам. Эти процессы, хорошо изученные для плазмид *E. coli*, вероятно, так же важны и для сохранения плазмид *Bac. subtilis*. Так, введение в одну из плазмид, происходящую из *Str. aureus* фрагмента ДНК, кодирующего раг-функцию (от *partition* — распределение — функция точного распределения плазмид между дочерними клетками) из криптоической плазмиды *Bac. subtilis*, резко повысило ее стабильность. Эта гибридная плазида сохраняется почти у 100% клеток после 100 генераций в неселективных условиях. В этой связи кажется вероятным, что использование в качестве векторов плазмид, происходящих из бактерий, предпочтительно, поскольку они имеют

системы репликации клеточного деления и распределения, соответствующие хозяйской клетке.

Гены *Bac. subtilis* обычно эффективно экспрессируются в клетках *E. coli*, что облегчает анализ банка бациллярных генов. В бациллах гены *E. coli* практически не выражаются. Блок экспрессии осуществляется уже на стадии транскрипции, что было показано строго для генов *bla* ( $\beta$ -лактамаза), плазмиды pBR322 и гена *cat* (хлорамфениколацетилтрансфераза) плазмиды pACYC184.

Кроме того, есть все основания считать, что трансляционный механизм грамположительных организмов не способен эффективно транслировать мРНК грамотрицательных бактерий. Для бацилл требуется более строгая комплементарность последовательности Шайн—Делгарно 3'-концу 30S рибосомной РНК, чем у *E. coli*. У *E. coli* часто достаточно иметь в сайте связывания рибосом четыре нуклеотида AGGA, в то время как для *Bac. subtilis* характерной последовательностью является пятичленник — GGAGG.

Таким образом, для эффективной экспрессии чужеродных генов в бациллах желателно использовать вектор с бациллярным промотором и бациллярным сайтом связывания с рибосомами. У бацилл, которые имеют сложный цикл дифференцировки, существуют наборы генов, выражающиеся на определенных стадиях клеточного развития. Одним из главных механизмов переключения является изменение сигма-фактора РНК-полимеразы. Таким образом, можно применять промоторы, которые будут включать чужеродный ген в желаемое для нас время клеточного развития. Для продления эффективного синтеза чужеродного продукта можно использовать тандемные промоторы, например, промотор, который узнается при участии сигма<sup>37</sup>-субъединицы (ранняя стационарная фаза), и промотор, который распознается при участии сигма<sup>29</sup> (поздняя стационарная фаза). Можно отметить, что созданы специальные векторы для отбора бациллярных промоторов.

Одной из основных целей генно-инженерных работ на бациллах является создание векторов, способных экспрессировать чужеродные гены и секретировать в окружающую среду продукты этих генов. С этой целью чужеродный ген помещают за участком ДНК, кодирующим сигнальную последовательность хорошо экспрессируемого и секретируемого бациллярного белка. Наглядными примерами такого подхода служат работы по секретиции человеческого интерферона  $\alpha 2$  под контролем регуляторных элементов и сигнального пептида  $\alpha$ -амилазы или человеческого  $\beta$ -интерферона под контролем промотора и регуляторной области нейтральной протеазы *Bac. amyloliquefaciens* (см. гл. 4). Во всех случаях наблюдается секреция чужеродных белков в среду, причем отщепление сигнального пептида осуществляется точно перед чужеродным белком. Из этого следует, что фермент сигнальная пептидаза узнает последовательности сиг-

нального пептида, причем структура чужеродного белка не влияет на узнавание точки расщепления. Тем не менее выходы продуктов были невысоки и, как правило, в 100—1000 раз ниже, чем собственных белков, т. е. амилазы и нейтральной протеазы. Во всех случаях использовались мутанты по протеиназам и ингибиторы протеаз, так как в штаммах дикого типа выходы были еще на три порядка ниже. Однако даже достигнутые результаты (для  $\beta$ -интерферона  $10^9$  ед/л) представляют практический интерес, так как очистка белка из культуральной жидкости намного проще, чем из лизата клеток. Безусловно, требуется дальнейшая работа для совершенствования этой перспективной системы.

**Коринебактерии** — это большая группа грамположительных микроорганизмов, включающая непатогенные формы\* (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*), широко используемые для производства аминокислот. По стоимости продукции производство аминокислот уступает только производству антибиотиков и занимает первое место по тоннажу (в 1985 г. произведено в мире около 400 тыс. т *L*-глутаминовой кислоты, около 90 тыс. т *L*-лизина). Несмотря на очевидное практическое значение, генетика и молекулярная биология коринебактерий разрабатаны слабо. Единственным широко используемым на сегодня методом является слияние протопластов. Следует отметить, что у коринебактерий хорошо изучены пути биосинтеза аминокислот и способы их регуляции.

Адаптация генно-инженерных методов к этим видам микроорганизмов затруднена в связи с отсутствием удобных векторных молекул и способов введения в клетки коринебактерий чужеродной ДНК. Плазмиды обнаружены у многих коринебактерий, но все они оказались криптическими. До настоящего времени не удалось использовать ни один репликон других бактерий для создания векторов у коринебактерий. Имеющиеся векторы представляют собой гибридные молекулы, содержащие репликон криптической плазмиды коринебактерии и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам из плазмид других бактерий (табл. 5). Сложность конструирования таких векторов связана не только с трудностью идентификации криптических плазмид, но и с тем, что внедрение селективных маркеров производится наугад, так как не известно строение репликона этих плазмид.

Единственным методом введения гибридных плазмид является трансформация сферопластов, полученных после обработки клеток лизоцимом. Клеточная стенка должна быть при этом подготовлена предварительным выращиванием клеток на среде с пенициллином и глицином. Для каждого штамма требуется оптимизация условий получения сферопластов и их регенерации. В лучших экспериментах частоты трансформации достигают  $10^4$ — $10^6$  трансформантов на 1 мкг ДНК.

\* Некоторые виды коринебактерий патогенны для человека (возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae*) и растений (*Corynebacterium michiganense* *Corynebacterium fascians*).

Таблица 5. Векторы, используемые для коринебактерий (K. Hiwa et al., 1985)

Плазмиды	Источник репликаона коринебактерий	Источник другого репликаона	Селективные маркеры
pAJ655	pAM330 (4,4 т.п.о.) из <i>Br lactofermentum</i>	pBR325, <i>E. coli</i>	Ст, Ap
pAJ440	pAM330 (4,4 т.п.о.) из <i>Br lactofermentum</i>	pUB110, <i>Bac. subtilis</i>	Km
pAJ1844	pHM1519 (3,0 т.п.о.) из <i>Cor. glutamicum</i>	pBR325, <i>E. coli</i>	Ст, Ap
pAJ1629	pHM1519 (3,0 т.п.о.) из <i>Cor. glutamicum</i>	pUB110, <i>Bac. subtilis</i>	Km
pAJ667	Из <i>Br lactofermentum</i> pAJ43 — делеционный вариант плазмиды pAJ655	cos-Сайт из фага 11A ( <i>Brevibacterium</i> )	Ст

Предприняты успешные попытки клонирования генов биосинтеза аминокислот. При этом возможны два подхода: 1) прямое клонирование в коринебактериях и отбор по комплементации ауксотрофности и 2) клонирование в *E. coli*. Второй подход предпочтительнее, так как у *E. coli* имеется несравненно больший набор хорошо охарактеризованных мутаций. Хотя не все гены коринебактерий выражаются в *E. coli*, скрининг библиотеки генов *Cor. glutamicum* в *E. coli* позволил идентифицировать следующие гены коринебактерий: *dapB*, *dapC*, *dapD*, *lysA*, *argE*, *argG*, *leuB*, *leuC*, *hisG*, *his206*, *purE*, *trpE*.

Практические успехи пока незначительны, так как требуются совершенствование векторов, способов трансформации, изучение строения промоторов и других регуляторных элементов, развитие методов траспозонного мутагенеза, сплавления генов для более свободного подхода к конструированию штаммов-сверхпродуцентов. Однако освоение методов генной инженерии значительно облегчает развитие перечисленных подходов.

**Дрожжи** используются человеком в хозяйственной деятельности (хлебопечении, виноделии, пивоварении) с доисторических времен, особенно вид *Sacchar. cerevisiae* (пекарские дрожжи). В настоящее время помимо традиционных областей промышленности дрожжи рода *Candida* нашли применение в микробиологическом синтезе белка (кормовой белок). В СССР создана промышленность по производству белка с помощью дрожжей из нормальных парафинов нефти и гидролизатов древесины и некоторых сельскохозяйственных отходов. Весьма перспективным сырьем для производства дрожжевой биомассы являются низшие спирты — этанол и метанол.

Дрожжи представляют особый интерес в связи с тем, что они являются простейшими эукариотами. Предполагается, что исследование дрожжей, к которым можно уже сегодня применять многие методы молекулярной генетики и генной инженерии, приведет к пониманию некоторых фундаментальных особенностей функционирования эукариотической клетки.

Большинство исследований проводится на пекарских дрожжах *Sacchar. cerevisiae*, что объясняется глубокой генетической изученностью этого объекта. Поэтому все, что будет сказано ниже, относится именно к этому роду дрожжей.

Генная инженерия дрожжей возникла в 1978 г. вместе с открытием возможности трансформирования дрожжевых сферопластов плазмидной ДНК (А. Ниппен et al., 1978). Трансформация осуществляется с частотой около  $10^{-7}$  на выживший сферопласт. Было показано, что при трансформации дрожжей гибридными плазидами, содержащими репликон ColE1 и фрагмент дрожжевой ДНК, осуществляется интеграция либо всей плазмиды, либо дрожжевого гена в хромосому *Sacchar. cerevisiae*. Возможны различные варианты интеграции как в области гомологичного гена, так и в иные участки генома, имеющие гомологию с трансформирующей ДНК дрожжей. Серию векторных молекул, несущих гены дрожжей и содержащих репликон плазмиды бактерий, обозначают как YIp (векторы интеграции). Это определение не точно, так как такие молекулы не являются векторами в обычном смысле слова. Они не могут реплицироваться в дрожжевой клетке. По существу, это обычная трансформация, требующая гомологичной рекомбинации после проникновения ДНК в клетку. Вектор в данном случае используется только для синтеза больших количеств ДНК определенного дрожжевого гена в *E. coli*. Несмотря на высокую пропорцию «нужного» гена в трансформирующей ДНК, частота трансформации низка (1—100 трансформантов на 1 мкг ДНК). Обычно трансформированные клетки содержат одну или несколько копий вектора типа YIp.

К истинно векторным системам дрожжей относятся два типа репликонов. Это векторы типа YRp, которые несут в своем составе области начала репликации дрожжевых хромосом. Последовательности, способные к автономной репликации, встречаются на дрожжевой хромосоме в среднем один раз на 40000 п.о. и обозначаются ARS (autonomous replication sequence). Векторы типа YRp трансформируют дрожжевые клетки с высокой частотой, достигающей в лучших экспериментах нескольких процентов от числа регенерированных протопластов, и поддерживаются в клетке в количестве 5—10 копий. Основным недостатком этого типа векторов является их высокая нестабильность. Частота их утраты трансформированной клеткой составляет около 30% на генерацию. Это, по-видимому, связано с дефектом сегрегации векторов типа YRp при клеточном делении. Стабильность векторов типа YRp можно значительно повысить, если включить в их состав одну из центромерных последовательностей хромосом дрожжей. Такие векторы значительно лучше сохраняются в клетках, но копийность их падает до 1. Гены, расположенные на таких плазидах, не рекомбинируют с хромосомой. Векторы типа YCr в мейозе ведут себя как минихромосомы. Утрата векторов типа



УСр происходит с частотой, равной приблизительно 5% на генерацию (Y. Carbon, 1984).

Наибольшее значение с прикладной точки зрения имеет серия векторов YEr (эписомные), использующих в качестве репликона природную плазмиду *Sacchar cerevisiae* размером около 6 т. п. о. Эта плазида открыта в середине 70-х годов одновременно в нескольких лабораториях. Из-за своего размера она получила название 2 мкм ДНК (другое название — омикронная ДНК, или оДНК). Несмотря на то что установлена полная нуклеотидная последовательность этой плазмиды, отсутствуют данные о том, что она определяет какую-либо полезную функцию для дрожжевой клетки. В зависимости от штамма дрожжей плазида содержится в количестве 30—100 копий на клетку и имеет ядерную локализацию. Хотя оДНК весьма стабильна и ее спонтанная утрата не превышает  $10^{-4}$  на генерацию, гибридные плазмиды на ее основе менее стабильны (по крайней мере в 10 раз).

Невысокая стабильность векторов типа YEr не является препятствием для проведения генно-инженерных экспериментов в научных целях или даже для создания штаммов-продуцентов белков человека и других ценных пептидов, т. е. в тех случаях, когда используется ферментация в малых объемах. Тем не менее такого сорта векторы непригодны для крупномасштабной ферментации и не могут способствовать улучшению штаммов дрожжей — продуцентов белка или этанола. Эту трудность можно преодолеть, применяя селективное давление или автоселекцию клеток, содержащих плазмиду. Например, клонирование в составе вектора гена металлотенина (CUP1), определяющего устойчивость клеток к ионам меди, и выращивание клеток в присутствии этих ионов приводят к стабилизации популяции плазмид-содержащих клеток. Еще более перспективно клонирование в составе вектора гена дрожжевого токсина, способного экскретироваться из клеток в среду. Клетки, продуцирующие токсин, сами к нему иммунны, но токсин убивает клетки, его не продуцирующие. Трансформанты дрожжей, содержащие вектор с геном токсина, элиминируют из популяции клетки, утратившие его. Даже после 100 генераций в богатой среде доля бесплазмидных клеток в популяции не превышает 1%. Таким образом, векторы на базе оДНК весьма удобны. К сожалению, скрининг подобных плазмид в других видах дрожжей пока не привел к положительным результатам. Это еще одна причина, по которой генная инженерия дрожжей продолжает сегодня концентрироваться в основном вокруг *Sacchar. cerevisiae*.

Большие надежды связывали с дрожжевыми клетками как эукариотическими организмами для экспрессии в них генов человека и животных. Однако вскоре выяснилось, что сигналы инициации транскрипции, трансляции, сплайсинга у дрожжей отличаются от таковых высших эукариот.

Так, несмотря на то что около 10% дрожжевых генов содержат интроны, сплайсинг про-мРНК высших эукариот не осуще-

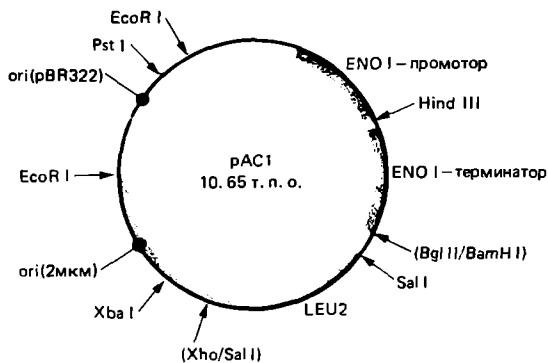


Рис. 34. Сэндвич-вектор, используемый для экспрессии в дрожжах чужеродных генов (по M. Inppis et al., 1985):

ori (pBR322) — точка начала репликации плазмиды pBR 322; ori (2 мкм) — точка начала репликации дрожжевой плазмиды 2 мкм; LEU2 — дрожжевой ген; Hind III — сайт, используемый для встройки чужеродных генов, расположен между промотором и терминатором дрожжевого гена энлазы (ENO1)

дрожжевой промотор (часто с предшествующим ему усилителем транскрипции — энхансером), 5'-нетранслируемую область, рестрикционный сайт (или сайты) для встройки чужеродного гена и терминатор транскрипции. Встроенный чужеродный ген попадает, таким образом, под транскрипционный контроль одного из генов дрожжей. Вектор может реплицироваться в *E. coli* и *Sacchar. cerevisiae* и отбираться по устойчивости к ампициллину в *E. coli* и прототрофности по лейцину в *Sacchar. cerevisiae*.

В генной инженерии дрожжей широко используют промоторы генов PGK1 (3'-фосфоглицераткиназа), GPD1 (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа). ADH1 (алкогольдегидрогеназа), PFO5 (кислая фосфатаза) и ряд других. Считается, что наиболее сильный промотор содержит ген PGK1. Так, клонирование на векторе YEp 3-фосфоглицераткиназы (т. е. собственного гена дрожжей) привело к тому, что этот фермент составлял 50—80% общего белка клетки. Однако клонирование в сэндвич-векторе под контролем PGK1-промотора чужеродных генов приводит к более скромным результатам: для прохимозина быка — это 20% и для α2-интерферона — 2% от общего белка (S. Kingsman et al., 1983).

Проблемы оптимизации экспрессии чужеродных белков в дрожжах, в общем, те же, что и для бактериальной клетки: 1) борьба с протеолизом; 2) стабилизация мРНК; 3) преодоление токсичности для клетки некоторых белков. Эти проблемы усложняются еще и тем, что гораздо хуже известны необходимые

ствляется в дрожжевой клетке и, следовательно, в них, как и в клетках бактерий, можно клонировать только гены, полученные из кДНК.

Для эффективной экспрессии чужеродных генов следует использовать сигналы инициации и терминирования транскрипции собственных дрожжевых генов. На базе векторов YEp созданы специальные экспрессирующие векторы, называемые сэндвич-векторами (рис. 34). Эти векторы содержат в своем составе

условия для оптимизации инициации транскрипции и трансляции у дрожжей по сравнению с бактериальными клетками.

В настоящее время внимание исследователей привлекает возможность секретиции дрожжевой клеткой чужеродных белков. Это связано не только с тем, что белок из культуральной жидкости легче очистить, чем из цитоплазмы. Многие белки при синтезе в цитоплазме бактериальной или дрожжевой клетки собираются неправильно. Так,  $\beta$ -интерферон, синтезированный в бактериях *E. coli*, обладает существенно меньшей удельной активностью и образует значительное количество олигомерных форм. Прохимозин, синтезированный в цитоплазме дрожжевой клетки, нерастворим и не подвергается автоактивации. Возможно, для правильного созревания белков, в норме секретируемых, им необходимо пройти путь секреции. По крайней мере в случае прохимозина эта гипотеза нашла подтверждение. Ген прохимозина быка был помещен в сэндвич-вектор, содержащий промотор, сигнальную последовательность и первые 11 аминокислот гена дрожжей SUC2 (инвертаза). При экспрессии в дрожжах сигнальный пептид отщепляется в ходе секреции, а сплавленный белок — инвертаза — прохимозин секретируется в среду. Этот сплавленный белок при низком pH процессируется в активный химозин со 100%-ной эффективностью. Правда, секретируется лишь небольшая часть синтезированного в клетке белка. Секреция может быть повышена путем введения специальных мутаций в хромосомы дрожжей. Так, были отобраны две мутации SSC1 и SSC2, действующие аддитивно. В штаммах, содержащих обе мутации, секреция увеличивалась приблизительно в 80 раз и достигала 80—85% всего синтезированного клеткой прохимозина (R. Smith et al., 1985). Вероятно, описанный выше подход будет полезен и для других белков, правильная сборка которых в бактериальных клетках нарушена.

Важной задачей генной инженерии дрожжей является улучшение промышленных штаммов. Успешным примером этой методологии служит введение гена глюкоамилазы гриба *Aspergillus* в клетки *Sacchar. cerevisiae*. Грибная глюкоамилаза способна расщеплять  $\alpha$  (1,4)- и  $\alpha$  (1,6)-гликозидные связи и, таким образом, деградировать необработанный крахмал. Так как дрожжи не способны к сплайсингу, ген глюкоамилазы был получен с помощью обратной транскрипции из зрелой мРНК и затем введен в сэндвич-вектор под контроль промотора и сигнальной последовательности дрожжевой энлазы (ENO1) (рис. 34). В результате наблюдалась почти 100%-ная секреция грибной глюкоамилазы в среду. Количество экскретируемого фермента составляло приблизительно 1 мг/л.

Вышеприведенные примеры показывают некоторые современные возможности применения генной инженерии дрожжей для создания штаммов — продуцентов биологически активных белков — и улучшения промышленных штаммов дрожжей.

# Глава 4

## СОЗДАНИЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ СОВРЕМЕННЫМИ МЕТОДАМИ

---

Производства, основанные на использовании микроорганизмов, могут быть рентабельными лишь при условии применения высокоактивных штаммов-продуцентов. Только в этом случае могут быть оправданы все усилия физиологов, технологов и химиков, связанные с разработкой и усовершенствованием процессов ферментации, выделения и очистки целевого продукта. Кроме высокой продуктивности микроорганизмы должны обладать и другими полезными свойствами, обеспечивающими успешное ведение технологического процесса. Сюда относятся скорость роста, устойчивость к повышенной температуре и кислотности среды, фагоустойчивость, стабильность наследования ценных признаков. Все большее значение приобретает способность микроорганизмов-продуцентов усваивать дешевые и доступные субстраты, а также безвредность их для человека и животных.

Создание высокоактивных штаммов с заданными свойствами во многом зависит от уровня знаний об организации генома и регуляции метаболизма микробной клетки. Для *E. coli* известны молекулярные механизмы репликации ДНК, транскрипции и трансляции, регуляции активности разных генов, лучше всего разработаны приемы генетического конструирования *in vivo* и *in vitro*. Именно поэтому первые работы по созданию промышленных штаммов микроорганизмов современными методами выполнены на этом микроорганизме. Распространение методологии геной инженерии на другие объекты требует дополнительных исследований. Как уже было показано, здесь достигнуты значительные успехи — сконструированы удобные векторы для псевдомонад, бацилл, актиномицетов и дрожжей. На этой основе будут созданы и уже создаются новые высокоактивные штаммы для промышленности.

В настоящей главе на примере конструирования продуцентов треонина и интерферонов человека показано, как с помощью современных методов создаются эффективные промышленные штаммы микроорганизмов.

## § 1. Конструирование штаммов — продуцентов первичных метаболитов

В течение 1977—1980 гг. во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов на базе лабораторного штамма *E. coli* K-12 с использованием методов генной инженерии впервые в мире был сконструирован эффективный штамм-продуцент *L*-треонина — важной незаменимой аминокислоты. Эта работа объединила исследователей из разных лабораторий, которые первоначально независимо друг от друга занимались изучением регуляции активности генов биосинтеза треонина (Р. С. Шакулов и сотр.), селекцией штаммов-продуцентов треонина (Н. И. Жданова и сотр.) и клонированием генов, контролирующих синтез треонина на многокопийных плаزمидях (В. Г. Дебабов и сотр.).

На рис. 35 изображен путь биосинтеза *L*-треонина, который синтезируется из аспарагиновой кислоты. Помимо треонина из нее образуются также лизин, метионин и изолейцин, составляющие так называемое аспарагиновое семейство аминокислот. В биосинтезе треонина участвуют четыре фермента, три из которых контролируются генами треонинового оперона (*thr*-оперон). Реакция превращения аспартилфосфата в полуальдегид аспарагиновой кислоты катализируется продуктом гена *asd*, не входящим в оперон. Эта стадия не лимитирует процесс и поэтому в дальнейшем рассматриваться не будет. Ген *thr A*, *A*<sub>2</sub> кодирует синтез полипептида (аспартокиназа I — гомосериндегидрогеназа I), обладающего двумя ферментативными активностями: аспартокиназной и гомосериндегидрогеназной. Ген *thrB* кодирует гомосеринкиназу, и ген *thrC* — треонинсинтетазу.

Треонин совместно с изолейцином подавляют экспрессию оперона. Хотя этот факт установлен давно, до сих пор нет полной ясности в понимании того, как происходит подавление. Несомненно участие в этом процессе механизма аттенуации. Как было показано на рис. 4, лидерный пептид *thr*-оперона содержит большое число остатков треонина и изолейцина. Следовательно, при избытке указанных аминокислот и соответственно треонил-тРНК и изолейцин-тРНК будет происходить эффективная терминация синтеза треониновых мРНК (тре-мРНК) на участке аттенуатора. И наоборот, при их недостатке экспрессия оперона будет повышаться. Недавно появилось сообщение о существовании гена-регулятора, *ileR*, который контролирует экспрессию *thr*- и изолейцин-валинового (*ilv*)-оперонов. В связи с этим можно предполагать, что регуляция активности *thr*-оперона осуществляется также посредством мультивалентной репрессии, причем корепрессорами являются треонин и изолейцин.

Важно отметить, что активность первого фермента пути биосинтеза аспартокиназы I — гомосериндегидрогеназы I ингибируется конечным продуктом — треонином.

В процессе предварительных исследований было установлено,

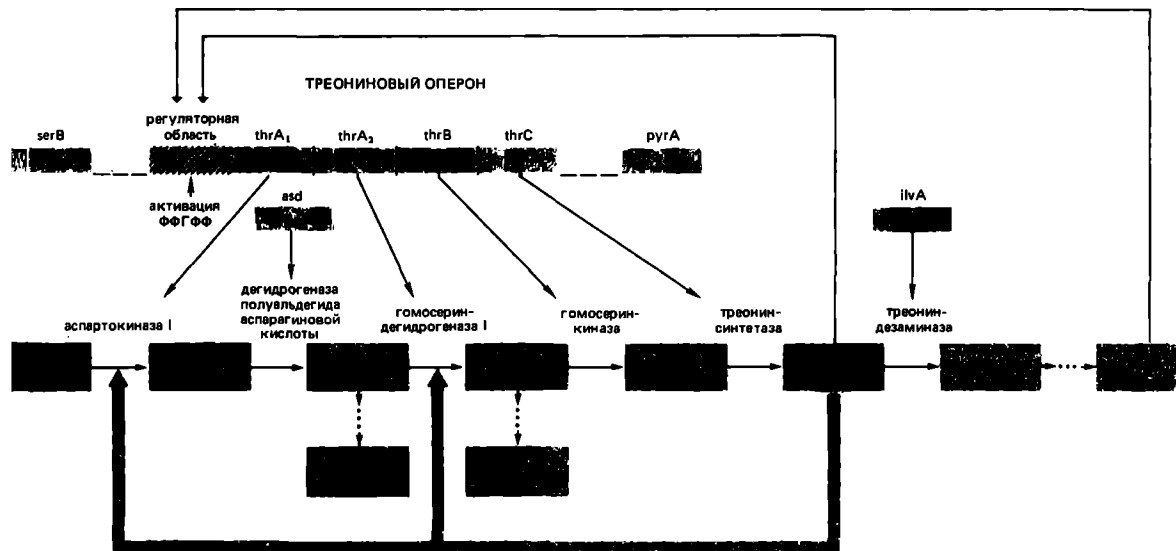


Рис. 35. Схема регуляции биосинтеза треонина у *E. coli*  
 Красные стрелки — репрессия; серая стрелка — ретроингибирование

что выражение треонинового оперона зависит от функции гена *relA*.

В клетках *E. coli* ген *relA* контролирует синтез гуанозинтетрафосфата фФГФф, который координирует изменения метаболизма бактерий в условиях дефицита аминокислот, а точнее, при дефиците аминоацил-тРНК (см. гл. 1). Накопление фФГФф при неблагоприятных для клетки условиях позволяет, с одной стороны, уменьшить транскрипцию генов, кодирующих компоненты аппарата трансляции (рРНК и рибосомные белки), а с другой — усилить транскрипцию генов, ответственных за биосинтез дефицитных аминокислот. Согласно современным представлениям, роль фФГФф в регуляции выражения генов заключается в изменении скорости транскрипции этих генов. Определенный уровень фФГФф в клетках является необходимым условием транскрипции некоторых аминокислотных оперонов, причем концентрация этого нуклеотида резко возрастает в начальные моменты их дерепрессии (J. Stephens et al., 1975).

Первоначально было обнаружено, что от аллельного состояния гена *relA* зависит проявление ауксотрофности по треонину, обусловленной мутациями в структурных генах треонинового оперона. Так, штамм, у которого функция гена *thrB* частично нарушена в результате его мутации, становится полным ауксотрофом по треонину (время удвоения биомассы — более 720 мин) при введении мутантного аллеля гена *relA*. С другой стороны, замена мутантного гена *relA* его нормальным аллелем супрессирует проявление мутации в структурном гене треонинового оперона, что выражается в приобретении клетками способности к росту на среде без треонина (табл. 6).

Полученный результат можно объяснить следующим образом. В условиях голода по треонину в клетках *Rel*<sup>+</sup>-штамма повышается содержание фФГФф (см. гл. 1), стимулирующего транскрипцию треонинового оперона. При этом образуется значительное количество ферментов биосинтеза треонина, в том числе мутантного фермента — продукта гена *thrB* (гомосеринкиназы). В результате происходит увеличение скорости катализируемой им реакции и ауксотрофность частично преодолевается. В клетках *Rel*<sup>-</sup>, где фФГФф при аминокислотном голодании не образуется, стимуляция выражения треонинового оперона не происходит. Последующие опыты подтвердили эти предположения.

Зависимость выражения треонинового оперона от гена *relA* была установлена при сопоставлении активности гомосериндегидрогеназы I в *Rel*<sup>+</sup>- и *Rel*<sup>-</sup>-клетках при переносе их со среды, содержащей избыток треонина и изолейцина, на среду, не содержащую этих аминокислот (условия дерепрессии). Наличие мутации в гене *relA* приводит к практически полной потере способности клеток увеличивать синтез гомосериндегидрогеназы I в этих условиях, тогда как клетки *Rel*<sup>+</sup> интенсивно образуют этот фермент.

Чтобы убедиться в том, что уровни активности гомосериндегидрогеназы I отражают различия в интенсивности транскрипции треонинового оперона в *Rel*<sup>+</sup>- и *Rel*<sup>-</sup>-клетках, было определено изменение относительного содержания тре-мРНК в суммарном транскрипте. С началом дерепрессии гомосериндегидрогеназы I, когда в *Rel*<sup>+</sup>-клетках обнаруживается высокий уровень активности фермента, определяли долю тре-мРНК в суммарной РНК, синтезированной за 1 мин. Относительное содержание тре-мРНК измеряли после гибридизации меченой РНК с ДНК фага  $\lambda$ , в состав которой интегрированы структурные гены треонинового оперона (табл. 7). Доля тре-мРНК в *Rel*<sup>+</sup> и *Rel*<sup>-</sup> штаммах в условиях репрессии оперона одинакова. После удаления избытка треонина и изолейцина относительное содержание тре-мРНК возрастает лишь в *Rel*<sup>+</sup>-клетках, т. е. там, где ранее было об-

Т а б л и ц а 6. Влияние аллельного состояния гена *relA* на проявление ауксотрофности по треонину

Генотип	Время генерации на минимальной среде, мин	
	с треонином	без треонина
<i>thr B</i> <sub>1005</sub> <i>relA</i>	69	>720
<i>thrB</i> <sub>1005</sub> <i>relA</i> <sup>+</sup>	93	186

Таблица 7 Дифференциальная скорость синтеза тре-мРНК в Rel<sup>+</sup>- и Rel<sup>-</sup>-клетках *E. coli*

Условия роста	Содержание тре мРНК в суммарной РНК, синтезированной за 1 мин, %	
	штамм Rel <sup>+</sup>	штамм Rel <sup>-</sup>
Репрессия	0,18	0,21
Дерепрессия	0,43	0,22

наружено интенсивное накопление гомосериндегидрогеназы. В Rel<sup>-</sup>-клетках дерепрессия треонинового оперона не происходит.

Таким образом, в результате изучения роста неполных ауксотрофов по треонину и анализа дерепрессии треонинового оперона сделан вывод о позитивном контроле выражения треонинового оперона геном *rel A*.

В дальнейшем в опытах *in vitro* было показано, что ффГфф стимулирует синтез тре-мРНК на матрице ДНК фага  $\lambda$  *dthr*, содержащего структурные гены треонинового оперона.

Для промышленного получения аминокислот необходимы штаммы микроорганизмов, способные к синтезу больших количеств целевого продукта. Избыточное образование треонина клетками *E. coli* предотвращается в результате подавления синтеза ферментов, кодируемых треониновым опероном, а также ингибирования активности аспартокиназы I — гомосериндегидрогеназы I. Из приведенной схемы (рис. 35) видно, что для сверхсинтеза треонина следует прежде всего преодолеть барьеры негативной регуляции избытком этой аминокислоты. Обычный путь селекции заключается в мутагенезе и отборе штаммов, устойчивых к структурному аналогу конечного продукта пути биосинтеза. В данном случае использовали  $\alpha$ -амино- $\beta$ -оксивалериановую кислоту ( $\beta$ -оксинорвалин). Это вещество, так же как и треонин, взаимодействует с аллостерическим центром ферментного комплекса аспартокиназа I — гомосериндегидрогеназа I, но не может заменить треонин в других его функциях. Поэтому клетки в присутствии  $\beta$ -оксинорвалина становятся ауксотрофными по треонину и не растут на минимальной среде. В этих условиях образуют колонии только те мутанты, у которых сняты барьеры негативной регуляции. Среди таких мутантов один, обозначенный MG442, обладал наибольшей продуктивностью — он накапливал в культуральной жидкости до 3 г/л треонина (М. М. Гусятинер и др., 1978).

Генетическое и биохимическое изучение штамма MG442 показало, что он несет мутацию *thrA442* в гене *thrA*<sub>1</sub><sub>2</sub>, которая делает гомосериндегидрогеназу не чувствительной к ингибированию треонином. Кроме того, у него поврежден ген *ilvA* (мутация *ilvA442*), кодирующий треониндезаминазу — первый фермент на пути превращения треонина в изолейцин. Этот мутационный блок является неполным (*leaky*-мутация) и, очевидно, приводит к резкому снижению сродства треониндезаминазы к треонину.

Наконец, было установлено, что исходный родительский штамм *E. coli* K-12 (B-7), как и многие лабораторные штаммы,



нес мутацию *relA*, а штамм-продуцент MG442 имеет функционально активный аллель гена *relA*, который, очевидно, появился в результате реверсии или внутригенной супрессии исходной мутации при обработке мутагеном штамма B7.

Таким образом, продуцент треонина MG442 отличается от штамма B7 по крайней мере тремя мутациями. Чтобы оценить вклад мутаций *thrA442*, *ilvA442* и реверсии в гене *relA* в процесс сверхсинтеза треонина клетками *E. coli*, определяли содержание этой аминокислоты в клетках исходного штамма B7, продуцента треонина MG442 и его производных, сконструированных генетическими методами. Оказалось, что по сравнению с исходным штаммом B7 содержание треонина в клетках продуцента MG442 увеличено почти в 12 раз. Введение дикого аллеля гена *thrA<sub>1</sub>A<sub>2</sub>* в геном продуцента сильно снижает внутриклеточную концентрацию треонина.

Аналогичный результат наблюдается при устранении мутации *ilvA442*, вызывающей ауксотрофность по изолейцину. В этом случае значительное (более чем в четыре раза) снижение количества треонина в пуле свободных аминокислот может быть связано как с активным расходом треонина на синтез изолейцина, так и с репрессией треонинового оперона, в осуществлении которой участвует образующийся в клетке изолейцин.

Наконец, аллельное состояние гена *relA* также существенно влияет на внутриклеточную концентрацию треонина; содержание аминокислоты в клетках *Rel<sup>+</sup>*-штамма MG442 более чем в два раза превышает ее концентрацию в клетках *RelA<sup>-</sup>* — производного этого штамма. Однако указанное различие наблюдалось только на фоне мутации *ilvA442*, т. е. в условиях дефицита изолейцина, при котором, очевидно, стимулируется синтез ффГфф, осуществляемый продуктом гена *relA*.

Таким образом, высокое содержание свободного треонина в клетках штамма MG442, которое, по всей вероятности, отражает уровень синтеза этой аминокислоты, обусловлено одновременным присутствием в геноме мутаций *thrA442*, *ilvA442* и дикого аллеля гена *relA*. Проведенный генетический анализ продуцента треонина не только демонстрирует множественность мутаций, образующихся под влиянием нитрозогуанидина, но и эффективность отбора на устойчивость к аналогам.

Следует рассмотреть более подробно некоторые особенности фенотипического проявления мутации *ilvA442*. Как уже отмечалось, штамм MG442 является неполным ауксотрофом по изолейцину, что связано с мутацией в гене *ilvA*, контролирующем синтез треониндезаминазы. В табл. 8 приведены некоторые фенотипические свойства штамма MG442 и его производных и, в частности, способность этих штаммов к росту на минимальной среде без изолейцина. Видно, что замена мутации *thrA442* на дикий аллель гена *thrA*, ведущая к снижению содержания треонина в клетках, приводит к строгой ауксотрофности по изолейцину. После введения в геном штамма MG442 мутации *relA* клетки также утрачивают способность к росту на среде без изолейцина.

Таким образом, частичная супрессия мутации *ilvA442* в штамме MG442 является следствием как повышенного содержания в клетках предшественника изолейцина — треонина, так и присутствия в геноме дикого аллеля гена

Таблица 8. Некоторые фенотипические свойства штамма MG442 и его производных

Штамм	Генотип	Удельная активность треоиндезаминазы	Время генерации, мин, на минимальной среде	
			без изолейцина	с изолейцином
MG 442	thrA442 ilvA442relA <sup>+</sup>	0,46	321	78
VL 327	thrA442 ilvA442relA	0,23	>720	78
VL 330	thrA <sup>+</sup> ilvA442relA <sup>+</sup>	0,44	>720	69
VL 336	thrA <sup>+</sup> ilvA442relA	0,10	>720	78
VL 331	thrA442 ilvA <sup>+</sup> relA	34,3	87	87

relA, который определяет способность клеток синтезировать фФГФф при аминокислотном голоде. По-видимому, этот нуклеотид стимулирует синтез фермента, катализирующего дезаминирование треоина. Действительно, как видно из табл. 8, в клетках RelA<sup>+</sup>-штаммов MG442 и VL330 обнаруживается активность треоиндезаминазы, которая составляет приблизительно 1,3% соответствующей активности в клетках ilvA<sup>+</sup>-штамма VL331. Активность треоиндезаминазы в клетках RelA-штаммов VL327 и VL336 в этих условиях по крайней мере в два раза ниже (В. А. Лившиц и др., 1978).

Совокупность полученных данных можно объяснить следующим образом. В клетках Rel<sup>+</sup>-штаммов, несущих мутацию ilvA442, при голодании по изолейцину образуется фФГФф, который стимулирует выражение Ilv-оперона. Это приводит к синтезу и накоплению продукта гена ilvA-мутантной треоиндезаминазы, вероятно, имеющей пониженное сродство к субстрату. Если при этом в клетках повышено содержание треоина, аукомотрофность частично преодолевается.

В дополнительных опытах на прототрофных штаммах было найдено, что эффективность дерепрессии треоиндезаминазы в Rel<sup>+</sup>-клетках значительно выше, чем в Rel<sup>-</sup>-клетках. Этот результат показывает, что выражение Ilv-оперона позитивно контролируется геном relA.

Еще одно направление исследований, которое сыграло решающую роль в этой работе, связано с использованием методов генной инженерии и клонированием на гибридных плаزمиде генов треоинового оперона (Ю. И. Козлов и др., 1980). В этих опытах было установлено, что амплификация генов треоинового оперона дикого типа сопровождается многократным увеличением активности ферментов, кодируемых клонированными генами. Это, однако, не приводило к значительной сверхпродукции аминокислоты, что, по-видимому, связано с сохранением негативной регуляции активности ферментов. Поэтому было осуществлено клонирование и амплификация на гибридной плазмиде треоинового оперона, несущего мутацию thrA442 из штамма MG442. Это оказалось тем более целесообразным, что активность мутантной гомосериндегидрогеназы, не чувствительной к ретроингибированию треоином, снизилась почти в два раза и, очевидно, оставалась узким местом в пути биосинтеза. В результате проведенной работы на основе вектора pBR322 была получена гибридная плаزمида pYN7, которая на фрагменте хромосомы из штамма MG442, ограниченном сайтами рестрикции HindIII и BamHI, несла все гены треоинового оперона (рис. 36).

Следующим важным этапом работы был выбор и конструирование штамма-хозяина для плазмиды, или реципиентного штамма. Анализ литературных данных и эксперименты авторов позволили сформулировать следующие требования к реципиентному штамму (V. G. Debatov et al., 1981).

Во-первых, реципиентный штамм должен быть хорошо трансформируемым штаммом, генетическая структура которого позволяет легко отбирать трансформанты, несущие гибридную плазмиду с требуемыми генами. Для этого реципиентный штамм должен иметь мутацию на хромосоме, которая повреждает один из генов, клонированных на гибридной плазмиде. В случае клонирования треонинового оперона целесообразно введение в реципиентные клетки мутации *thr B* или *thr C*.

Во-вторых, генетическая структура реципиентного штамма должна обеспечивать высокий уровень сверхсинтеза данной аминокислоты. Для этого реципиентный штамм должен иметь мутации, которые нарушают репрессию соответствующих генов, например повреждающие ген-регулятор или блокирующие синтез кофакторов репрессии. В некоторых случаях необходимым условием сверхсинтеза аминокислоты является присутствие в геноме бактерий мутаций, блокирующих катаболизм и превращение заданной аминокислоты. Наконец, уровень сверхсинтеза может определяться изменением общих регуляторных систем клетки, например системы строгого контроля биосинтеза аминокислот.

В-третьих, реципиентный штамм должен иметь мутации, которые поддерживают стабильное сохранение клеток с гибридной плазмидой в условиях ферментации. Выщепление гибридных плазмид — это нередкое явление, и так как бесплазмидные штаммы обычно характеризуются большей скоростью роста, то они накапливаются в популяции. Для стабилизации клеток бактерий, несущих гибридные плазмиды, которые обеспечивают синтез большого количества аминокислоты, реципиентный штамм должен нести мутацию, частично блокирующую смежный этап метаболизма этой аминокислоты. При этом блок смежного, например последующего, этапа метаболизма аминокислоты должен компенсироваться высокими концентрациями заданной аминокислоты.

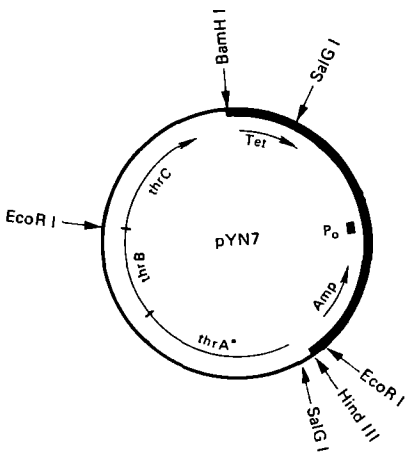


Рис. 36. Карта плазмиды pYN7, несущей гены треонинового оперона с мутантным геном *thrA*.

Толстой линией показана векторная часть, на которой расположены гены устойчивости к ампициллину (*Amp*), тетрациклину (*Tet*) и участок, ответственный за репликацию плазмиды ( $P_o$ ); тонкой линией показан клонированный фрагмент хромосомы с генами треонинового оперона; *thrA\** — мутантный ген, несущий мутацию *thrA442*.

Таким образом, благодаря такой мутации клетки реципиентного штамма, содержащие гибридную плазмиду, которая обеспечивает повышенный синтез этой аминокислоты, будут иметь селективное преимущество перед клетками, утратившими плазмиду. Это обеспечивает стабильное развитие популяции клеток, несущих указанную плазмиду и продуцирующих аминокислоту.

Перечисленным требованиям в значительной степени отвечает сконструированный с помощью трансдукций штамм VL 334, имеющий генотип  $thg_{C_{1010}} ilvA442 geIA^+$  (В. А. Лившиц и др., 1978). Он является двойным ауксотрофом и нуждается для роста в треонине и изолейцине. После трансформации плазмидой, несущей треониновый оперон, штамм становится прототрофным по треонину. Если при этом происходит сверхсинтез треонина, частично супрессируется и ауксотрофность по изолейцину, т. е. клетки приобретают способность к росту на минимальной среде без добавок аминокислот. Частичный блок превращения треонина в изолейцин создает условия дерепрессии треонинового оперона и способствует накоплению треонина в клетках с последующей экскрецией его в среду. При этом клетки, несущие гибридную плазмиду, обеспечивающую высокий уровень синтеза треонина, имеют на минимальной среде селективное преимущество перед клетками, утратившими плазмиды.

Таким образом, определены условия, в которых селективным признаком является способность к сверхсинтезу метаболита.

Полученный штамм VL 334 (pYN7) накапливал в КЖ до 20 г/л треонина, что почти в два раза превышало лучшие достижения того времени (V. G. Debatov et al., 1981). В дальнейшем этот штамм был значительно усовершенствован. Прежде всего был отобран вариант, обозначенный М-1, который отличался повышенной способностью к синтезу треонина и вследствие этого большей стабильностью (V. G. Debatov et al., 1982). Отличительная черта штамма М-1 — слизистый характер колоний. Некоторые данные указывают на то, что этот штамм имеет повреждение в гене  $lop$ , что может стабилизировать мутантную аспартокиназу I — гомосериндегидрогеназу I, а также другие ферменты, обеспечивающие сверхсинтез треонина. Кроме того, были получены мутации, которые, по-видимому, активировали процесс аминирования, т. е. усвоения неорганического аммония.

Однако штамм VL334 (pYN7), как и другие штаммы *E. coli* К-12, растет только на средах с глюкозой или фруктозой и не усваивает сахарозу и такой доступный и дешевый субстрат, как меласса. Поэтому с помощью конъюгации в штамм VL334 (pYN7) были внесены расположенные на плазмиде гены, контролируемые способность к усвоению сахарозы. В дальнейшем было установлено, что детерминанты усвоения сахарозы локализируются на транспозоне, обозначенном Tn2555 (В. Г. Дорошенко, В. А. Лившиц, 1987), и проведена его интеграция в хромосому реципиента.

Последующая оптимизация условий ферментации (А. К. Со-

колов и сотр.) привела к созданию рекордного процесса биосинтеза *L*-треонина, при котором за 30—40 ч ферментации накапливается до 70 г/л треонина с конверсией сахара в целевой продукт, превышающий 40 %.

Из рис. 35 видно, что гомосерин является предшественником треонина и метионина. Это соединение находит применение в фармацевтической промышленности, а также в производстве лизина микробиологическим синтезом. Дело в том, что промышленные продуценты лизина — это штаммы коринебактерий, ауксотрофные по гомосерину.

Для получения штамма-сверхпродуцента гомосерина требуется активная работа только гена  $\text{thrA}_1\text{A}_2$ , а последующее превращение гомосерина в треонин должно быть блокировано. Поэтому гибридная плазида, несущая весь треониновый оперон, была подвергнута интенсивному мутагенезу *in vitro* гидроксиламином. После трансформации штамма *E. coli*, несущего мутацию в гене  $\text{thrG}$ , были отобраны клетки, продуцирующие гомосерин в большом количестве. Это пример эффективности «локализованного мутагенеза», когда гены-мишени сначала клонируются на гибридных плазидах, а затем плазмидная ДНК обрабатывается мутагеном *in vitro*.

Другой пример успешного использования методологии генной инженерии для создания промышленного продуцента первичного метаболита — это конструирование продуцента витамина  $\text{B}_2$  (рибофлавина) на базе *Bac. subtilis*. Сложность этой задачи заключается прежде всего в том, что методы генной инженерии и генетики для бацилл не так хорошо разработаны, как для *E. coli*. А. И. Степановым с сотр. (1980—1984) было установлено, что для успешной трансформации бацилл мономерной формой плазмидной ДНК необходимо, чтобы в состав плазмид входили инвертированные или прямые повторы. В результате был сконструирован удачный вектор с инвертированными повторами — плазида рМХ30 (см. рис. 33). Эта плазида способна трансформировать клетки *Bac. subtilis* в мономерной форме, включать в свой состав крупные фрагменты ДНК и стабильно поддерживаться в клетках бактерий без специальных селективных приемов. Семь генов, ответственных за биосинтез рибофлавина, сгруппированы у *Bac. subtilis* в одном участке ДНК размером 6,3 кД. Мутации, дерепрессирующие активность рибофлавинового оперона, были получены путем селекции штаммов, устойчивых к аналогам рибофлавина. Клонирование мутантного рибофлавинового оперона на плазмиде, которая является производной рМХ30, с последующей селекцией привело к созданию штамма *Bac. subtilis*, способного за 25—35 ч ферментации при 37 °С в условиях аэрации получать в культуральной жидкости 3,5—4,5 г/л витамина  $\text{B}_2$ . В качестве источника углерода используется сахароза (или меласса).

Надо отметить, что в СССР существует промышленное микробиологическое производство рибофлавина, который добавляется

в корма сельскохозяйственных животных. Это производство основано на культивировании гриба *Eremothecium ashbyi*. Однако время ферментации составляет более 70 ч, а выход целевого продукта не превышает 2 г/л. Таким образом, применение нового штамма *Bac. subtilis* позволит поднять продуктивность заводов без дополнительных капитальных затрат.

Приведенные примеры показывают, что успехи в конструировании высокопродуктивных штаммов зависят от совместной работы коллективов молекулярных биологов, генетиков, биохимиков, селекционеров и генных инженеров.

## § 2. Конструирование штаммов — продуцентов интерферонов человека

**Интерфероны** — группа белков, обладающих рядом общих биологических свойств, главным из которых является способность при контакте с клетками вызывать в них устойчивость к вирусной инфекции. Интерфероны позвоночных и в том числе человека разделяют на три группы:  $\alpha$ -, или лейкоцитарные,  $\beta$ -, или фибробластные, и  $\gamma$ -, или иммунные. Эти группы интерферонов различаются структурой молекул, рядом биологических свойств и типом клеток, которые их продуцируют в организме.

В конце 70-х годов стала очевидной потенциальная значимость интерферонов для медицины. Проблема получения больших количеств препарата не могла быть решена традиционными методами вследствие ограниченности ресурсов донорской крови, из которой получают интерферон. Это исключало широкое применение его в медицинской практике. Таким образом, возникла практическая необходимость получения интерферона с помощью микробного синтеза.

Опыты по переносу генов интерферонов человека в бактериальные клетки были начаты в конце 1977 — начале 1978 г. почти одновременно в трех научно-исследовательских группах: в Институте молекулярной биологии I Цюрихского университета под руководством Ч. Вейсмана, в отделе биохимии Института по исследованию рака в Токио под руководством Т. Танигучи, в США — фирмой «Genentech» под руководством Дж. Геддела.

Задача оказалась достаточно сложной. К началу исследований отсутствовали данные о структуре белка, что исключало возможность использования как синтетического гена, так и синтетических олигонуклеотидных зондов для скрининга гибридных клонов. Кроме того, было известно, что при максимальной индукции клеток доля интерфероновой мРНК в общем пуле поли(А)-мРНК\* весьма мала. Это предопределило очень большой объем работ по скринингу гибридных клонов.

Обстоятельствами, облегчающими клонирование, явились высокая удельная активность интерферонов и то, что к тому времени был разработан способ трансляции интерфероновой мРНК с получением биологически активного интерферона в системе ооцитов *Xenopus laevis* (африканской зеленой лягушки). С помощью этого теста можно определить присутствие интерферона при инъекции около 50 нг суммарной поли(А)-мРНК из индуцированных клеток.

Все три группы исследователей использовали для клонирования метод обратной транскрипции мРНК интерферонов (рис. 37). Первыми добились результатов японские исследователи, сообщившие в конце 1979 г. об успешном клонировании

---

Поли(А)-мРНК — информационная аденилированная РНК.

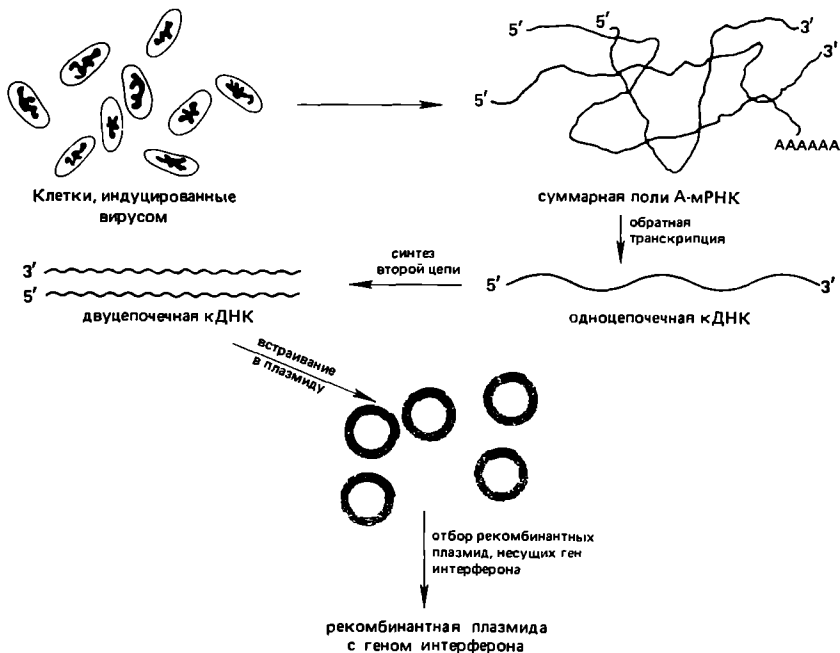


Рис. 37. Схема клонирования генов интерферонов человека

гена фибробластного интерферона в составе гибридной плазмиды в клетках *E. coli* (Т. Taniguchi et al., 1979). Вставка (около 800 п.о.) была внедрена в EcoRI-сайт плазмиды pBR322. Плаزمида получила название TrIF 319-3 и, как оказалось в дальнейшем, содержала полный структурный ген  $\beta$ -интерферона IFN- $\beta$ . Определение нуклеотидной последовательности вставки показало, что внутри открытой рамки считывания кодируется полипептид размером в 187 аминокислот, представляющий собой преинтерферон. В процессе секреции преинтерферона из клетки отщепляется сигнальный пептид, состоящий из 21 аминокислоты, зрелый интерферон содержит 166 аминокислот.

Для клонирования гена лейкоцитарного интерферона человека Ч. Вейсман использовал как исходный материал фракцию 12S поли(А)мРНК, полученную из клеток лейкоцитов, индуцированных вирусом Сендай\*. Из  $10^{11}$  лейкоцитов удалось получить 40 мкг 12S мРНК и соответственно 10 мкг комплементарной ей ДНК (кДНК). Двуспиральную ДНК, полученную с хорошим выходом (8 мкг), фракционировали центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, после чего отбирали фракцию, содержащую ДНК, по размерам большую 600 пар нуклеотидов (3,8 мкг). Полученная двуспиральная ДНК была снабжена олиго-dG-концами и отождествлена с ДНК плазмиды pBR322, расщепленной рестриктазой PstI и содержащей олиго-dC-концы. Напомним, что плазмиды pBR322 несет в своем составе гены, определяющие устойчивость к двум антибиотикам: тетрациклину и ампициллину. Вставка по PstI-сайту инактивирует ген, ответственный за устойчивость к ампициллину, поэтому первичный отбор клеток, получивших гибридные плазмиды, шел по устойчивости к тетрациклину. Эффективность трансформации *E. coli* HB101 гибридными плазмидами в опытах Вейсмана составляла  $3 \cdot 10^4$  тетрациклиноустойчивых клеток на 1 мкг ДНК. Для отбора нужных клонов использовали следующий метод: смесь нескольких плазмид из разных клонов, одна

\* Гены  $\alpha$ -интерферонов могут быть прямо извлечены из генома человека, так как они не содержат интронов.

из которых может содержать кДНК интерферона, денатурируют и связывают с твердой подложкой. С этой ДНК гибридизируют образцы РНК, полученные из продуцирующих интерферон клеток человека (если ДНК на фильтре содержит кДНК интерферона, то мРНК интерферона будет задержана на фильтре), фильтры промывают, элюируют РНК в денатурирующих условиях и элюат инъецируют в овоциты *Xenopus laevis* для выявления мРНК интерферона.

После этой процедуры отбирали группы по 512 клонов с положительным ответом и делили на 8 подгрупп по 64 клон, среди которых отыскивали подгруппу с положительным ответом и т. д., т. е. применяли метод, называемый *клонированием субкультур*. Таким путем получен клон, названный Hif-4с, который содержал вставку в 320 п. о. и прекрасно гибридизировался с мРНК интерферона. Однако вставка была заведомо меньше размеров полного гена и в дальнейшем ее использовали как зонд для поиска других клонов. Для этого PstI-фрагмент Hif-4с, меченный <sup>32</sup>P, гибридизовали *in situ* с набором клонов. Среди гибридизирующихся клонов выбран один, названный Hif-2h, имеющий вставку в 910 п. о.

Клетки *E. coli*, содержащие гибридные плазмиды, несущие такую вставку, способны синтезировать полипептид с биологической активностью интерферона. Эта активность нейтрализуется антисывороткой к человеческому лейкоцитарному интерферону. Выход антивирусной активности в экстрактах клеток составил 10—1000 ед/мл ( $10^4$ — $10^6$  ед/л), т. е. меньше одной молекулы на клетку, но сам факт синтеза активного полипептида был качественным шагом вперед.

Учитывая, что фрагмент не подстраивался специально под сайты инициации трансляции и что активность была приблизительно одинаковой при использовании трех видов векторов, отличающихся рамкой считывания, авторы пришли к выводу, что активные молекулы возникают как редкое событие в результате неправильной инициации. Вероятно, при сплавлении GC-коннекторов с кДНК возникают структуры, имитирующие сайт инициации трансляции. Экспрессия возникшего интерферона в опытах Вейсмана несомненно объясняется элементом удачи в его целенаправленной и сложной работе.

Вскоре была определена нуклеотидная последовательность вставки клона Hif-2h и на его основании аминокислотная последовательность, кодируемая внутри открытой рамки считывания. Эта последовательность содержала 189 аминокислот. К тому моменту стала известна первичная структура N-концевого участка одного из лейкоцитарных интерферонов человека, выявленная путем анализа высокоочищенного белка. Из сравнения аминокислотных последовательностей стало ясно, что первая аминокислота зрелого интерферона соответствует 24-му кодону клонированной последовательности, т. е. интерферон Hif-2h (названный интерфероном  $\alpha 1$ ) синтезируется в виде предшественника и при созревании и секреции из клеток отщепляет сигнальную последовательность длиной в 23 аминокислоты. Сам зрелый интерферон  $\alpha 1$  содержит 166 аминокислотных остатков. Далее оказалось, что существует различие в пяти аминокислотных остатках из 20 между N-концевой последовательностью интерферона  $\alpha 1$  и последовательностью лейкоцитарного интерферона, которую определили путем анализа из фракций высокоочищенного белка. Вскоре Вейсман с сотрудниками клонировали еще один ген лейкоцитарного интерферона (названный интерфероном  $\alpha 2$ , или  $\alpha A$ ) и определили его нуклеотидную последовательность. Соответствующая ей аминокислотная последовательность содержала 165 аминокислот и была сходна, но не идентична последовательности интерферона  $\alpha 1$ . Из этих результатов стало ясно, что имеется по крайней мере три разных лейкоцитарных  $\alpha$ -интерферона.

В настоящее время известно около 20 различных лейкоцитарных  $\alpha$ -интерферонов.

Ген иммунного, или  $\gamma$ -интерферона, клонирован в *E. coli* методом обратной транскрипции только в 1982 г. Зрелый  $\gamma$ -интерферон содержит 146 аминокислотных остатков и синтезируется в клетке в виде полипептида из 166 аминокислот с гидрофобной сигнальной последовательностью размером в 20 аминокислот (P. Gray et al., 1982).

Первые работы по клонированию генов интерферона были повторены и развиты как названными выше авторами, так и другими группами исследователей во многих странах. В СССР первое успешное клонирование гена лейкоцитарного интерферона описано в 1982 г. (Ю. А. Овчинников и др.), а фибробластного — в 1983 г. (Ю. И. Козлов и др.), иммунного — в 1985 г. (Е. Д. Свердлов и др.)



**Экспрессия генов интерферонов в клетках *E. coli*.** Для получения больших количеств гомогенных препаратов интерферона, необходимых как для широкого клинического использования, так и для исследовательских целей, предприняты многочисленные и успешные попытки создания штаммов-продуцентов на базе различных микроорганизмов. Наиболее обстоятельные работы осуществлены на *E. coli*, что связано с систематической разработкой методологии генетической инженерии на основе этого вида бактерий.

Экспрессия любого эукариотического гена с целью получения нативного белка требует использования структурной части гена в сочетании с соответствующими нуклеотидными последовательностями, которые распознаются ферментами клетки-хозяина как эффективные сигналы инициации транскрипции, трансляции, терминации трансляции и, возможно, терминации транскрипции. Сконструированный нужным образом гибридный ген, содержащий регуляторную область бактериального происхождения и структурную область гена человеческого интерферона, встраивают в плазмиды, способные автономно реплицироваться и стабильно поддерживаться в процессе роста микроорганизмов (рис. 38).

Для экспрессии генов интерферонов в клетках *E. coli* широко применяют регуляторные элементы триптофанового (*trp*) и лактозного (*lac*) оперонов.

Экспрессирующий элемент триптофанового оперона состоит из 222 п. о. Промотор имеет рамку Прибнова за 7 п. о. и «-35» — последовательности за 26 п. о. от старта мРНК. Активность оперона регулируется концентрацией триптофана в клетке. При повышении концентрации триптофана транскрипция блокируется присоединением репрессора к оператору, локализованному в области промотора. Другой механизм регуляции — это терминация транскрипции на участке аттенуатора, который расположен на расстоянии 140 п. о. от стартовой точки мРНК. Его функционирование связано с синтезом лидерного пептида, состоящего из 14 аминокислотных остатков (см. рис. 4). Максимальная активность экспрессирующего элемента наблюдается при росте культуры в отсутствие триптофана в среде или в присутствии конкурентных ингибиторов типа индолил-акриловой кислоты.

Одной из первых работ по созданию штамма *E. coli*-продуцента интерферона является работа Д. Геддела и др.

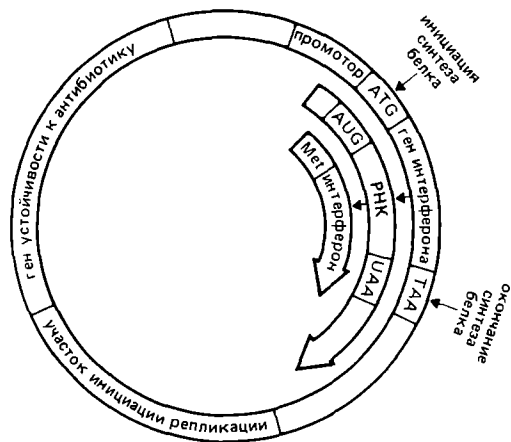


Рис. 38. Общая схема рекомбинантных плазмид, определяющих синтез интерферонов человека в *E. coli*

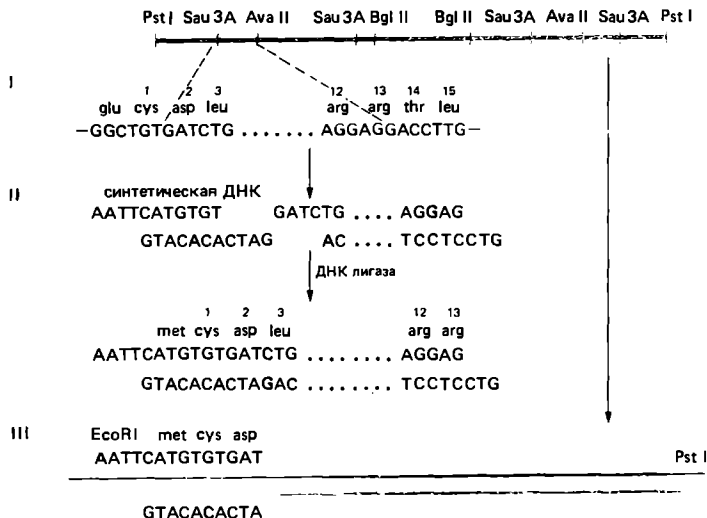


Рис. 39. Конструирование гена *met-α2*-интерферона:

*I* — выделение фрагмента размером 34 п. о. путем частичного расщепления *Pst*I-фрагмента (1000 п. о.) рестриктазами *Ava*II и *Sau*3A; *II* — добавление синтетического линкера с восстановлением кодона для цистеина и введением кодона инициации ATG; *III* — объединение с основной последовательностью структурного гена интерферона

(D. Goeddel et al., 1980), осуществивших синтез лейкоцитарного интерферона  $\alpha A$  ( $\alpha 2$ ) под контролем *trp*-промотора. Ген интерферона был реконструирован следующим образом (рис. 39). Сначала из *Pst*I-фрагмента днк ДНК (1000 п. о.), содержащего структурный ген интерферона  $\alpha A$  ( $\alpha 2$ ), под действием рестриктаз *Sau*3A и *Ava*II был выделен фрагмент (*Sau*3A—*Ava*II), размером 34 п. о. Расщепление рестриктазой *Sau*3A приводит к удалению сигнальной последовательности преинтерферона, а также кодона для первой аминокислоты зрелого белка — цистеина. Лигирование с соответствующим синтетическим олигонуклеотидом приводит к образованию «липкого конца» для рестриктазы *Eco*RI, вводит в конструкцию кодон инициации трансляции ATG и восстанавливает утерянный кодон цистеина. Далее конструкция объединяется с фрагментами, несущими последовательности структурного гена интерферона (рис. 39). Для экспрессии созданной структуры ее соединяют с модифицированной регуляторной областью *trp*-оперона, в которой сохранены промотор и SD-последовательность лидерного пептида и которая прервана за четыре нуклеотида до ATG-кодона. Объединенную конструкцию включают в плазмидный вектор, созданный на основе многокопийной плазмиды. После трансформации клеток *E. coli* в них синтезируется зрелый интерферон с лишним метионином на  $NH_2$ -конце (*met*-IFN) вследствие образования гибридного сайта связывания с рибосомами. В этом

гибридном сайте расстояние между триптофановой SD-последовательностью и интерфероновым кодоном инициации ATG составляет 11 нуклеотидов. При росте клеток в отсутствие триптофана выход интерферона  $\alpha A$  ( $\alpha 2$ ) составляет  $2,5 \cdot 10^8$  ед/л. Аналогичный подход использован для экспрессии других лейкоцитарных интерферонов и гибридных лейкоцитарных интерферонов.

Таблица 9. Выход фибробластного интерферона при использовании различных промоторов\*

Промотор	Выход	
	ед/л	молекул на клетку
tuf В**	$1,0 \cdot 10^3$	0,3
lac UV5	$1,5 \cdot 10^6$	500
lac UV5(двойной)	$5,7 \cdot 10^6$	2100
trp	$2,0 \cdot 10^6$	750
P <sub>l</sub>	$6,0 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^6$

\* Удельную активность  $\beta$ -интерферона принимали равной  $10^8$  ед/М, молекулярную массу — 18000 Д, титр —  $10^9$  кл/мл.

\*\* Промотор фактора элонгации Tu.

Для максимизации экспрессии существенным является соблюдение оптимального расстояния между SD-сайтом и иницирующим кодоном. Показано, что расстояние в 9 п. о. оптимально при экспрессии лейкоцитарного  $\alpha A$  ( $\alpha 2$ ) и фибробластного  $\beta$  интерферонов. Выход резко меняется при изменении расстояния. Так, для  $\beta$ -интерферона выход составляет (%): 0,4 при расстоянии 2 п. о., 50 при 8, 1,6 при 15 п. о. (оптимум 100% — 9 п. о.). Вероятно, эти различия связаны с образованием вторичной структуры РНК («шпильки») и, следовательно, зависят от последовательностей клонированного гена, окружения SD-сайта и состава кодонов между SD и ATG. Таким образом, структура сайта связывания с рибосомами должна оптимизироваться для каждого нового гена индивидуально. В целом вариации структуры сайта связывания с рибосомами могут дать изменение экспрессии приблизительно в 10 раз.

Гораздо более сильные изменения уровня синтеза наблюдаются при использовании различных промоторов. В этом случае выход может изменяться на три-четыре порядка. Так, синтез интерферона  $\alpha F$  ( $\alpha 3$ ) под контролем lacUV5 промотора\* составил  $10^5$  ед/л культуры, а под контролем trp-промотора —  $10^7$ — $10^8$  ед/л. Тандемное расположение промоторов обычно увеличивает выход. Тандемная дупликация промотора lacUV5 привела к увеличению продукции интерферона до  $10^6$  ед/л (Ю. А. Овчинников и др., 1982).

Аналогичные данные были получены и для фибробластного  $\beta$ -интерферона (табл. 9). Эти результаты относятся к векторам, созданным на базе плазмид с ColE1-репликоном. Переход к более многокопийным векторам может существенно повысить выход. Так, репликативная форма нитевидного фага M13 существует в клетках *E. coli* в количестве 200—300 копий, что приблизительно в 10 раз превышает копийность плазмид типа pBR322. Введение в такой фаг гибридного гена интерферона  $\alpha 2$ , кодирующего кроме интерферона 19 дополнительных аминокислот на N-конце (11 аминокислот из  $\beta$ -галактозидазы и 8 аминокислот сигнальной последовательности интерферона  $\alpha 2$ ), под контролем lac-промотора привело к хорошим результатам. Средний выход при индукции клеток добавлением в среду ИПТГ был равен  $1,5 \cdot 10^6$  ед/л, что сравнимо с экспрессией под контролем trp-промотора с использованием плазмид типа pBR322 (P Slocombe et al., 1982).

Наилучшие результаты, связанные с экспрессией гена фибробластного интерферона, приведены в работе Е. Ремо и др.

\* lac UV5-промотор — мутантный промотор lac-оперона, активно функционирующий в отсутствие комплекса цАМФ--БАК.

(E. Remaut et al., 1983). Авторы использовали фрагмент ДНК, кодирующий зрелый интерферон  $\beta$ , соединенный с гибридной экспрессирующей областью, содержащей левый промотор фага  $\lambda$ -P<sub>1</sub> и участок связывания рибосом гена репликазы фага MS2. Объединенная конструкция была встроена в плазмиду ColE1-типа, и последняя введена путем трансформации в штаммы *E. coli*, несущие в геноме дефектный профаг с ts-репрессором  $\lambda$ . Таким образом получена регулируемая система. При 28°C, когда репрессор функционирует, синтез интерферона не происходит, культура накапливает биомассу. Через 3 ч после индукции при 42°C количество  $\beta$ -интерферона составляет 2% от суммарного белка (около 10<sup>6</sup> молекул на клетку). Принцип применения регулируемых промоторов может оказаться очень полезным во многих других случаях.

**Влияние на продукцию интерферонов генотипа клетки-хозяина.** Выше шла речь о значении для эффективного выражения гена структуры экспрессирующей последовательности. Не следует забывать, что экспрессия осуществляется в живой клетке и особенности хозяина, его генотип и физиологическое состояние могут решающим образом сказаться на накоплении целевого белка. К сожалению, систематические исследования о влиянии генотипа хозяйской клетки на продукцию интерферона пока не проведены.

Учитывая общие особенности биосинтеза белка в прокариотической клетке и то, что эукариотический белок и его мРНК чужеродны для бактерий, для оптимизации биосинтеза интерферонов в таких системах представляются весьма существенными два фактора: стабильность (отсутствие протеолиза) конечного белка и стабильность мРНК. Так, изучение деградации  $\beta$ -интерферона в клетках *E. coli* показало, что она вызвана протеолизом. Как уже упоминалось, протеолитическое разрушение эукариотических белков в бактериальной клетке осуществляется при участии АТФ-зависимой протеиназы La, кодируемой геном *lon*, которая вовлечена и в деградацию аномальных мутантных белков клетки хозяина. Следовательно, мутации в *lon*-гене или другое подавление активности указанной протеиназы могли бы увеличить стабильность эукариотических белков в бактериальной клетке.

Действительно, содержание  $\beta$ -интерферона в клетках *Lon*-мутанта увеличилось по крайней мере в два раза (E. Remaut et al., 1983) по сравнению со штаммами дикого типа (*Lon*<sup>+</sup>).

Известно, что деградация аномальных белков замедляется в клетках *E. coli*, инфицированных фагом T4, что связано с активностью продукта фагового гена *pin* (proteolysis inhibition), являющегося ингибитором протеиназы La. Введение в клетки *E. coli* многокопийной плазмиды pBR325, несущей ген *pin* фага T4, приводит к значительной стабилизации неполных белков (пурмициновых фрагментов) и некоторых мутантных белков фага  $\lambda$  (L. Simon, et. al., 1983). Выход зрелого  $\beta$ -интерферона человека,

контролируемого *lac*-промотором, возрастал в клетках *E. coli*, несущих гибридную плазмиду с *pin*-геном, в четыре раза (от  $1,5 \times 10^5$  до  $6 \cdot 10^5$  ед/л).

Установлено, что экспрессия эукариотического гена *qa2* (катаболическая дегидроквириназа *Neurospora crassa*) резко возрастает в клетках *E. coli*, несущих мутации по РНКазе I (гпа) и полинуклеотидфосфорилазе (рпр). Увеличение выхода продукта указанного гена связано со стабилизацией соответствующей мРНК. Сходные результаты, подтверждающие общность явления, получены при экспрессии гена *HIS3* дрожжей *Sacchar cerevisiae*, кодирующего D-эритроимидазоглицеролфосфатгидролазу. В последнем случае время полужизни мРНК возрастало, а выход белка — продукта гена *HIS3*, как уже отмечалось, увеличивался в 4,5 раза. Примерно такие же эффекты наблюдались при изучении влияния мутации *rpr* на биосинтез лейкоцитарного интерферона в клетках *E. coli* (Р. С. Шакулов, 1986).

Следует отметить, что, несмотря на большие успехи в создании штаммов *E. coli*, синтезирующих интерфероны различных типов, данный микроорганизм не является идеальным промышленным продуцентом белков и полипептидов медицинского назначения. Основными недостатками *E. coli* с этой точки зрения являются отсутствие опыта крупномасштабного культивирования в промышленности, наличие большого числа вирулентных для *E. coli* фагов, неспособность выделять белки в среду культивирования, наличие пирогенных веществ в оболочке клеток, что может осложнять очистку веществ, используемых в медицинских целях. В связи с этим во многих странах мира проведены работы по поиску более приемлемого микроорганизма-реципента.

**Экспрессия генов интерферонов в грамотрицательных бактериях.** В качестве хозяина для экспрессии синтетического гена интерферона  $\alpha 1$  использовали облигатный метилотроф *Methylophilus methylotrophus*; в качестве вектора — плазмиду широкого круга хозяев *pGSS15*, способную реплицироваться в *E. coli* и *M. methylotrophus*. Синтез интерферона  $\alpha 1$  осуществлен под контролем *lacUV5*-промотора. Интересно отметить, что после переноса гибридной плазмиды из *E. coli* в метилотроф выход интерферона увеличился приблизительно в два раза.

Аналогичное явление наблюдалось в работе, которая была выполнена в 1984 г. во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов с интерфероном  $\alpha 2$  ( $\alpha A$ ). Конструкция для экспрессии интерферона была встроена в вектор, созданный на основе плазмиды *RSF1010*. Полученная гибридная плазида путем мобилизации конъюгативной плазмидой *R751* переносилась в десятки штаммов различных грамотрицательных бактерий, относящихся к родам *Methylomonas*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Rhizobium* и др. Обнаружено, что в штамме *Pseudomonas sp.* содержание интерферона было в 100 раз большим, чем в исходном штамме *E. coli* K12. Это в десятки

тысяч раз превышает уровень интерферона, который можно индуцировать в крови человека.

Именно этот штамм положен в основу промышленного получения человеческого интерферона в СССР

Причины такого повышения активности не всегда ясны. Возможно, в новом хозяине повышается стабильность белка или мРНК или сигналы инициации транскрипции и (или) трансляции используются более эффективно. Не исключено также, что весь эффект связан с увеличением копияности плазмид в новом хозяине.

**Экспрессия в бациллах.** В гл. 3 упоминалось о способности бацилл секретировать в среду культивирования большое количество некоторых ферментов. Напомним, что экзоферменты синтезируются в виде предшественников, имеющих на  $\text{NH}_2$ -конце сигнальную последовательность, которая обеспечивает прохождение белка через цитоплазматическую мембрану клетки и отделяется от зрелого белка в ходе специфического протеолитического расщепления (процессинга).

Заманчивой представляется идея присоединения эукариотического структурного гена сразу за генетическим эквивалентом сигнальной последовательности экзофермента, синтезирующего с высокой эффективностью. В случае процессинга можно ожидать выделения в среду зрелого эукариотического белка в большом количестве. Такая система имеет ряд преимуществ: облегчается очистка целевого белка, так как состав секретируемых белков несравненно проще состава внутриклеточных протеинов; выделяющийся из клетки белок оказывает значительно меньшее влияние на метаболизм клетки, что облегчает его сверхпродукцию.

Следует отметить, что до настоящего времени работы в этом направлении не завершились созданием высокоэффективной системы биосинтеза интерферонов или других белков. Это, в частности, связано с нестабильностью многих векторных плазмид *Bac. subtilis*, что обусловлено дефектностью *par*-функции.

С. Чанг и другие (1982) попытались создать конструкцию, включающую регуляторную область, кодирующую сигнальную последовательность пенициллазы *Bac. licheniformis* (*penP*) и зрелый  $\alpha$ -интерферон. Такая конструкция была создана, но по непонятным причинам экспрессия и секрета оказались намного ниже ожидаемого уровня (около  $10^4$  ед. интерферона в 1 л при высокой оптической плотности клеток, и только 10% этого количества выделялось в среду).

Наиболее впечатляющие результаты получены финским исследователем И. Палва и его группой (1981—1982). С помощью плазмиды pUB110 в *Bac. subtilis* клонирован ген  $\alpha$ -амилазы *Bac. amyloliquefaciens*. Число копий гибридной плазмиды составляло приблизительно 50 на клетку, а выход  $\alpha$ -амилазы в среду — около 1,5 г/л. Определена первичная структура промотора, сигнальной последовательности, а затем и всего гена. Были

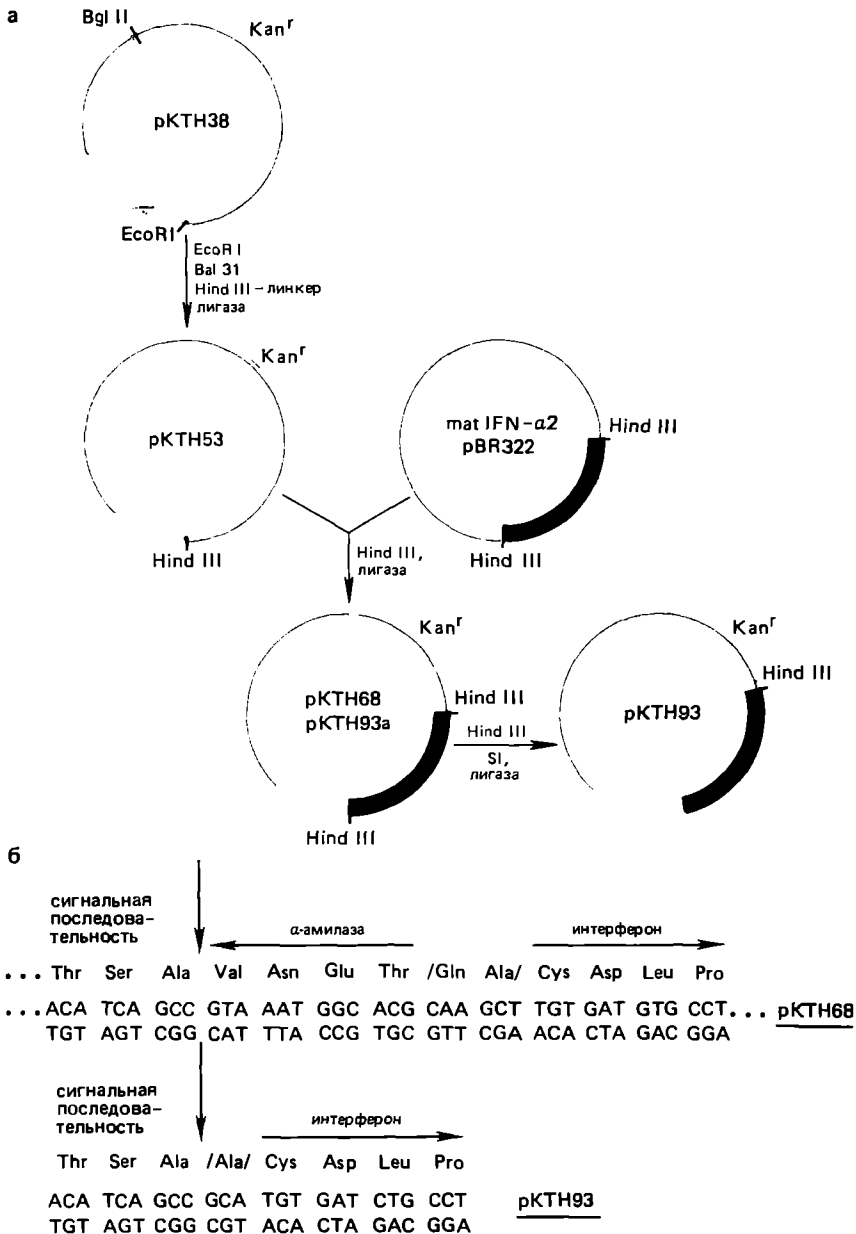


Рис. 40. Конструирование плазмид на основе регуляторных элементов α-амилазы для экспрессии и секреции интерферона α2 из клеток *Bac. subtilis*:

*а* — конструирование плазмид; *б* — нуклеотидная и аминокислотная последовательности, соответствующие месту стыка генетического эквивалента сигнальной последовательности α-амилазы и гена зрелого интерферона в плазидах pKTH68 и pKTH93; стрелками обозначены места отщепления сигнальной последовательности

сконструированы специальные экспрессирующие и секретирующие векторные плазмиды, содержащие регуляторные участки, сигнальную последовательность  $\alpha$ -амилазы (31 аминокислота) и  $\text{NH}_2$ -концевую часть структурного гена. Одна из таких плазмид рКТН38 изображена на рис. 40.

Плазида несет ген, обеспечивающий устойчивость к канамицину (Kan<sup>r</sup>) из плазмиды рUB110, содержит промотор, сайт связывания с рибосомами и 61 кодон пре- $\alpha$ -амилазы, вслед за которыми вставлен EcoRI-линкер. Расщепление плазмиды по EcoRI-сайту и отщепление лишних нуклеотидов нуклеазой Bal31 с последующим присоединением Hind III-линкера и лигированием привело к созданию плазмиды рКТН53. Ген зрелого интерферона  $\alpha 2$  (IFN- $\alpha 2$ ) получен из плазмиды matIFN $\alpha 2$  выщеплением из нее HindIII-фрагмента. Вставка по HindIII-сайту интерферонового фрагмента дает готовые конструкции рКТН68 и рКТН93а. Последняя плазида была расщеплена рестриктазой HindIII, обработана нуклеазой S1 и лигирована по тупым концам, что привело к образованию плазмиды рКТН93. Обе плазмиды, рКТН93 и рКТН68, кодируют лишние аминокислоты между сигнальной последовательностью и зрелым интерфероном.

Плазида рКТН68 кодирует вслед за сигнальной последовательностью первые четыре аминокислоты  $\alpha$ -амилазы и две аминокислоты, появившиеся в результате вставки линкера. Важно отметить, что элементы этой плазмиды составлены в соответствии с последовательностью процессинга. Плазида рКТН93 кодирует всего одну лишнюю аминокислоту — аланин — между геном зрелого интерферона и сигнальной последовательностью.

Экспрессия в опытах Палвы была значительной и приблизительно одинаковой при использовании двух исследованных плазмид. Следует подчеркнуть два важных обстоятельства: подавляющая доля интерферона секретировалась в среду (около 97—98%), процессинг проходил всегда точно после 31-й аминокислоты сигнального пептида. Это означает, что хотя бы в некоторых случаях место процессинга не зависит от идущей за ним аминокислотной последовательности. По неизвестным причинам данная система синтезирует интерферон почти в 1000 раз хуже, чем  $\alpha$ -амилазу.

Группой японских авторов описана бактериальная система экспрессии и секреции  $\beta$ -интерферона. Клонирование проведено в *Bac. subtilis* на плазмиде, содержащей регуляторную область и сигнальный пептид гена нейтральной протеазы *Bac. amyloliquefaciens*. Уровень продукции достигал  $10^9$  ед/л, причем 80% активности секретировалось в среду.

Из изложенного следует, что адаптация бактерий для продукции интерферона весьма перспективна и после преодоления ряда методических трудностей можно ожидать создания штаммов с продуктивностью  $10^{10}$ — $10^{11}$  ед/л.

**Синтез интерферонов в дрожжах.** Несмотря на высокую продуктивность бактериальных клеток, наиболее перспективным



для синтеза интерфероновых белков человека представляется создание соответствующих систем на основе дрожжевых клеток. Это связано с рядом причин, важнейшими из которых являются следующие: дрожжи рода *Saccharomyces* не патогенны для человека, существуют многовековой опыт и традиции применения их в пищевой промышленности. Промышленная ферментация дрожжей хорошо освоена и обладает рядом преимуществ по сравнению с культивированием бактерий. Так, дрожжи не подвержены фаголизису и аутолизу, легко сепарируются, используют дешевые субстраты. Кроме того, биомасса дрожжей не содержит токсичных и пирогенных факторов, как клетки грамотрицательных бактерий.

Весьма важным обстоятельством является также сходство секреторных механизмов дрожжей и высших эукариот, в связи с чем можно надеяться, что клонированные гены преинтерферонов смогут давать зрелый интерферон в результате правильного процессинга, который бактериальные клетки осуществить не в состоянии.

Как уже отмечалось (см. гл. 3), сигналы инициации и терминации транскрипции и трансляции высших эукариот, хотя и напоминают таковые дрожжей, имеют и существенные отличия и в общем случае не эффективны в дрожжевой клетке. Таким образом, в дрожжевой клетке для полноценной экспрессии должны использоваться собственные сигналы инициации и терминации транскрипции и трансляции.

Об эффективном синтезе интерферона в клетках дрожжей сообщается в работе М. Туита и др. (М. Tuite et al., 1982). Эти исследователи в качестве вектора использовали плазмиду рМА230, содержащую репликоны 2 мкм плазмиды дрожжей и плазмиды рВR 322 *E. coli*, а также ген LEU2 дрожжей, что облегчает ее селекцию. Кроме того, плазида несет HindIII — BamHI-фрагмент дрожжевой хромосомы, содержащей приблизительно 1500 п.о. 5'-фланкирующей области гена фосфоглицераткиназы (PGK) и 11 кодонов структурного гена этого белка. К 11-му кодону присоединен BamHI-линкер, и, таким образом, BamHI-сайт — это экспрессионный сайт в плазмиде рМА230. Выбор РГК обусловлен тем, что соответствующий белок представлен в дрожжевой клетке в большом числе копий. Немаловажным обстоятельством является также и то, что биосинтез РГК поддается регуляции. При росте дрожжей на среде с уксусной кислотой, этот белок синтезируется в клетках с низкой скоростью. При переносе клеток на среду с хорошо ферментируемым субстратом (глюкоза) скорость синтеза РГК возрастает и ее количество достигает через 4—6 ч 1—5% от общего белка дрожжевой клетки.

Источником гена IFN- $\alpha$ 2 служила плазида N5H8, которая содержала полный ген преинтерферона, полученный из банка кДНК на фрагменте, терминированном BamHI-линкерами. Фрагмент был реорганизован следующим образом: проведено рас-

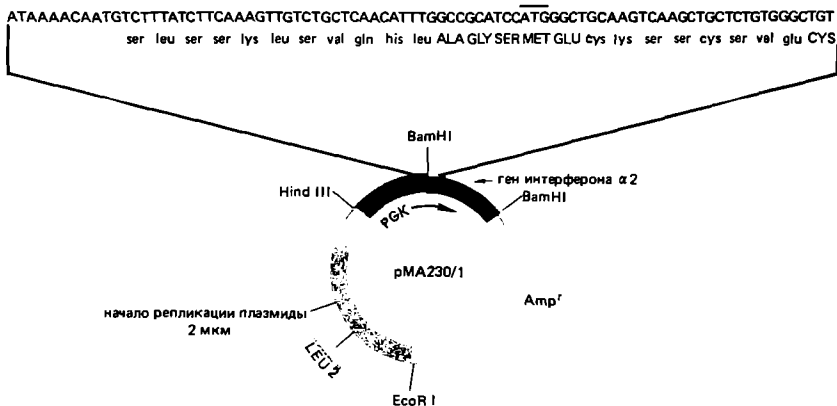


Рис. 41. Плазмида рМА 230/1, несущая ген  $\alpha 2$ -интерферона человека, способная к экспрессии в дрожжах (по М. Tuite et. al., 1982)

В верхней части приведены нуклеотидная и аминокислотная последовательности, соответствующие месту стыка регуляторной области и гена зрелого интерферона, который начинается с остатка цистеина (CYS); стрелка показывает направление транскрипции

щепление рестриктазой PvuII в области сигнальной последовательности (S15) и полученный фрагмент в этом сайте снова был снабжен BamHI-линкером. Вставка реорганизованного IFN-содержащего фрагмента привела к образованию плазмиды рМА230/1 (рис. 41), в которой сохранены вся 5'-регуляторная область PGK и 11 первых кодонов этого гена, затем 5 кодонов, возникших из последовательности линкера, затем 8 кодонов лидерной области интерферонового гена и далее полный структурный ген IFN- $\alpha 2$  и 3'-нетранслируемая область этого гена.

Выход такого гибридного белка составлял 1—2% от общего дрожжевого белка. Учитывая, что титр клеток достигает  $2 \cdot 10^9$  на 1 мл, в этой системе можно получать до 15 мг интерферона в 1 л КЖ. Как показывают расчеты, при этом синтезируется до  $1,2 \cdot 10^6$  молекул интерферона на дрожжевую клетку. В специальных опытах установлено, что в режиме периодической ферментации более 99% клеток сохраняют гибридную плазмиду как на среде с ацетатом, так и на среде с глюкозой (т. е. при условиях активного и слабого синтеза интерферона).

Несмотря на высокий выход интерферона в этой системе, есть основания предполагать, что ее возможности использованы далеко не полностью, так как сам ген PGK, помещенный на 2 мкм плазмиду, обеспечивает синтез до 80% от общего белка клеток дрожжей.

Таким образом, синтез белков человека (и животных) может осуществляться в клетке различных микроорганизмов. Чрезвычайно перспективными для экспрессии эукариотических генов являются дрожжи.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

---

Достижения биологической науки за последние 30 лет привели к разработке новых методов работы с микроорганизмами. Появилась реальная возможность создания живых существ с необычными, полезными для человека свойствами. Перспективы многих направлений биотехнологии, базирующейся на современных методах, сулят в будущем фантастические экономические и экологические выгоды.

В настоящей книге нашли отражение методы генетического конструирования, лежащие в основе современной селекции микроорганизмов. Представленный материал не претендует на исчерпывающее описание всех методик и приемов, которые применяются сегодня в генетике и селекции микроорганизмов. Задача книги ознакомить читателя с принципами этих методов, показать универсальные подходы, открывающие возможность быстрого развития частной генетики и молекулярной биологии любых практически важных объектов, которые уже используются или могут оказаться перспективными для микробиологической промышленности.

Хотя современный этап селекционной работы с микроорганизмами характеризуется преобладанием «классических подходов», связанных с использованием индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора, в практической деятельности микробиологов-селекционеров все шире применяются новые методы — слияние протопластов, амплификация и межвидовой перенос генов. Однако арсенал современной генетики недостаточно используется для создания высокоактивных промышленных штаммов. Основная причина этого — слабая генетическая и биохимическая изученность микроорганизмов, традиционно используемых в промышленности, недостаток знаний о регуляции их клеточного метаболизма в целом, а также отдельных путей биосинтеза, связанных с образованием особо ценных биологически активных соединений, например антибиотиков. Именно здесь целесообразно сконцентрировать усилия генетиков, биохимиков и молекулярных биологов, в тесном контакте с которыми должны работать селекционеры.

Современные генетические методы позволяют не толь-

ко конструировать новые штаммы микроорганизмов, но являются мощным орудием исследования биологии этих объектов.

Применение современных методов ускорит создание новых активных штаммов микроорганизмов, которые давно используются в промышленности. Это явится наиболее эффективным способом интенсификации действующих производств, поскольку не потребует значительных капиталовложений. Кроме того, используя методы генетической инженерии, можно создавать производство новых продуктов на базе хорошо освоенных промышленностью видов микроорганизмов. Например, в клетки актиномицетов, коринебактерий и бацилл переносить гены из различных прокариотических и эукариотических организмов и таким образом получать продуценты новых антибиотиков, ферментов, белков человека и животных и т. д.

Современные универсальные подходы к конструированию штаммов микроорганизмов позволяют в короткие сроки разработать частную генетику и создать продуценты для действующих производств с использованием новых видов, обладающих более эффективным метаболизмом и способных усваивать новые субстраты. Этот путь также даст возможность повысить объем производства и расширить сырьевую базу для промышленности.

Большие перспективы открываются в связи с развитием молекулярно-генетических исследований анаэробов, термофилов, фототрофных цианобактерий, молочнокислых бактерий и других микроорганизмов, использование которых создает возможность применения новых технологий и новых технических решений.

Прогресс микробиологической промышленности связан не только с получением эффективных штаммов-продуцентов, но и с переходом к новым прогрессивным технологиям, которые смогут полностью реализовать потенциал штаммов, полученных современными методами. Это переход от открытых производств к асептическим, от периодических процессов — к непрерывным, от производств, загрязняющих среду — к безотходной технологии и комплексному использованию всех метаболитов и биомассы микроорганизмов. Только такой подход обеспечит достаточную интенсификацию микробиологического производства и позволит решить задачу ускорения научно-технического прогресса в этой отрасли народного хозяйства, поставленную на XXVII съезде КПСС.

- Алиханян С. И. Селекция промышленных микроорганизмов. — М.: Наука, 1968. — 392 с.
- Биотехнология/Отв. ред. А. А. Баев. — М.: Наука, 1984. — 310 с.
- Браун В. Генетика бактерий. — М.: Наука, 1968. — 446 с.
- Брода П. Плазмиды. — М.: Мир, 1982. — 224 с.
- Глазер В. М., Зинченко В. В., Каменева С. В., Шестаков С. В. Большой практикум по генетике микроорганизмов. — М.: МГУ, 1985 — 87 с.
- Готтшлак Г. Метаболизм бактерий. — М.: Мир, 1982. — 310 с.
- Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. — М.: Мир, 1984. — 176 с.
- Дубинин Н. П. Общая генетика. — М.: Наука, 1986. — 560 с.
- Захаров И. А. Курс генетики микроорганизмов. — Минск: Вышейша школа, 1978 — 192 с.
- Захаров И. А. и др. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов. — Л.: Наука, 1976. — 250 с.
- С. Г. Инге-Вецтомов. Введение в молекулярную генетику. — М.: Высш. шк., 1983. — 343 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
- Методы общей бактериологии. В 3 т.: Пер. с англ./Под ред. Ф. Герхардта и др. — М.: Мир, 1984. Т. I — 536 с. Т. II. — 470 с. Т. III — 264 с.
- Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
- Пехов А. П. Плазмиды бактерий. — М.: Медицина, 1986. — 224 с.
- Прозоров А. А. Генетическая трансформация и трансфекция. — М.: Наука, 1980. — 248 с.
- Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии.: Пер. с англ./Под ред. Г. К. Скрыбина. — М.: Мир, 1984. — 172 с.
- Стент Г., Кэллиндар Р. Молекулярная генетика. — М.: Мир, 1981. — 646 с.
- Стейннер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов. В 3 т. — М.: Мир, 1979, Т. I. — 320 с. Т. II — 334 с. Т. III — 486 с.
- Страйер Л. Биохимия. В 3 т. — М.: Мир, 1984, Т. I — 232 с. т. II — 312 с. Т. III — 400 с.
- Уотсон Дж. Молекулярная биология гена. — М.: Мир, 1978. — 720 с.
- Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. — М.: Мир, 1986. — 286 с.
- Фаг ламбда: Пер. с англ./Под ред. Б. Н. Ильяшенко. — М.: Мир, 1975. — 422 с.
- Хесин Р. Б. Непостоянство генома. — М.: Наука, 1985. — 472 с.

# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Азотная репрессия 68, 79  
Аллостерический эффект 34—38  
Аттенуация 25, 26, 62  
Ауторегуляция 44  
Биосинтез треонина схема регуляции у *E. coli* 182\*  
Биосинтетических путей регуляция 10, 15  
— — — — — принцип обратной связи 10, 15  
— — — — — репрессия 15  
— — — — — ретронингибирование 15  
Вектор универсальный для клонирования в *E. coli* 153  
Векторы, используемые для коринебактерий 175\*  
— на основе фага M13 152  
— плазмидные 146, 199, 200  
— сконструированные на основе плазмиды col E1 145\*  
— широкого круга хозяев рестрикционная карта 165\*  
— типы 143—154  
Включение фага  $\lambda$  в хромосому *E. coli* 97  
Генетическая (генная) инженерия, 5, 7, 8, 136, 139, 140, 145, 156, 180, 189  
— — — *in vivo* 109  
— — — *in vitro* 109, 134  
— — — методология 7, 123, 133, 134, 138, 175, 188  
— — — промышленно важных микроорганизмов 163—179  
— — — — актиномицеты 166—169  
— — — — бациллы 169—174  
— — — — дрожжи 175—179  
— — — — коринебактерии 174, 175  
— — — — псевдомонады 164—166  
— — — — схема типового опыта 135\*  
136

Генетическое конструирование 69, 92, 109  
— — значение транспозонного мутагенеза 113  
— — *in vivo* 69  
Генетическая рекомбинация 83  
Гибридизация 86  
— эукариотических микроорганизмов 86  
Гибридная плаزمида 19, 145, 189, 191, 192, 197  
Гибридные клетки 84, 128  
— — способы получения 84  
— — — методом слияния, протопластов 84  
Жизненный цикл умеренного бактериофага 97\*  
Интерферон 194\*  
— синтез в дрожжах 200—203  
— человека общая схема плазмид, определяющих синтез в *E. coli* 193\*  
— — схема клонирования генов 191\*  
— экспрессия в бациллах 198—200  
— — в граммотрицательные бактерии 197, 198  
Исключение индуктора 33  
Карта плазмиды PYN7, несущей гены треонинового оперона с мутантным геном *thrA* 187\*  
Катаболитная репрессия 32, 33, 36—38, 43, 45, 56, 63, 68, 79—81  
— — роль в промышленной микробиологии 38  
Катаболитное ингибирование 33  
Клон(ы) 70, 146, 192  
— содержащие рекомбинантные молекулы ДНК 154  
— — — — методы идентификации 154, 155  
Клонирование в космидах 150\*  
Клонотеки геномов 139  
Конъюгация 89—94  
Микробиологическая промышленность 7, 10

\* Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки или таблицы.

— — значение фагов 97  
— — применение транспозонов 104—115  
— — создание новых штаммов 10  
Микробная клетка 5—7, 9, 46, 89  
— — внутриклеточный протеолиз 50—57  
— — перенос веществ через мембраны 58—68  
— — — — изменение работы систем 68  
— — пути регуляции метаболической активности 5, 6, 50, 67, 79  
— — энергетическое состояние 46, 81  
— — — — роль в регуляции метаболизма 46—49  
Мутагенез 5, 75, 77, 79, 175, 189  
— индуцированный 77  
— инсерционный 160\*  
— локализованный 159  
— сайт-специфический 154, 159, 162, 163  
— — — — применение 163  
— — — — схема 161\*  
— транспозонный 109, 110, 111  
— — преимущества 112, 113  
Мутагены 75, 76\*, 77, 189  
Мутации 12, 17, 19, 24, 34, 37, 39, 53, 57, 64, 89, 111  
— аутокотрофные 73—75, 84, 112  
— — значение для селекции промышленных микроорганизмов 75  
— выделение методом отпечатков 73, 74\*, 77  
— конститутивные 17  
— методы выделения 83  
— не чувствительные к азотной репрессии 81  
— — — — катаболитная репрессия 80  
— ревертанты 71, 72  
— , устойчивые к аналогам метаболитов 12  
— — — — использование в селекции 12, 13  
— — — — антибиотикам 81, 82, 84  
— — — — дыхания 84  
— — — — поверхностно-активным соединениям 84  
Мутации 20, 48, 50, 52—54, 62, 70, 71, 75, 77, 102, 110, 111, 189, 196, 197  
— реверсия 79  
— — для получения комутаций 79  
Плазмидные векторы 111, 141  
Плазмиды рBR322 рестрикционная карта 144\*  
Получение штамма *Pseudomonas putida*, способного усваивать большинство основных углеводов нефти 94

Протопласты слияние 124—133

— — схема 128\*

Регуляция выражения генов 19—26  
Репрессия 62  
— азотная 43—46  
— мультивалентная 181  
Ретроингибирование 11, 15, 26, 79  
— кумулятивное 40  
Родословная Висконсинской линии штаммов-продуцентов пеницилина с некоторыми этапами получения 78\*  
Селекция микроорганизмов 5, 7, 8, 10, 57, 70, 79, 83  
Строгий аминокислотный контроль синтеза РНК 26  
— — — — фактор фФГфф 28—32  
Схема рекомбинации у эукариот 85  
— транспозиции через образование и разрешение контегратов 108  
Транзитная репрессия 33  
Трансдукция 98—104  
— значение 104  
Транспозоны 104—115  
— с детерминантами устойчивости к антибиотикам 110  
— — — — структура 106\*  
Трансформация 115—124  
Фаговые векторы 110, 111, 148, 151\*  
Фазмидный вектор 151\*  
Ферментов активность 10—14  
— — регуляция 10—14  
— — аллостерическая 13, 14  
— синтез 14—20  
— — индукция 14—18, 19  
— — репрессия 14—19  
Штаммы микроорганизмов 5  
— — продуценты биологически активных веществ 5, 32, 57  
— — — — значение протеолиза аномальных белков 57  
— — — — витамина В<sub>2</sub> конструирование 189  
— — — — гомосерина получение 189  
— — — — интерферона человека 180  
— — — — конструирование 190—203  
— — — — треонина 180  
— — — — конструирование 181—189  
— — применение конъюгация при конструировании 93, 94  
— — — — метод слияния протопластов 131  
— — — — повышения активности 77, 80, 81  
Экспрессия генов 35, 43, 44, 50, 55, 62, 64, 93, 117, 154, 155, 197  
— — чужеродных 155, 156  
— — мутантных 71  
Этапы реализации генетической информации у бактерий 16\*

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
Введение	6
<b>Глава 1. Регуляция метаболизма в микробной клетке</b>	<b>9</b>
§ 1. Регуляция активности ферментов	10
§ 2. Индукция и репрессия синтеза ферментов	14
§ 3. РНК-полимераза и регуляция транскрипции у бактерий	20
§ 4. Аминокислотный контроль метаболизма и функции гуанозинтетрафосфата	26
§ 5. Катаболитная репрессия и циклический 3', 5'-аденозинмонофосфат	32
§ 6. Регуляция усвоения азотсодержащих соединений	38
§ 7. Энергетическое состояние клетки и регуляция метаболизма	46
§ 8. Протеолиз и регуляция метаболизма	49
§ 9. Регуляция переноса веществ через мембраны	58
<b>Глава 2. Методы генетического конструирования микроорганизмов <i>in vivo</i></b>	<b>69</b>
§ 1. Мутагенез и методы выделения мутантов	70
§ 2. Гибридизация эукариотических микроорганизмов.	83
§ 3. Плазмиды и конъюгация у бактерий	86
§ 4. Фаги и трансдукция	94
§ 5. Применение транспозонов	104
§ 6. Трансформация	115
§ 7. Слияние протопластов	124
<b>Глава 3. Методы генетического конструирования микроорганизмов <i>in vitro</i> (генетическая инженерия)</b>	<b>134</b>
§ 1. Источники ДНК для клонирования	136
§ 2. Методы воссоединения фрагментов ДНК	141
§ 3. Векторные молекулы	143
§ 4. Методы идентификации клонов, содержащих рекомбинантные молекулы	154
§ 5. Экспрессия чужеродных генов в микроорганизмах	155
§ 6. Локализованный и сайт-специфический мутагенез	159
§ 7. Генная инженерия промышленно важных микроорганизмов	163
<b>Глава 4. Создание промышленных штаммов микроорганизмов современными методами</b>	<b>180</b>
§ 1. Конструирование штаммов — продуцентов первичных метаболитов	181
§ 2. Конструирование штаммов — продуцентов интерферонов человека	190
Заключение	203
Литература	205
Предметный указатель	206