

(Mikrobiyol Bült 1985; 19 : 127-132)

**ESCHERICHIA COLI K12 SUŞUNDA BAZI F-PRİME,
COL FAKTÖR VE R FAKTÖRLERİN
MUTATOR FENOTİPİNE ETKİSİ**

**THE EFFECT OF SOME F-PRIME, COL FACTOR AND
R FACTOR ON THE MUTATOR PHENOTYPE
IN ESCHERICHIA COLI K12 STRAIN**

Ali KALAYCIOĞLU*

Özet : Mutator gen mutH21'i içeren H2110 ve KL398 mut - kod nolu E. coli K12 suşlarında F - prime kaybından sonra gözlenen mutasyon sıklığındaki artış, yaban tip H2 de gözlenmedi. Bu durum muhtelemeln mutH fenotipine has olup, F - prime'da var olan başka bir mutasyona da bağlı olabilir.

Bu nedenle mutajenize olmamış başka bir F - prime(Col faktör ve faktör mutator suşa aktarılarak bu hipotezimizin geçerliği test edildi.

Summary : The increased rate of mutation in E. coli strains, containing mutator gene mutH21, which followed loss of F factor in H2110 and KL398 mut - was not seen with the parent H2. It was likely that the effect spesific for the mutH phenotype. This effect may have been due to a further mutation on the F - prime, Thus a different non mutagenised F - prime, Col factor and R factor was reintroduced to test this hypothesis.

G İ R İ Ş

Yüksek sıklıkta mutasyon gösteren bir mutant genin elde edişi ve haritalanması daha önce yayınlanmıştı (1). E. coli ve diğer organizmalarda yaban tipleriyle kıyaslandıklarında yüksek sıklıkta mutasyon yapan bu genler genelde mutator genler olarak adlandırılır (2). E coli bakterilerinde mutator genleri içeren suşları mutator E. coli suşları olarak da adlandırılabilir. Kromozomal mutH21 genine sahip bir E. coli H12 suşunda F-prime faktörün yok edilmesiyle gözlenen mutasyon sıklığındaki kısmi azalma bizi bu yönde araştırmaya yönlendirdi.

* Yrd. Doç. Dr. H.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

F-prime'ı yok edilen *E. coli* mutator suşuna çeşitli plazmidler aktarıldı. Bu plazmidlerin varlığında ve yokluğunda mutator suşun mutasyon sıklığı hesaplandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri Suşları Listesi : Tablo 1'de bu çalışmada kullanılan bakteri suşları gösterilmiştir.

Vasat : Bu çalışmada kullanılan katı ve sıvı vasatların başlıcaları Nutrient broth, Nutrient agar (Oxoid broth No. 2), Minimal agar ve Eosin Metilen Blue (EMB) agardı.

Kimyasal madde : Nalidiksik asit (Distile su içinde eritilebilmesi için 2M NaOH çözeltisinden 1-2 damla damlatıldı).

Plasmid aktarımı ve segregasyonu (3)

Tablo 1'de görüldüğü gibi mutator suşumuz kısmi diploid ve F'lacZ⁻ epizomu içeriyordu. Nutrient broth'da log fazı üreme devre-

Tablo 1. Araştırmada kullanılan bakteri suşları.

Suş No	Sex	Özellikler
1) H2	F-prime	thi ⁻ , sup ⁻ , lacZ ⁻ 10b, M15 ara ⁻ , mal ⁻ , mtl ⁻ , λ ^R T ^s 6 AzU ^s Str ^R /F'lacZ ⁻ (am) U131
2) H2110	F-prime	H2 özelliklerine ilaveten mutH21
3) KL398mut ⁻	F ⁻	metE ⁻ , leu ⁻ , proC ⁻ , hisF ⁻ , thyA ⁻ , thi ⁻ , lacZ ⁻ 36, ara ⁻ , mtl, xyl ⁻ , Str ^R , Spc ^R , mutH21
4) JG196	F-prime	met ⁻ , rha ⁻ , recA ⁻ /F14 met ⁺ , rha ⁺ , pol ⁺ ,
5) KLF43	F-prime	tyrA ⁻ , pyrD ⁻ , thi ⁻ , his ⁻ , trp ⁻ , thyA ⁻ , recA1, mtl ⁻ , xyl ⁻ , Str ^R , λ ^R , λ ⁻ /F'143 lysA ⁺ , tyrA ⁺
6) E'36	F-prime	(lac-pro) XIII Str ^S /F'(ts114) lac ⁺
7) DFFI	F-prime	argG ⁻ , metB ⁻ , his ⁻ , leu ⁻ , thyA ⁻ , recA1, mtl ⁻ , xyl ⁻ , lac ⁻ , Str ^R , λ ^R , λ ⁻ , supE44/ F'150 his ⁺ , zwf ⁺
8) KLF10	F-prime	argG ⁻ , metB ⁻ , his, leu, thyA ⁻ , recA1, mtl ⁻ , xyl ⁻ , lac ⁻ , Str ^R , λ ^R , λ ⁻ , supE44/ F'110 polA ⁺ , malB ⁺
9) KLF1	F-prime	thr ⁻ , leu ⁻ , his ⁻ , arg ⁻ , pro ⁻ , recA1 Str ^R / F'101 thr ⁺ , leu ⁺
10) R-Utrecht		Cm
11) ColV-K30		ColicinV
12) ColI _b -P9		ColicinI

sindeki H2 ve H2110 1/10 oranında fosfat tamponuyla sulandırıldı ve 24 saat oda sıcaklığında çalkalandı. Buradaki amaç bu suşlarda açlığa bağlı olarak F-pili sentezini durdurmak ve geçici olarak alıcı (recipient) bakteri şekline sokmaktır (Fenokopi). Fenokopi yapılan bu suşlara 30°C t_s (ısı hassas) F'lac⁺ aktarımı yapıldı. H2 ve H2110 suşlarının t_s F'lac⁺ içerdiği EMB agarlarda 30°C de 3-4 günlük inkübasyon sonucu gözlemlendi. Daha sonra t_s F'lac⁺ içeren bu iki suş EMB agarına ekilerek 42°C dört gün inkübasyona bırakıldı. t_s F'lac⁺ 42°C de replike olamayacağından tek kolonların % 60-70'i açık pembe renkte gözleniyordu ki bu da H2 ve H2110 suşlarının artık F'-prime içermediği ve dişi bakteri şekline dönüştüğüne işaretti. İzole edilen bu pembe renkteki kolonları nsex spesifik fajlarla muamelesi sonucunda da bu suşların dişi olduğu belirlendi (H2110F⁻ ve H2F⁻).

Col faktör aktarımında mutator suş ve yaban tipinde kolisin üretimi varlığı ile kontrol edildi. Col faktör taşıyan suşlar, kolisin hassas bakteri ile ekildiğinde Col faktör içeren koloni etrafında zonlar oluşur (4). R-Utrecht aktarımında da seleksiyon kloramfenikole karşı yapıldı.

Mutasyon Sıklığı : Mililitresinde 50 µg Nalidiksik içeren Minimal agar plaklarına suşlar ekildi. Aynı suşlar Nalidiksik asitsiz Minimal agar plaklarına da canlı hücre sayımı için ekildi. Mutant koloni sayımının canlı hücre sayımına bölümünden çıkan oran mutasyon sıklığı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Mutasyon sıklığı Nalidiksik aside karşı ölçüldüğünde mutator suşun yaban tipe nazaran hayli yüksek olduğu gözlemlendi. Gereç ve yöntem bölümünde anlatılan metodla da mutator suşun ve yaban tipinin F'-prime'leri segregasyona uğratılarak yok edildiğinde mutasyon sıklığı kısmi şekilde yükseldi. Bu duruma daha iyi yorum getirebilmek için şu deneylerin sonuçlarını gözlemek istedik.

- 1) Mutator genin bir başka dişi suşa (KL398) transdüksiyonla aktarımı ile bu suşun F'-prime varlığı ve yokluğundaki mutasyon sıklığı.
- 2) H2110 suşuna diğer F'-prime aktarımlarında gözlenen mutasyon sıklığı.
- 3) F'-prime dışında diğer bazı plazmidlerin aktarımı ile bu suşlarda gözlenecek mutasyon sıklığı.

Bu 3 aşamadaki tüm deneylerin sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

H2110F⁻ ve KL398 mutH21 suşlarına aktarılan bütün F⁻ prime'lar mutasyon sıklığının kısmi de olsa düşmesine neden oldu.

F110, F150, F14 ve KLF1 F - prime'larını içeren mutator suşta mutasyon sıklığı hiçbir F - prime içermeyen (F⁻) mutator suşa nazaran yaklaşık 8-12 kat arasında bir düşme gösterdi. F143 içeren mutator suşta mutator aktivitesi kayboldu. Çünkü F143 yaban tip mutH⁺ gene ürününü içeriyordu.

Bu bulgular üzerine dişi mutator suşa ColV ve ColI_b kolisin faktörleri (Col faktör) aktarıldı. ColV özellikleri bakımından F - faktöre benzer (5, 6). Bu nedenle de F - benzer (F - like) Col faktör diye adlandırılır. Oysa ColI_b F - faktörle bir benzerlik göstermez (5, 7). ColV aktarımı yapılan mutator suş da (H2110F⁻) mutasyon sıklığında gözlenen düşme F - prime etkilerine benzer nitelikteydi. Oysa ColI_b mutator suşun mutasyon sıklığına önemli bir etki yapmadı.

Bir plazmid olan R - Utrecht (R - faktörü) bulunduğu suşlar için mutajeniktir (8). R - Utrecht H2F⁻ ve H2110F⁻ suşlarına aktarıldı. Her iki suşta da mutasyon sıklığı kısmen arttı. Bu da R - Utrechtin karakteristiğine uygun bir sonuçtu.

Tablo 2. Plazmid içeren ve içermeyen suşlarda nalidiksik asid dirençliliğine karşı mutasyon sıklığı.

Suş	Plazmid	Mutasyon sıklığı (50 g/ml)
H2	içermiyor	2×10^{-8}
	ColI _b	2.3×10^{-8}
	R - Utrecht	9.1×10^{-8}
H2110	içermiyor	5.6×10^{-5}
	ColI _b	6.6×10^{-5}
	F110	5.8×10^{-6}
	F150	3.4×10^{-6}
	ColV	1.3×10^{-6}
	R - Utrecht	8.6×10^{-5}
KL398 mut	içermiyor	1×10^{-5}
	KLF1	3.4×10^{-6}
	F150	1.3×10^{-6}
	F14	3×10^{-6}
	F143	2.2×10^{-8}

TARTIŞMA

Yüksek sıklıkta mutasyona neden olan *E. coli* suşlarındaki mutator genlerin genetik özellikleri mutasyon mekanizması hakkındaki teorilere ek bilgiler kazandırmaktadır (2, 9).

Mutator genlerin aktiviteleri bazen kısmide olsa kimyasal maddelerce baskılanabilir. Antimutajenler olarak adlandırdığımız bu maddelerle yapılan çalışmalarda **mutH** (10) ve **mutT** genlerinde (11) antimutajenik etki gözlenmiştir.

Maki ve arkadaşları da *dnaQ* geninin alleli olan bazı mutator genler izole etmişler ve bu genlerin çeşitli komplementasyon testleriyle mutator aktivitesine bakmışlardır (12). Ancak Maki ve arkadaşları komplementasyon testlerinde merodiploid suşlarda *dnaQ* geninin farklı iki allelini kullanmışlar ve mutasyon sıklığında artma görmüşlerdir.

Bu araştırma ise tesadüf sonucu yapılmıştır. Çünkü bir başka deney amacı için F-prime'ı yok edilen mutator suşda gözlenen kısmi mutasyon sıklığı yükselmesi ile acaba plazmid varlığı antimutator etki mi yapıyor, sorusunu ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla çeşitli plazmidler mutator suşa aktarılarak bu suşlardaki mutasyon sıklıkları ve hiç plazmid içermeyen H2110F⁻ ve KL398mut⁻ suşlarındaki mutasyon sıklıkları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 2). F-prime aktarılan mutator suşlardaki mutasyon sıklığındaki kısmi düşme, F faktörce yönlendirilen aktivitenin kısmen **mutH**⁺ geninin ürününü sentezlediği şeklinde tarafımızdan yorumlanmıştır. Mutasyon sıklığı düşüşü mutator suşa F-benzer ColV faktör aktarıldığında gözlenmiş fakat F-benzer olmayan ColI_b plazmidi aktarımında gözlenmemiştir. R-Utrecht ise bulunduğu suşlarda mutajenik olduğundan mutator suş ve yaban tipinde mutasyon sıklığını kısmi artırdı.

Bu sonuçlardan sonra belki F-faktör fonksiyonunun replikasyonla ilişkili olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Kalaycıoğlu, A. Isolation of a mutator strain of *Escherichia coli* K12. Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering 1983, Vol 12; 67.
2. Cox, E.C. Bakterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. Ann. Rev. Genetics 1976, 10; 135.

E. COLI MUTASYONU

3. Miller, J.H. Experiments in Molecular Genetics 1972 Cold Spring Harbor Laboratory.
4. Hardy, K.G., Harwood, C.R. and Meynell, G.G. Expression of Colicin factor E2-P9, Molec. Gen. Genet. 1974, 131 : 1313.
5. Akman, M. Bakteri Genetiği 1983. Cumhuriyet Üniversitesi yayını s. 387-388.
6. Sharp, P.A., Cohen, S.N. and Davidson, N. Electron microscope heteroduplex studies of sequence relation among plasmids of E. coli. J. Molec. Bio. 1973, 75 : 235
7. Guerry, P. and Falkow, S. Polynucleotide sequence relationships among bacterial plasmids. J. Bacteriol. 1971, 107 : 372.
8. MacPhee, D.G. Effect of rec mutations on the ultraviolet-protecting and mutation-enhancing properties of the plasmids R-Utrecht in Salmonella typhimurium Mutat. Res. 1973. 15 : 357.
9. Echols, H., Lu, C. and Burgers, P.M.J. Mutator strains of E. coli mutD and dnaQ, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1983 Vol. 80 : 2189.
11. Clarke, C.H. and Shalkel, D.M. Antimutagens *mutT* Molec. Gen. Genet. 1977, 154 : 335
12. Maki, H., Horiuchi, T. and Sekiguchi, M. Isolation of conditional lethal mutator mutants of E. coli by localized mutagenesis J. Bacteriol. 1983. 153 : 1361.