

<https://doi.org/10.17116/molgen201937031134>

Сравнительная геномика штаммов *Escherichia coli* AB1157, AB2463, AB2494 и AB1885

© Г.Б. СМІРНОВ, И.Н. БОДОЕВ, А.П. МАКАРОВА, Т.Б. БУТУСОВА, В.А. ВЕСЕЛОВСКИЙ, А.С. ГУЛЯЕВ, Е.А. ШИТИКОВ, Е.Н. ИЛЬИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия, 119435

Проведено полногеномное секвенирование штаммов AB1157 и его мутантов — AB1885 *uvrB5*, AB2463 *recA13*, AB2494 *lexA1*, дефектных по системам репарации ДНК, рекомбинации и мутагенеза. Установлено, что геномы штаммов AB2463 *recA13* и AB2494 *lexA1* содержат несколько сотен мутаций, которые отличают их от генома исходного штамма и образовались, по-видимому, при однократном воздействии N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина на штамм AB1157. При этом геном штамма AB1885 *uvrB5*, полученного с помощью азотистой кислоты, содержит примерно в 10 раз меньше отличий от родительского штамма. Мутации в геномах штаммов AB2463 *recA13* и AB2494 *lexA1* представлены преимущественно транзициями GC на AT, распределены беспорядочно по геному и не совпадают по локализации. В свою очередь вклад спонтанных мутаций в изменения, произошедшие с изученными штаммами за период времени от их выделения до наших дней, незначителен. Также на молекулярном уровне аннотированы ранее известные генетические (фенотипические) маркеры изученного семейства штаммов.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, *recA*, *lexA*, *uvrB*, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, азотистая кислота, полногеномное секвенирование.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смирнов Г.Б. — e-mail: smirngb@ya.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9269-6129>
 Бодоев И.Н. — e-mail: ivan-bodoev@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6611-5535>
 Макарова А.П. — e-mail: alenka130795@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2584-9062>
 Бутусова Т.Б. — e-mail: tabutsova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7419-4229>
 Веселовский В.А. — e-mail: djd26@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4336-9452>
 Гуляев А.С. — e-mail: andrewgull87@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6329-2421>
 Шитиков Е.А. — e-mail: eshitikov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4865-6004>
 Ильина Е.Н. — e-mail: ilinaen@gmail.com

АВТОР, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ПЕРЕПИСКУ:

Бодоев И.Н. — e-mail: ivan-bodoev@yandex.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Смирнов Г.Б., Бодоев И.Н., Макарова А.П., Бутусова Т.Б., Веселовский В.А., Гуляев А.С., Шитиков Е.А., Ильина Е.Н. Сравнительная геномика штаммов *Escherichia coli* AB1157, AB2463, AB2494 и AB1885. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019;37(3):134–139. <https://doi.org/10.17116/molgen201937031134>

Comparative genomics of the *Escherichia coli* strains AB1157, AB2463, AB2494 and AB1885

© G.B. SMIRNOV, I.N. BODOEV, A.P. MAKAROVA, T.B. BUTUSOVA, V.A. VESELOVSKY, A.S. GULYAEV, E.A. SHITIKOV, E.N. ILYINA

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency of the Russia, Moscow, Russia, 119435

Abstract

Whole genome sequencing of the *Escherichia coli* strains AB1157 and its mutants AB1885 *uvrB5*, AB2463 *recA13*, and AB2494 *lexA1* deficient in the DNA repair, recombination, and mutagenesis systems was performed. It was found that the genomes of AB2463 *recA13* and AB2494 *lexA1* strains differ from the genome of ancestral strain by several hundred mutations which arose most probably in the course of single treatment of AB1157 with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. At the same time the genome of the strain AB1885 obtained after treatment with nitrous acid contained ten times less differences from its parent strain. Mutations in the AB2463 *recA13* and AB2494 *lexA1* genomes were predominantly GC to AT transitions, distributed randomly along the genomes and their locations did not coincide in these strains. The input of spontaneous mutations in differences between the strains studied aroused during the period from their isolation to the sequence experiments seems to be insignificant. Earlier known genetic and phenotypic traits annotated on the molecular level.

Keywords: *Escherichia coli*, *recA*, *lexA*, *uvrB*, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, nitrous acid, whole genome sequencing.

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Smirnov G.B. — e-mail: smirngb@ya.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9269-6129>
 Bodoev I.N. — e-mail: ivan-bodoev@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6611-5535>
 Makarova A.P. — e-mail: alenka130795@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2584-9062>
 Butusova T.B. — e-mail: tabutusova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7419-4229>
 Veselovsky V.A. — e-mail: djdf26@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4336-9452>
 Gulyaev A.S. — e-mail: andrewgull87@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6329-2421>
 Shitikov E.A. — e-mail: eshitikov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4865-6004>
 Ilyina E.N. — e-mail: ilinaen@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0130-5079>.

CORRESPONDING AUTHOR:

Bodoev I.N. — e-mail: ivan-bodoev@yandex.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Smirnov G.B., Bodoev I.N., Makarova A.P., Butusova T.B., Veselovsky V.A., Gulyaev A.S., Shitikov E.A., Ilyina E.N. Comparative genomics of the *Escherichia coli* strains AB1157, AB2463, AB2494 and AB1885. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2019;37(3):134-139. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/molgen201937031134>

В 1960 г. Эдвард Адельберг и Сара Бернс приступили к созданию коллекции штаммов *Escherichia coli* K12, несущих префикс АВ [1]. В 1962 г. эта коллекция обогатилась штаммом АВ1157, который содержал несколько аукотрофных мутаций и мутаций по генам утилизации углеводов, был устойчив к стрептомицину и использовался как F-реципиент в конъюгационных скрещиваниях с донорными штаммами [2]. Целью этих экспериментов было изучение генетической структуры бактериальной хромосомы. Именно штамм АВ1157 был использован Полом Говардом-Фландерсом с сотрудниками в качестве исходного при выделении мутантов по генам *uvrA*, *uvrB* и *uvrC*, в которых поврежденным оказался первый этап (инцизия) эксцизионной репарации ДНК после УФ-облучения. Эти мутанты были получены после обработки бактерий АВ1157 азотистой кислотой. Таким образом, был получен штамм АВ1885, содержащий мутацию *uvrB5* [3]. В том же 1966 г. из штамма АВ1157 был получен мутант, не способный к генетической рекомбинации. Этот штамм содержал мутацию *recA13* и был обозначен АВ2463 [4]. Следующим мутантом, полученным из штамма АВ1157, был мутант, дефектный по системе SOS-ответа, т.е. не способный к мутагенезу, индуцированному радиацией. Штамм был обозначен АВ2494 и содержал мутацию *lexA1*, которая лишала репрессор LexA способности к аутопротеолизу [5]. Штаммы АВ2463 и АВ2494 были получены с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (НГ).

Все эти штаммы были использованы многочисленными коллективами [6–9] исследователей в сотнях работ, посвященных репарации, рекомбинации и мутагенезу у бактерий *E. coli*. Однако геномы этих штаммов секвенированы не были. Мы провели полногеномное секвенирование штаммов АВ1157, АВ2463, АВ2494 и АВ1885. В настоящей работе представлен анализ результатов секвенирования, который выявил значительное количество изменений в геномах АВ2463 и АВ2494 по сравнению с родительским штаммом АВ1157. В связи с этим сделана попытка ответить на следующие вопросы: 1) когда возникли обнаруженные нами изменения (сразу после мутагенеза или в последующие годы)? 2) изменения в геномах АВ2463 и АВ2494 происходили «по одному сценарию» или совершенно независимо? 3) каков вклад спонтанных мутаций штамма АВ1157 в различия между геномами АВ1157, АВ2463 и АВ2494?

Материал и методы

Бактериальные штаммы и культивирование. Культивирование бактерий проводили в соответствии с описанными ранее протоколами [10]. Основные генетические характеристики штаммов: АВ1157, *F-thr-1 leu-6 proA2 his4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 strA31 sup-37*; АВ2463, как АВ1157, но также *recA13*; АВ2494, как АВ1157, но также *metb-1 lexA1* и АВ1885 как АВ1157, но *uvrB5* (данные взяты из базы данных Йельского университета (The Coli Genetic Stock Center (<http://cgsc2.biology.yale.edu/>))).

Штаммы АВ1157, АВ2463, АВ2494 и АВ1885 были любезно предоставлены Г.Б. Смирнову Полом Говардом-Фландерсом в 1967 г. Штамм АВ1157, обозначаемый здесь как АВ1157 alt, был любезно предоставлен М.А. Петровой из коллекции Сектора анализа и хранения микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН в 2017 г.

Выделение ДНК. Лизис бактерий проводили с использованием буфера Promega Nuclei (Promega, США). Для удаления клеточных белков добавляли насыщенный раствор NaCl. ДНК концентрировали и обессоливали осаждением изопропанолом. К осадку ДНК добавляли 50–100 мкл ТЕ-буфера для дальнейшего хранения при 4 °С. ДНК дополнительно очищали, используя миниколонки для очистки ДНК («Technoclonе», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Секвенирование и анализ генома. ДНК (300 нг для каждого образца) фрагментировали с использованием системы Covaris S220 («Covaris, Woburn, Massachusetts, США») до конечного размера 300–500 п.о. согласно рекомендациям производителя.

Для секвенирования на приборе Ion Torrent PGM («Thermo Fisher Scientific») приготовление библиотек осуществляли набором Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit («Thermo Fisher Scientific»). Для эмульсионной ПЦР использовали набор Ion PGM™ Template OT2 200 Kit («Thermo Fisher Scientific»). Секвенирование ДНК проводили с использованием Ion 318 chip v2 и the Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 («Thermo Fisher Scientific»).

Для секвенирования на HiSeq 2500 platform («Illumina», США) готовили библиотеки парно-концевых фрагментов согласно рекомендации производителя с исполь-

зованием набора NEB Next Ultra II DNA Library Prep Kit («New England Biolabs», США). Индексацию библиотек осуществляли набором NEB Next Multiplex Oligos for Illumina (96 Index Primers) («New England Biolabs», США). Секвенирование проводили согласно рекомендациям производителя с использованием набора HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2, HiSeq Rapid SBS Kit v2 (500 cycles) и HiSeq Rapid PE FlowCell v2.

Результаты секвенирования депонированы в базу данных NCBI под проектом PRJNA416242. Номера депонирования архивов секвенированных прочтений (Sequence Read Archive (SRA)) SRX3421413 — AB1157, SRX5178624 — AB1157 alt, SRX5178623 — AB1885, SRX3421414 — AB2463 и SRX3421412 — AB2494. Выравнивание прочтений с прибора на референсный геном *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 (NC_000913.3) проводили с использованием Bowtie 2 [11]. Для поиска однонуклеотидных полиморфизмов использовали программу FreeBayes [12]. В анализе учитывали полиморфизмы с минимальным x10 покрытием ридами и наличием измененного нуклеотида в 90% прочтений [13].

Для поиска участков генома со статистически значимо увеличенным числом однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) для каждого окна (длиной 2000 п.о. и 10 000 п.о.) было получено среднее значение числа SNP; вероятность получить наблюдаемое число вставок в окне оценивали согласно распределению Пуассона. Достоверным считали отличие с *p*-уровнем значимости менее 0,05 после поправки Бонферрони на множественное сравнение. Расчеты проводили с помощью языка программирования R.

Результаты и обсуждение

Были получены геномные последовательности исследуемых штаммов *E. coli*: родительский штамм AB1157, другая линия этого штамма AB1157 alt, *recA13* мутант AB2463, *lexA1* мутант AB2494 и *uvrB5* мутант AB1885.

Геномы штаммов сравнивали между собой и относительно референсного генома *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 (NC_000913.3), представленного в NCBI (далее *E. coli* K12 (NCBI)) (табл. 1).

Геномы штаммов AB2463 и AB2494, полученных путем обработки штамма AB1157 нитрозогуанидином, содержали 131 и 293 отличий от генома AB1157 соответственно. Анализ локализации этих мутаций по геномам не выявил статистически достоверных кластеров, при этом выявленные SNPs для штаммов AB2463 и AB2494 не совпадали между собой ни по одной из позиций. Большая часть этих из-

менений представлена транзициями GC на AT (табл. 2), что соответствует известному механизму действия алкилирующих агентов [14].

В свою очередь геномы различных линий AB1157 (в тексте AB1157 и AB1157 alt) отличались друг от друга по 8 позициям. Геном AB1157 отличался от *E. coli* K12 (NCBI) по 120 позициям. В геноме AB1157 произошли 2 замены, отсутствующие в геномах AB2463 и AB2494 (здесь и далее замены, характерные для генома AB1157, обозначены на основе его сравнения с геномом K12 (NCBI)). Однако геном AB1157 alt не содержал этих двух замен, но в свою очередь имел 5 своих уникальных мутаций. Геном штамма AB1157 содержал 11 мутаций (2 нонсенс, 7 несинонимичных и 2 синонимичные), которых нет в геноме AB2494, 9 из которых общие с AB2463 и AB1157 alt.

Геном штамма AB1885 (получен после обработки штамма AB1157 азотистой кислотой) имел всего 25 отличий от генома AB1157, 9 из которых были найдены именно в геноме AB1157 (7 общие с AB2463 и 2 уникальные для AB1157). AB1885 содержал 16 уникальных мутаций, которых не было выявлено в родительском геноме штамма AB1157 и эти мутации не совпадали ни по одной из позиций с изменениями в геномах AB2463 и AB2494. Полученные нами данные указывают, что азотистая кислота может вызывать трансверсии и транзиции, с небольшим преимуществом последних (10 из 16) (см. табл. 2).

В дальнейшем был проведен сравнительный анализ известных генетических маркеров штаммов из базы *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University School of Medicine. В табл. 3 представлены генетические маркеры, их фенотипическое проявление и мутации, которые являются общими для всех штаммов. В табл. 4 и 5 представлены генетические маркеры, которые специфичны для исследуемых штаммов.

Полногеномное секвенирование по праву стало классическим методом молекулярной генетики бактерий. Расшифровка геномных последовательностей исторически важных штаммов являлась вопросом времени. Результаты секвенирования не только подтвердили ранее известные мутации, соответствующие генетическим характеристикам штаммов и описанные в базе Йельского университета, но и выявили новые, ранее неизвестные (неопубликованные) дефекты в генах, определяющих фенотип. Как выяснилось, штамм AB2494, хотя и проявляет одинаковый с остальными штаммами фенотип, т.е., например, не способен расти на минимальной среде без добавления аргинина, но имеет мутацию в другом гене метаболизма аргинина. Наша работа позволит по-новому взглянуть на ранее полученные данные.

Таблица 1. Попарное сравнение количества мутаций в генах изученных штаммов

	AB1157			AB2463			AB2494			AB1885			AB1157 alt			K12(NCBI)		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
K12(NCBI)	69	13	38	148	20	79	238	23	126	68	12	47	70	13	39			
AB1157 alt	7	0	1	86	7	42	190	14	93	14	1	12						
AB1885	13	1	11	92	8	52	190	13	101									
AB2494	187	14	92	266	21	133												
AB2463	83	7	41															
AB1157																		

Примечание. I — миссенс мутации, II — нонсенс мутации и III — синонимичные мутации.

Первый вопрос, обозначенный во введении, можно сформулировать иначе: являются ли наблюдаемые изменения в геномах АВ2463 и АВ2494 спонтанными или индуцированными НГ? К сожалению, мы точно не знаем, сколько изменений возникло непосредственно после мутагенного воздействия, однако мы можем сравнить количество изменений в штаммах, полученных с помощью НГ и азотистой кислоты. Количество отличий между геномами АВ1157 и АВ1885 в 10 раз меньше, чем между геномами

АВ1157 и АВ2463 или АВ2494. Это означает, что абсолютное большинство замен пар оснований в геномах штаммов АВ2463 и АВ2494 произошло под влиянием НГ, а не вследствие спонтанного мутагенеза. Таким образом, на первый вопрос можно вполне определенно ответить: наблюдаемые изменения в геномах АВ2463 и АВ2494 — следствие мутагенного воздействия НГ.

Что касается второго вопроса, то «один сценарий» предполагает сходство в локализации и характере измене-

Таблица 2. Количество и тип уникальных замен в генах штаммов АВ2463, АВ2494 и АВ1885

АВ2463	С→	А	1	АВ2494	С→	А	3	АВ1885	С→	А	2
	G→	А	44		G→	А	189		G→	А	2
	T→	А	1		T→	А	0		T→	А	1
	C→	T	72		C→	T	78		C→	T	5
	G→	T	0		G→	T	1		G→	T	1
	A→	T	1		A→	T	0		A→	T	0
	A→	C	1		A→	C	0		A→	C	0
	G→	C	1		G→	C	0		G→	C	1
	T→	C	4		T→	C	3		T→	C	1
	C→	G	0		C→	G	0		C→	G	1
	A→	C	2		A→	G	5		A→	G	2
	T	C	2		T→	G	1		T	G	0

Таблица 3. Описание мутаций, общих для всех *E. coli* АВ-штаммов

Мутация	Определение и фенотип	Ген	Замена нуклеотида	Замена аминокислоты	Источник
<i>thr-1</i>	Нарушение биосинтеза тиамина. Для роста на минимальной среде требуется тиамин	<i>thrB</i>	845G>A	W282X	Данная работа
<i>araC14</i>	Нарушение метаболизма арабинозы. Для роста на минимальной среде требуется другой углевод	<i>araC</i>	784T>C	S262P	Данная работа
<i>leuB6(Am)</i>	Нарушение биосинтеза лейцина. Для роста на минимальной среде требуется лейцин	<i>leuB</i>	857C>T	S286L	[15]
<i>Δ(gpt-proA)62</i>	Нарушение биосинтеза пролина. Для роста на минимальной среде требуется пролин		Делеция гена		[16]
<i>tsx-33</i>	Мутация в гене рецептора фага Т6 и колицина К. Приводит к устойчивости к бактериофагу Т6 и колицину К	<i>tsx</i>	102G>A	W34X	Данная работа
<i>galK2(Oc)</i>	Нарушение метаболизма галактозы. Для роста на минимальной среде требуется другой углевод	<i>galK</i>	400G>A	E134X	Данная работа
<i>hisG4(Oc)</i>	Нарушение биосинтеза гистидина. Для роста на минимальной среде требуется гистидин	<i>hisG</i>	589C>T	Q197X	Данная работа
<i>rfbC1 (declared)</i>	Нарушение биосинтеза О-специфического липополисахарида	<i>rfbD</i>	720delC		[17]
<i>rpoS396(Am)</i>	Мутация в сигма-факторе	<i>rpoS</i>	97C>T	Q33X	[18]
<i>rpsL31(strR)</i>	Мутация в субъединице S12 рибосомы 30S придает устойчивость к стрептомицину	<i>rpsL</i>	128A>C	K43T	[19]
<i>kdgK51</i>	Мутация в гене белка, ответственного за деградацию D-глюкуроната, D-галактуроната	<i>kdgK</i>	163G>A	G55R	Данная работа
<i>xylA5</i>	Нарушение метаболизма ксилозы. Для роста на минимальной среде требуется другой углевод	<i>xylA</i>	206G>A	W69X	Данная работа
<i>mtl-1</i>	Нарушение метаболизма маннита. Для роста на минимальной среде требуется другой углевод	<i>mtlA</i>	896C>T	S299F	Данная работа

Таблица 4. Мутации, общие для ряда секвенированных АВ-штаммов

Мутация	Определение и фенотип	Ген	Замена нуклеотида	Замена аминокислоты	Источник
AB1157=AB1157 alt=AB2463=AB1885					
argE3(Oc)	Нарушение метаболизма аргинина. Для роста на минимальной среде требуется аргинин	<i>argE</i>	1012C>A	Q338X	Данная работа
thiE1	Нарушение метаболизма тиамин. Для роста на минимальной среде требуется тиамин	<i>thiE</i>	209A>C	D70A	Данная работа

Таблица 5. Уникальные мутации в АВ-штаммах

Мутация	Определение и фенотип	Ген	Замена нуклеотида	Замена аминокислоты	Источник
<i>AB1885</i>					
uvrB5	Мутация гена <i>uvrB</i> приводит к неспособности удалять из ДНК пиримидиновые димеры и УФ-чувствительности	<i>uvrB</i>	339delC		Данная работа
<i>AB2463</i>					
recA13	Мутация белка RecA, ответственного за рекомбинацию, репарацию и запуск SOS-ответа. Мутанты чувствительны к УФ-излучению	<i>recA</i>	154C>T	L52F	Данная работа
<i>AB2494</i>					
argE3(Oc) (declared)	Нарушение метаболизма аргинина. Для роста на минимальной среде требуется аргинин	<i>argI</i>	53C>T	A18V	Данная работа
lexA1(Ind-)	Блокировка аутопротеолиза белка LexA, отсутствие SOS-ответа	<i>lexA</i>	239G>A 412G>A	G80D D138N	[20, 21] Данная работа
metB1	Нарушение биосинтеза метионина. Для роста на минимальной среде требуется метионин	<i>metB</i>	139delCG		Данная работа
glnX44(AS)	Нарушение биосинтеза глутамина	<i>glnE</i>	1183C>T	L395F	Данная работа

ний в геномах АВ2463 и АВ2494. Как видно из результатов, основными мутациями являются транзиции GC на AT для обоих геномов, другими словами, характер или тип изменений одинаковый. Полученные результаты показывают, что в геноме штамма АВ2463 присутствует 129 уникальных мутаций, у штамма АВ2494 — 280, однако позиции этих мутаций не совпадают, и есть всего 9 генов (из 344 суммарно), в которых произошли мутации в разных позициях у обоих штаммов. Отсутствие сходства свидетельствует о том, что при получении штаммов АВ2463 и АВ2494 НГ атаковал геном АВ1157 беспорядочно, что, в конечном счете, вызвало появление в геномах АВ2463 и АВ2494 совершенно разных изменений. Итак, ответ на второй вопрос также очевиден — при получении штаммов АВ2463 и АВ2494 НГ вызвал в геноме А1157 мутации в совершенно разных сайтах. Возможно, это связано с различными условиями мутагенного воздействия (например, отличия pH раствора мутагена в разных экспериментах).

Чтобы ответить на третий вопрос, нужно понять, сколько произошло мутаций в геноме АВ1157 после получения из него штаммов АВ2463 и АВ2494. Совершенно очевидно, что штамм АВ1157 за 56 лет с момента получения в 1962 г. должен был претерпеть генетические изменения. Следовательно, для определения объема спонтан-

ных изменений мы сравнили геномы двух линий АВ1157, имеющих совершенно разную историю хранения и культивирования, т.е. существовавшие все эти годы (1962—2018) в различных лабораториях. Две линии АВ1157 отличались всего на 8 мутаций (АВ1157 — 3 мутации и АВ1157 alt — 5) и все они произошли в разных генах. Различие в количестве мутаций между обеими линиями АВ1157 и мутантами, полученными с помощью НГ, отличается больше, чем на порядок. Однако оценить долю спонтанных мутаций штаммов АВ2463 и АВ2494, возникших в период после обработки НГ и до момента секвенирования, невозможно. Коль скоро мы уже выяснили, что наблюдаемые отличия геномов АВ2463 и АВ2494 от родительского генома АВ1157 есть следствие мутаций, индуцированных НГ, очевидно, что возможная доля спонтанных изменений генома АВ1157 сравнительно мала.

Выводы

1. В геномах штаммов *E. coli* аннотированы ранее неизвестные мутации, соответствующие широко известным генетическим маркерам.

2. Сотни отличий геномов штаммов АВ2463 *recA13* и АВ2494 *lexA1*, с одной стороны, и родительского штамма

AB1157, с другой стороны, в подавляющем большинстве обусловлены мутациями, индуцированными НГ.

3. Мутации в геномах штаммов АВ2463 и АВ2494 распределены беспорядочно, т.е. не образуют «горячих районов» или «горячих точек».

4. Выявленные нами мутации в геноме штамма АВ2463 не совпадают ни по одной из позиций ни с мутациями в геноме штамма АВ2494, ни с мутациями в геноме штамма АВ1885.

5. За период с момента разделения клонов АВ1157 и АВ1157 alt до момента секвенирования (56 лет) в геномах этих штаммов возникли 8 мутаций, которые могут считаться спонтанными.

6. За период с момента разделения клонов *E. coli* K12 (NCBI) и АВ1157 до моментов секвенирования их геномов в геномах этих штаммов возникло 120—122 отличий.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Adelberg EA, Burns SN. Genetic variation in the sex factor of *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology*. 1960;79:321-330. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC278688/pdf/jbacter00488-0027.pdf>
- DeWitt S, Adelberg E. The occurrence of a genetic transposition in a strain of *Escherichia coli*. *Genetics*. 1962;47:577-685. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1210353/pdf/577.pdf>
- Howard-Flanders P, Boyce RP, Theriot L. Three loci in *Escherichia coli* K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA. *Genetics*. 1966;53:1119-1136.
- Howard-Flanders P, Theriot L. Mutants of *Escherichia coli* K-12 defective in DNA repair and in genetic recombination TL — 53. *Genetics*. 1966;53:1137. <https://doi.org/10.2307/3583555>
- Howard-Flanders P. Genes that control DNA repair and genetic recombination in *Escherichia coli*. *Advances in Biological and Medical Physics*. 1968;12:299-317. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4879502>
- Howard-Flanders P, Theriot L, Stedford JB. Some properties of excision-defective recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal Bacteriology*. 1969;97:1134-1141. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC249825/pdf/jbacter00393-0184.pdf>
- Green MHL, Greenberg J, Donch J. Effect of a *recA* gene on cell division and capsular poly-saccharide production in a *lon* strain of *Escherichia coli*. *Genetics Research*. 1969;14:159-162. <https://doi.org/10.1017/S0016672300001993>
- Ganesan AK, Smith KC. Dark-recovery processes in *Escherichia coli* irradiated with ultraviolet light. 3. Effect of *rec* mutations on recovery of excision-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal Bacteriology*. 1970;102:404-410. Available: <https://pdfs.semanticscholar.org/3017/191fad191b9b4f7ff0735b567521e8750974.pdf>
- Sommer S, Knezevic J, Bailone A, Devoret R. Induction of only one SOS operon, *umuDC*, is required for SOS mutagenesis in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*. 1993;239:137-144. <https://doi.org/10.1007/BF00281612>
- Bodoev IN, Ilina EN, Smirnov GB. Characteristics of Emergence of Mutants Resistant to Nalidixic Acid and Novobiocin in *E.coli* Strains with *recA* and *lexA* Mutations. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2018;33:30-33. <https://doi.org/10.3103/S0891416818010044>
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 2012;9:357-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. 2012; Available: <https://arxiv.org/pdf/1207.3907.pdf>
- Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. 2016; Available: <https://www.cs.umd.edu/class/spring2016/cm-sc702/public/FreeBayesDraft2015Jan12.pdf>
- Lucchesi P, Caraway M, Marinus MG. Analysis of forward mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the bacteriophage P22 *mnt* repressor gene. *Journal Bacteriology*. 1986;166:34-37. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3957871>
- Wright BE, Minnick MF. Reversion rates in a *leuB* auxotroph of *Escherichia coli* K-12 correlate with ppGpp levels during exponential growth. *Microbiology*. 1997;143:847-854. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-3-847>
- Serebrijski I, Reyes O, Leblon G. Corrected gene assignments of *Escherichia coli* Pro- mutations. *Journal Bacteriology*. 1995;177:7261-7264. <https://doi.org/10.1128/jb.177.24.7261-7264.1995>
- Song Y, Lee BR, Cho S, Cho YB, Kim SW, Kang TJ, et al. Determination of single nucleotide variants in *Escherichia coli* DH5 α by using short-read sequencing. *FEMS Microbiology Letters*. 2015;362:1-7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv073>
- Lange R, Hengge-Aronis R. The cellular concentration of the σ s subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes & Development*. 1994;8:1600-1612. <https://doi.org/10.1101/gad.8.13.1600>
- Sun H, Zeng J, Li S, Liang P, Zheng C, Liu Y, et al. Interaction between *rpsL* and *gyrA* mutations affects the fitness and dual resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates against streptomycin and fluoroquinolones. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:431-440. <https://doi.org/10.2147/IDR.S152335>
- Lin LL, Little JW. Isolation and characterization of noncleavable (Ind-) mutants of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *Journal Bacteriology*. 1988;170:2163-2173. <https://doi.org/10.1128/jb.170.5.2163-2173.1988>
- Lin LL, Little JW. Autodigestion and RecA-dependent cleavage of Ind- mutant LexA proteins. *Journal of Molecular Biology*. 1989;210:439-452. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90121-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90121-6)

Поступила в редакцию 26.02.19

Received 26.02.19

После доработки 16.04.19

Revised 16.04.19

Принята к публикации 16.04.19

Accepted 16.04.19