

СРАВНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПЛАЗМИД Р ГРУППЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ

В. А. САКАНЯН, М. А. КРУПЕНКО

Проведен гетеродуплексный и гибридизационный анализ плазмид RP4, R906 и R751. Сравнены генетические карты этих плазмид. В геноме R906 идентифицирован новый транспозон Tn4322. Несмотря на эволюционную удаленность плазмид R906 и R751 от RP4 (прототип IncP плазмид), они сохраняют характерный для IncP плазмиды признак генетической организации.

Ключевые слова: плазмида, генетическая карта, физическая карта, транспозон, эволюция.

Изучение биологии плазмид Р группы несовместимости (IncP), характеризующихся широким спектром бактериальных хозяев [11], важно как с точки зрения понимания механизмов поддержания и наследования плазмид в неродственных бактериях, так и эффективного приложения методологии геномной инженерии к иным, нежели *Escherichia coli*, граммотрицательным прокариотам. Наиболее изученным представителем IncP группы является плазмида RP4 или идентичные ей плазмиды RK2 [7, 10] и RP1 [10]. Показано, что IncP плазмиды, детерминирующие общие признаки устойчивости к тетрациклину и канамицину, имеют протяжную область гомологии (принятую за гипотетический остов) с ДНК RP4 [17]. Две IncP плазмиды—R906 и R751, эволюционно отошедшие от плазмиды RP4 [6, 17], также характеризуются высокой степенью гомологии как в отношении RP4, так и друг друга [6]. В настоящей работе проведен дальнейший сравнительный анализ организации плазмид R751, R906 и RP4. На основании полученных данных детализированы генетические карты плазмид R751 и R906 и установлены закономерности организации IncP плазмид с широким спектром хозяев.

Материал и методика. Использовали плазмиды RP4 (Tc^r Ap^r Km^r), R906 (Ap^r Sm^r Su^r Hg^r), R751 (Tr^r), pAS8 (Tc^r Ap^r Km^r, ColE1^{imm}), последняя получена соединением плазмид RP4 и ColE1 по их уникальным сайтам EcoRI [9], а также делеционный мутант pRP401 (Tc^r Ap^r), сохраняющий приблизительно 40% генома RP4 [4].

Перенос фрагментированных ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозные фильтры осуществляли по описанной методике [15], образцы гетеродуплексов плазмидных ДНК готовили как описано ранее [8]. Условия выделения ДНК, рестрикции, электрофореза и нук-трансляции описаны в других работах [2, 4, 7].

Результаты и обсуждение. Оценивая собственные данные по гибридизационному анализу IncP плазмид [5, 6], мы предположили неточности в опубликованной рестрикционной карте плазмиды R751 [14], которую использовали для интерпретации наших результатов. Поэтому проведен новый рестрикционный анализ этой плазмиды в отношении

нескольких ферментов и в результате построена ее измененная карта, которая согласуется с картой, построенной другими авторами [18]. Расположение фрагментов ДНК R751, гибридизующихся с ^{32}P -мечеными пробами, показано на рис. 1. На рис. 2 и 3 суммированы результаты гибридизационного и гетеродуплексного анализов плазмид RP4 и R906, полученные в предыдущих [1, 5, 6] и настоящей работах.

Чтобы оценить степень гомологии и расположить специфические районы гомологии в геноме IncP плазмид проведен гетеродуплексный анализ ДНК R906/pAS8 и R751/pAS8. Выбор рекомбинантной плазмиды pAS8 был обусловлен возможностью использования дополнительного критерия оценки гетеродуплексов—интегрированного по сайту EcoRI плазмиды RP4 фактора ColE1.

Полученные гетеродуплексы характеризуются достаточно сложной картиной—наличием областей гомологии, прерываемых различными вставками, делециями и симметричными петлями замещения. Общая сумма гомологии между ДНК R751 и RP4 составляет 68,6 и 62,8% величины геномов R751 и RP4 соответственно, а между ДНК R906 и RP4—54,3 и 52,8% величины геномов R906 и RP4 соответственно. Для интерпретации микрофотографий гетеродуплексов мы основывались на известных генетических и физических данных этих плазмид, а также результатах гетеродуплексного анализа плазмид R751 и R906, проведенного ранее [5, 6].

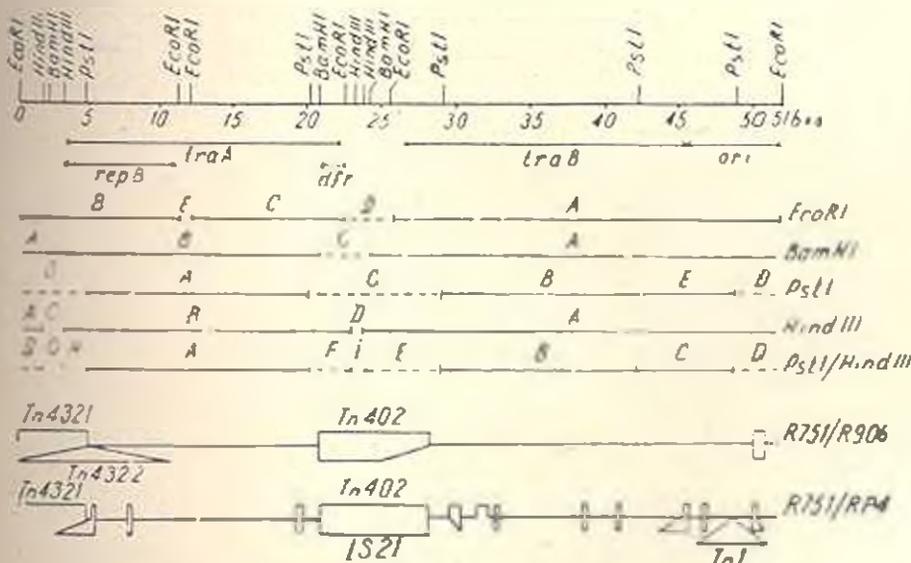


Рис. 1. Генетическая и физическая карта плазмиды R751 и схемы результатов гибридизационного и гетеродуплексного анализов этой плазмиды и отношении плазмид R906 и RP4. Справа указаны рестриктазы, использованные в опытах по гибридизационному анализу; заглавными буквами обозначены соответствующие рестрикты; сильногибридизующиеся фрагменты ДНК отмечены сплошной линией, слабогибридизующиеся—пунктиром.

Анализ гетеродуплексов позволил выявить в геноме R906 транспозонподобную структуру длиной ~11,5 ко с коротким инвертированным повтором (<100 пар оснований) на конце. Эта структура, получающая

регистрационный номер Тп4322, охватывает гены устойчивости к стрептомицину, ионам ртути и, возможно, ампициллину. В опытах по изучению свойства несовместимости замечено, что в популяции клеток, изначально приобретших плазмиды R906 и RP4, иногда наблюдается совместное наследование признака Sm^r (но не Su^r) плазмиды R906 с T^r и Km^r признаками плазмиды RP4. Кроме того, признак Sm^r может передаваться совместно с признаками устойчивости плазмиды RP4 репликентному штамму в конъюгационных скрещиваниях (признаки Ap^r и Hg^r не анализировались). Функциональная способность гена *slt* плазмиды R906 к перемещению на другой репликон свидетельствует о том, что Тп4322 является истинным транспозоном.

Результаты гибридизационного и гетеродуплексного анализов хорошо согласуются с известными генетическими данными этих плазмид. Более того, учитывая непрерывный характер гомологии по определенным районам ДНК исследуемых плазмид, можно с большой вероятностью экстраполировать позиции большинства генов хорошо изученной

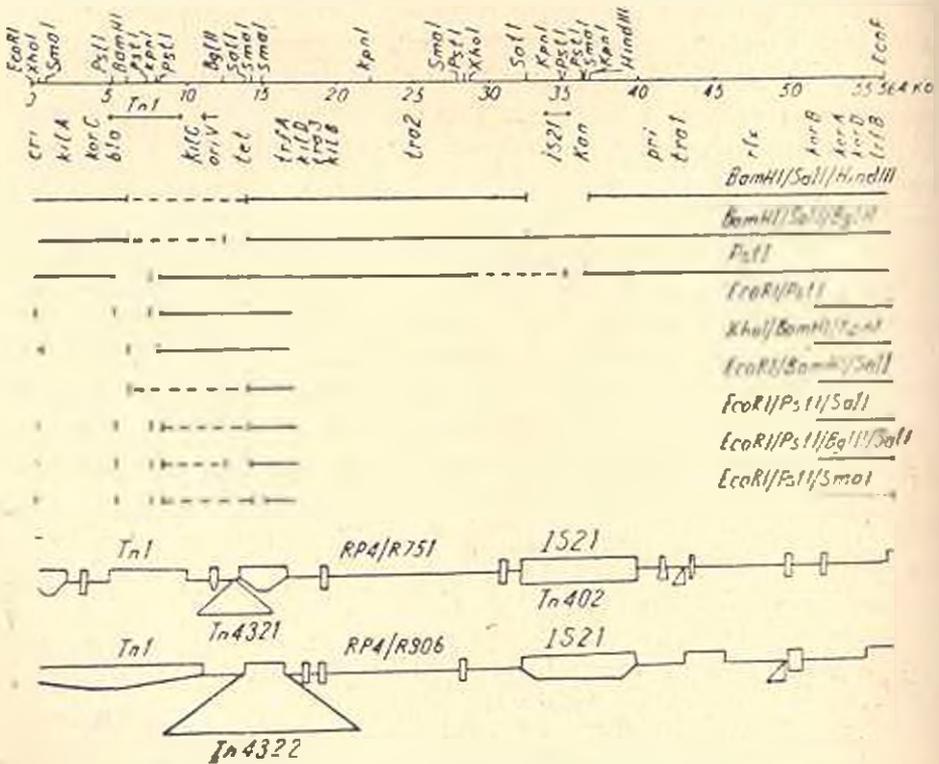


Рис. 2. Генетическая и физическая карта плазмиды RP4 и схемы результатов гибридизационного и гетеродуплексного анализов этой плазмиды в отношении плазмид R751 и R906. Верхние три примера представляют результаты гибридизации в отношении рестриктов ДНК RP4, нижние шесть примеров — рестриктов ДНК rRP401 (у этого делеционного мутанта утрачена область ДНК с координатами ~ 17—50 kb карты RP4).

плазмиды RP4 на карты плазмид R751 и R906 (рис. 4). Однако следует отметить, что в силу некоторой неопределенности локализации ряда генов на карте RP4, истинное присутствие их в геноме R751 и R906 требует дополнительных доказательств. Нельзя пока говорить и о полной

идентичности генов, расположенных в пределах районов гомологии, из-за ограничений в разрешающей способности гетеродуплексного анализа.

Представленные результаты объясняют некоторые генетические данные. В частности, в районе расположения сайта *EcoRI* плазмиды *RP4* идентифицирован ген, ответственный за проявление несовместимости только в отношении гомологичного репликаона, но не плазмид *R751* и *R906* [3]. Согласно гетеродуплексному анализу, плазмида *RP4* не имеет гомологии по этому району с ДНК *R751* и *R906* (рис. 2 и 4). По-

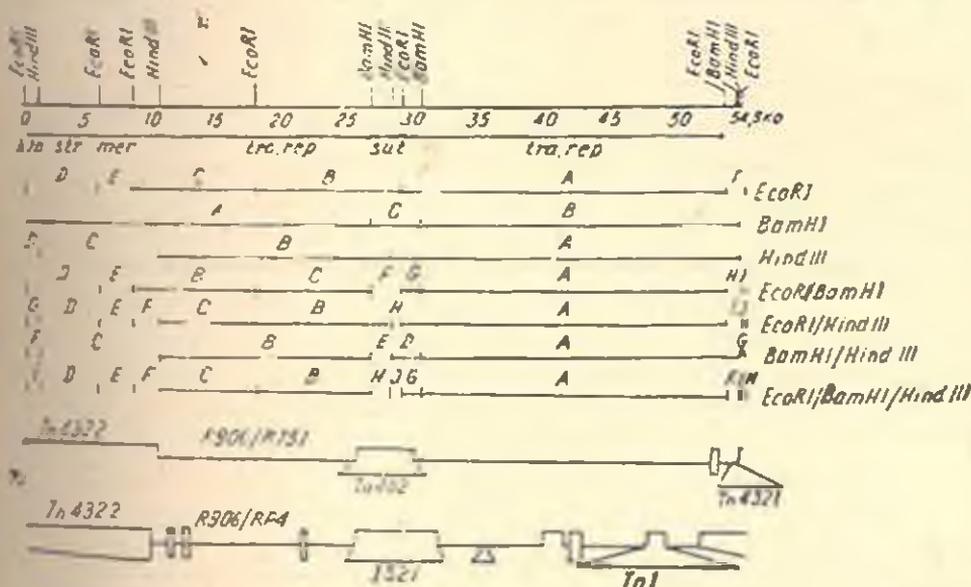


Рис. 3 Генетическая и физическая карта плазмиды *R906* и схемы результатов гибридационного и гетеродуплексного анализа этой плазмиды в отношении плазмид *R751* и *RP4*. *BamIII*-С фрагмент ДНК *R906* и его субфрагменты не гибридизуются с ³²P-меченой ДНК *RP4*.

казано также, что функция ингибирования фертильности плазмиды *R388* из *InсW* группы, детерминированная районом ДНК *RP1* с координатами ~28–34 ко, отсутствует у плазмид *R751* и *R906* [19]. В согласии с этим плазмиды *R751* и *R906* не имеют гомологии с соответствующим районом ДНК *RP4* (рис. 2 и 4).

Анализ полученных данных позволяет говорить о некоторых закономерностях генетической организации *InсP* плазмид с широким спектром хозяев.

В ДНК трех плазмид—*RP4*, *R751* и *R906*—присутствуют две функционально неоднозначные области, в одной из которых расположены существенные гены и гены конъюгативности, в другой—«несущественные» гены с γ -детерминантами (рис. 4). Область существенных генов и генов конъюгативности у трех плазмид характеризуется высокой консервативностью. То же показано для *InсP* плазмид, детерминирующих общий признак устойчивости к тетрациклину и канамицину [17]. Результаты исследований этих авторов и наши данные суммированы на рис. 5. У всех анализируемых *InсP* плазмид гипотетический остов физически разобщен какой-либо вставочной последовательностью из

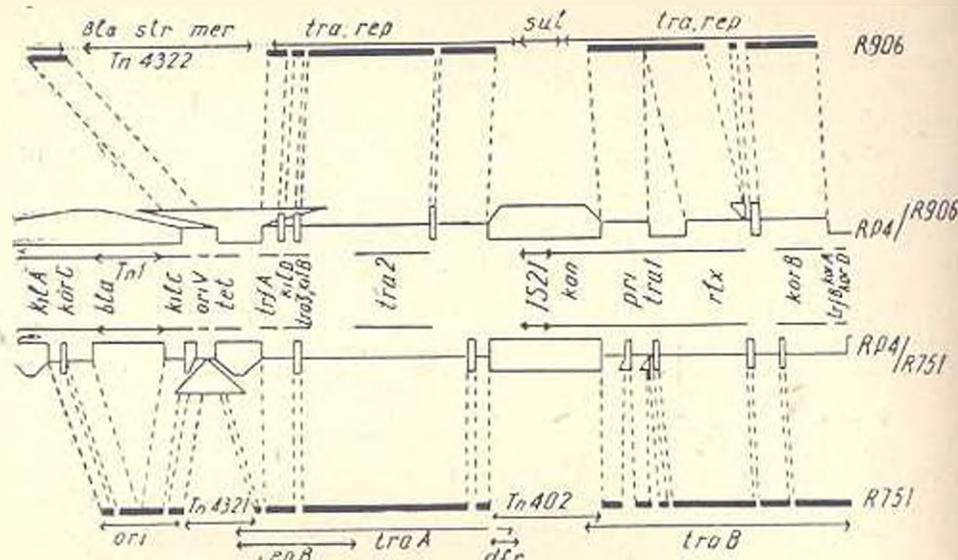


Рис. 4. Детализация карт R906 и R751 относительно карты RP4 и схемы гетеродуплексов RP4/R906 и RP4/R751. На картах R906 и R751 указаны позиции известных генетических маркеров; пунктиром отмечены участки экстраполяции данных плазмиды RP4 на геномы R906 и R751 по районам гомологии (отмечены толстой линией).

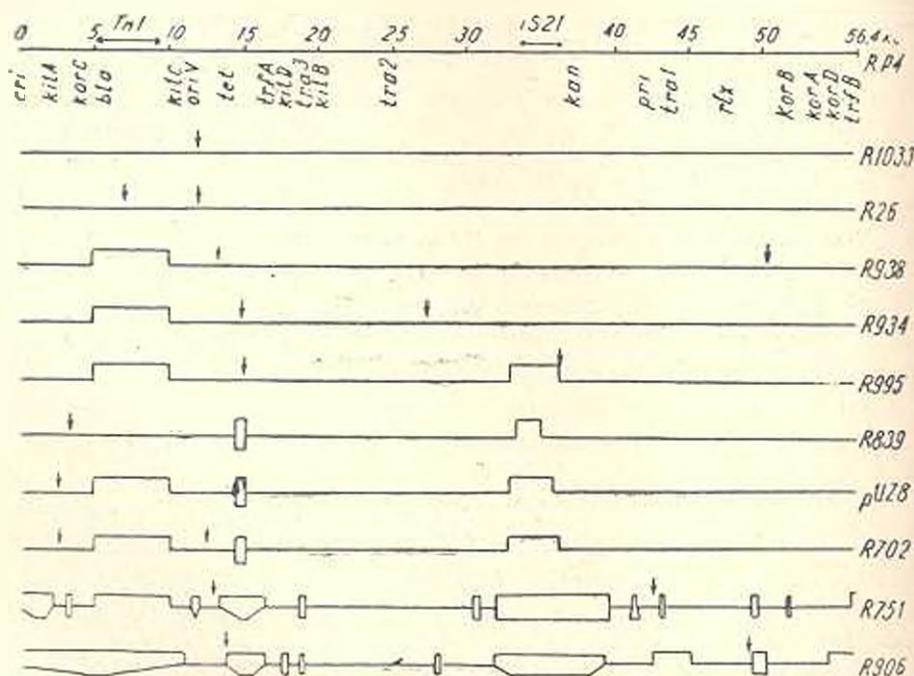


Рис. 5. Сравнение структуры плазмид IncP группы. Анализ плазмид R751 и R906 проведен в настоящей работе, остальных плазмид — в работе [17]. Стрелками указаны места вставок.

два района. По крайней мере у плазмид RP4 [12], R751 [14] и R906 [1] каждый из этих районов в отдельности не может быть ни делегирован, ни клонирован, что связано с разбросанным характером расположения репликационных генов *oriV* и *trf* [8, 16] и генов *kil* и *koq*, влияющих на жизнеспособность клетки-хозяина [13].

Сайты расщепления для крупноцепных рестриктаз преимущественно сгруппированы в районах «несущественных» генов, что говорит об относительно недавнем приобретении последних. Возможно, что насыщенность «несущественных» участков ДНК рестрикционными сайтами отражает скорость эволюции IncP плазмид.

В большинстве случаев г-детерминанты IncP плазмид локализованы на транспозонах. Отсутствие гомологии на районах расположения *bla* генов плазмид RP4 и R906 свидетельствует о разных источниках этих генов. Они могли быть приобретены на транспозонах в результате попадания IncP прототипа в неродственные грамотрицательные бактерии.

По-видимому, эволюционные преобразования IncP плазмид осуществлялись преимущественно путем выпадения и интеграции сегментов ДНК (рис. 5). Можно согласиться с предположением [17], согласно которому эти преобразования происходили по «горячим» участкам IncP прототипа.

Если учесть, что структура плазмид R906 и R751 по сравнению с другими плазмидами претерпела существенные изменения, то можно говорить об их большей эволюционной удаленности от IncP прототипа — плазмиды RP4. Наиболее крупные изменения у плазмид R906 и R751 произошли по участкам, соответствующим расположению г-детерминант в геноме RP4. В консервативных же областях гомологии IncP плазмид преобразования носят характер небольших замен и deletions.

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

Поступило 11.IX 1985 г.

Ր ԱՆՆԱՐԱՏՆԳԵԼԻՈՒԹՅԱՆ ԿԵՐԻ ՊԼԱՁՄԻԳՆԻՐԻ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ԳԱՁՄԱԿԵՐՊՈՒՄԱՆ ՀԱՄԵՐԱՏՈՒԹՅՈՒՆԸ

Վ. Ա. ՍԱՔԱՅԱՆ, Մ. Ա. ԿՐՈՒԳԵԼՅԱՆ

Կատարված է RP4, R906 և R751 պլազմիդների հետերոդուպլիքս և հիբրիդիզացիոն անալիզը: Երևան և Նախկին աշխատանքների տվյալների հիման վրա համեմատված են պլազմիդների գենետիկական բարտեզները: R906 գենոմում հայտնաբերված է նոր Tn 4322 տրանսպոզոնը: Չնայած R 906 և R 751 պլազմիդների էվոլյուցիոն հետազոտությանը RP4-ից (Inc P) պլազմիդի պրոտոտիպը, նրանք պահպանում են IncP պլազմիդներին բնորոշ գենետիկական կազմակերպման սկզբունքը:

COMPARISON OF GENETIC ORGANIZATION OF PLASMIDS OF THE P GROUP INCOMPATIBILITY

V. A. SAKANYAN, M. A. KRUPENKO

Genetic and physical maps of the plasmids RP4, R751 and R906 have been compared on the basis of heteroduplex and hybridization data. New transposon Tn4322 has been identified on the plasmid R906. The plasmids R906 and R751 have the same principle of genetic organization of IncP plasmids in spite of less evolutionary relatedness with RP4 genome (IncP prototype). Possible features of genetic organization of IncP plasmids are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Азарян Н. Г., Саканян В. А. Биолог. ж. Арменки, 36, 836—841, 1983.
2. Азарян Н. Г., Саканян В. А., Крупенко М. А., Алиханян С. И. Генетика, 18, 1636—1644, 1982.
3. Рябченко Л. Е. Автореф. канд. дисс., М., 1985.
4. Рябченко Л. Е., Добровольски П., Саканян В. А. Генетика, 18, 1453—1461, 1982.
5. Саканян В. А., Азарян Н. Г., Крупенко М. А. Мол. биол., 19, 964—973, 1985.
6. Саканян В. А., Крупенко М. А., Алиханян С. И. Генетика, 19, 1409—1417, 1983.
7. Саканян В. А., Крупенко М. А., Рябченко Л. Е., Пермогоров В. И., Алиханян С. И. Генетика, 15, 972—988, 1979.
8. Саканян В. А., Якубов Л. З., Алиханян С. И., Степанов А. И. Генетика, 15, 853—866, 1978.
9. Степанов А. И., Зимица М. С., Хлебалина О. И., Рабинович П. М., Бебуров М. Ю., Дебабов В. Г. Генетика, 12, 162—164, 1976.
10. Burkhardt H. J., Riess G., Fuhler A. J. Gen. Microbiol., 111, 341—348, 1979.
11. Datta N., Hedges R. W. J. Gen. Microbiol., 70, 453—460, 1972.
12. Figurski D. H., Hellnski D. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1648—1652, 1979.
13. Figurski D. H., Pohlman R. F., Bechhofer D. H., Prince A. S., Kelton C. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1935—1939, 1982.
14. Meyer R. J., Shapiro J. A. J. Bacteriol., 113, 1352—1373, 1980.
15. Smith G. E., Summers M. D. Anal. Biochem., 109, 123—129, 1980.
16. Thomas C., Meyer R., Hellnski D. R. J. Bacteriol., 113, 213—222, 1980.
17. Villarroel R., Hedges R. W., Maenhaut R., Leenans J., Engler G., Van Montagu M., Schell J. Mol. Gen. Genet., 189, 390—399, 1983.
18. Ward J. M., Grinstead J. Plasmid, 8, 241—252, 1982.
19. Yuzoff K., Stantisch V. A. Plasmid, 11, 178—181, 1984.