

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 576.858.9:756.815.48

К. Г. Исаханова, В. Н. Вербенко, Ж. А. Кцоян, И. Н. Саркисян,  
И. В. Вартерсян, академик НАН Армении К. Г. Карагезян

**Природная плазмида pSD89 Cm<sup>r</sup> из *Salmonella derby* K89,  
компенсирующая мутацию pol A<sup>-</sup> у *Escherichia coli* K-12**

(Представлено 30/XI 1996)

В литературе существуют различные предположения относительно функций, выполняемых плазмидными генами защиты и мутагенной ветви репарации, и об их взаимодействии с SOS-системой бактерии-хозяина. В свою очередь известно, что ферменту ДНК-полимеразе I отведена ключевая роль в процессах эксцизионной репарации ДНК. В ряде работ высказывается предположение о возможности обнаружения полимеразной активности, экспрессируемой с некоторых плазмид (<sup>1</sup>). Однако следует указать на тот факт, что подобные работы в литературе встречаются крайне редко и в большинстве своем отражают самые ранние этапы изучения закодированных на плазмидах генов. Данные, полученные на более поздних стадиях изучения, либо не подтверждают полимеразной активности, обусловленной плазмидой, либо свидетельствуют о взаимодействии плазмидных продуктов с полимеразой клетки-хозяина (<sup>2</sup>).

В предыдущих работах по изучению плазмиды pSD89 были проведены биохимические эксперименты по измерению активности ДНК-полимеразы I в двух родительских штаммах *S. derby* K89 и K82, отличающихся по присутствию R-плазмиды, и было показано, что бесплазмидный вариант *S. derby* K89 проявлял резко пониженную активность ДНК-полимеразы по сравнению с активностью фермента клеток дикого типа (<sup>3</sup>). Эти результаты указывают на возможную ассоциацию активности ДНК-полимеразы с R-плазмидой pSDK89. Были выдвинуты две альтернативные гипотезы. Согласно первой в случае с плазмидой pSD89 мы имеем дело со структурным геном ДНК-полимеразы типа I *E. coli*; согласно второй, изучаемая плазмида несет какой-то супрессор хромосомной pol-мутации, например, amberg-супрессор или активатор криптического хромосомного ДНК-полимеразного гена. Вероятность супрессии была проверена в

этих же исследованиях, и оказалось, что на R-плазмиде нет супрессора подобной *amber*-мутации (3).

Таким образом, предполагалось, что R-плазида содержит структурный ген ДНК-полимеразы, отличной, как показали эксперименты по гибридизации с Кленовским фрагментом, от ДНК-полимеразы типа I *E. coli*.

В дальнейшем, в серии экспериментов с различными мутантами *E. coli*, где были выделены трансформанты *E. coli*<sup>x</sup> pSD89 Cm<sup>r</sup>, в которых плазида pSD89Cm<sup>r</sup> обуславливала защитный эффект к воздействию УФ-света и  $\gamma$ -лучей, было указано на приобретение дополнительной радиоустойчивости, но не полной компенсации дефекта трансформированных плазмидой pSD89Cm<sup>r</sup> клеток мутантного штамма *pol* A6 *E. coli*, что не могло дать представления о работе полимеразы I в репаративных процессах, обусловленных внесенной плазмидой (4). Из литературных данных известно о весьма точной работе полимеразы I, и любое нарушение этой точности могло бы привести к необратимым нарушениям репаративного процесса. Неполная компенсация дефекта в данном случае говорит как раз о том факте, что большая часть репаративных процессов все же точна, и речь тут может идти либо о каком-нибудь другом фрагменте, либо о какой-то другой измененной форме ДНК-полимеразы I.

В настоящей статье показано, что именно работой полимеразного гена плазмиды или его аналога обусловлено повышение радиоустойчивости штаммов *S. derby* и *E. coli* при наличии в них плазмиды pSD89 Cm<sup>r</sup>.

В качестве объекта для трансформации был выбран мутант *E. coli* по чувствительности к температуре, Ts-мутация в котором сцеплена с генетическим локусом полимеразы I. Ранее было обнаружено, что штаммы *E. coli*, несущие либо мутацию *pol*A1, либо *pol*A12, приводящие к дефектной полимеразной активности, не способны расти при 42°C. В этих условиях ингибирование синтеза ДНК приводит к ее полной деградации и, соответственно, к потере клеточной выживаемости. После проверки нескольких штаммов, несущих указанную мутацию (*pol*A12), был выбран самый жизнеспособный (КД 1996).

Штамм *pol*A12 после трансформации к хлорамфениколустойчивости проверялся на присутствие неселектируемого маркера — устойчивости к температуре (42°C). Как следовало из Spot-теста, проведенного для штамма-реципиента (*pol*A12) и трансформанта *pol*A12/pSD89 Cm<sup>r</sup>, при 42°C выживали только колонии полученных трансформантов, что говорило о компенсации дефекта чувствительности к температуре штамма-хозяина и, соответственно, предполагало нормальную работу полимеразы I при данной температуре.

Проведенный в данной работе эксперимент с использованием мутанта *pol*A12, в котором *pol*-мутация сцеплена с маркером чувствительности к высокой температуре, позволила нам продемонстрировать более четкий защитный эффект плазмиды pSD89 Cm<sup>r</sup> в дефектных по полимеразе I клетках *E. coli*, облученных УФ-светом и  $\gamma$ -лучами. Простейшим объяснением жизнеспособности этого мутанта после введения плазмиды pSD89 Cm<sup>r</sup> в условиях повышенной

температуры могло бы стать присутствие полимеразного гена на плазмиде. Однако полученный результат сам по себе еще не доказывает того факта, что именно полимеразная активность, экспрессируемая с плазмиды, обуславливала в клетке значительную часть ее защитного потенциала при облучении.

Ведь не исключается возможность активации плазмидой pSD89 Cm<sup>r</sup> какого-то хромосомного гена ДНК-полимеразы в мутантном штамме, заставляя клетку продуцировать полимеразный белковый продукт, оперирующий по репаративному пути. Для более убедительного доказательства предположения о наличии гена pol на исследуемой плазмиде была предпринята параллельная с pSD89 трансформация клеток мутантного штамма плазмидой pBR. Последняя, как свидетельствуют литературные данные, не работает в отсутствие активно-функционирующего хозяйского гена полимеразы I. Spot-тест на воздействие высокой температуры ясно показал нежизнеспособность полученных трансформантов polA127 pBR, высеянных на чашку с максимальной средой, в то время как клетки, полученные путем трансформации плазмидной ДНК *S. derby* K89 в дефектный по полимеразе I мутант *E. coli*, давали большое количество колоний при 42°C. Таким образом, эти результаты наглядно продемонстрировали жизнеспособность трансформантов polA12/pSD89 Cm<sup>r</sup> при высокой температуре, в отличие от polA12/pBR. Это позволяет нам предположить, исходя из особенностей действия плазмиды pBR, которая не функционирует в отсутствие полимеразной активности в клетке-хозяине, что исследуемая плаزمида pSD89 Cm<sup>r</sup> действительно несет полимеразный генетический локус, и это отражается на увеличении выживаемости штамма polA12/pSD89 Cm<sup>r</sup> при высокой температуре.

Итак, суммируя результаты данного, а также ранее проведенных экспериментов по переносу плазмиды pSD89 Cm<sup>r</sup> на генетический фон *E. coli* (5), можно утверждать, что она играет существенную роль в повышении устойчивости клеток *E. coli*, дефектных по полимеразе I, к воздействию радиации и высокой температуры, что в некоторой степени подтверждает ранее сделанное предположение об ассоциации активности аналога ДНК-полимеразы I с pSD89 (3). В качестве аналога полимеразы I в бактериальных клетках *S. derby* можно подразумевать некую форму ДНК-полимеразы I, экспрессирующуюся, к примеру, в штаммах *E. coli* с конститутивным SOS-ответом (6).

В этой связи особый интерес представляет факт, выявленный в работе (4), где донорный штамм *S. derby* K89 оказался значительно менее устойчивым к воздействию как УФ-света, так и  $\gamma$ -лучей, нежели его бесплазмидный дериват *S. derby* K89. Для объяснения данного факта имеются следующие альтернативы: 1) вероятность интерференции плазмидной ДНК-полимеразы с хромосомной ДНК-полимеразой в процессах репарации (3); 2) вероятность интерференции двух автономно-реплицирующихся плазмид — pSD89 Cm<sup>r</sup> и pSD89Sm<sup>r</sup> из штамма *S. derby* K89, первая из которых, как уже отмечалось, обуславливает

фенотип  $\gamma$  и УФ-резистентности, в то время как другая, сцепленная с маркером устойчивости к Sm, в значительной степени сенсибилизирует клетки донорного штамма S. derby K89: 3) учитывая влияние R-плазмиды S. derby K89 на морфо-физиологические и биохимические процессы, происходящие в мембранах клеток S. derby, можно утверждать, что при отсутствии плазмиды pSD89 запускается антирадикальный механизм защиты бактериальной клетки от воздействия радиации.

Таким образом, изложенное выше свидетельствует в пользу того, что R-плазида pSD89 обуславливает радиорезистентность бактериальных клеток S. derby и E. coli, запуская механизмы репарации ДНК, повышающие (pSD89 Cm<sup>r</sup>) или снижающие (pSD89 Sm<sup>r</sup>) общий репаративный потенциал клетки, а в случае S. derby, возможно, также воздействуя на качественный и количественный состав структурных компонентов мембран клеток, меняет их антирадикальную активность.

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Կ. Գ. ԻՍԱԿՉԱՆՈՎԱ, Վ. Ն. ՎԵՐԲԵՆԿՈ, Ժ. Ա. ԿՇՈՅԱՆ, Ն. Ն. ՍԱՐԳՍՅԱՆ,  
Ի. Վ. ՎԱՐԳԵՐԵՍՅԱՆ, Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՐԱԿՅՈՋՅԱՆ,

S. derby K89-ի pSD89 Cm<sup>r</sup> բնական պլազմիդը, որը կոմպենսացնում է  
E. coli K-12-ի polA մուտացիան

pSD89 Cm<sup>r</sup> պլազմիդը տրանսֆորմացիոն տեղափոխությունը E. coli polA թերմոզ-  
գայուն մուտանտ բջիջներ (թերմոմուտացիան Ts այդ բջիջներում գուգորդված է պոլիմե-  
րազա I-ի գենետիկական լուկուսի հետ) բերում է տրանսֆորմանտ polA12/pSD89 Cm<sup>r</sup>  
բջիջների առաջացման, որոնք ցուցաբերում են բացարձակ կենսունակություն բարձր ջեր-  
մաստիճանի դեպքում (42°C): Այս տվյալները վկայում են ջերմաստիճանի նկատմամբ  
զգայնության դեֆեկտի կոմպենսացումը և համապատասխանաբար ենթադրում է  
տեր-բջիջ պոլիմերազային դեֆեկտի կոմպենսացում:

Առումանտ բջիջների բարձր ջերմաստիճանում կենսունակության բարձրացման գոր-  
ծում պլազմիդի pol-գենի մասնակցության համոզիչ ապացուցման համար իրականացվել  
է կոնտրոլ էքսպերիմենտ: Իրականացվել է pBR պլազմիդի տրանսֆորմացիա Ts-մու-  
տանտ բջիջներ, քանի որ հայտնի է այդ պլազմիդի անալիսատունակությունը տեր-բջիջնե-  
րի պոլիմերազա I գենի ակտիվ-գործունեության բացակայության դեպքում: Ստացված  
բոլոր տրանսֆորմանտները T=42°C դեպքում խիստ անկենսունակ են:

Այսպիսով, այս աշխատանքում ստացված են լրացուցիչ ապացույցներ պլազմիդի պոլի-  
մերազա I գեն-անալոգի առկայության վերաբերյալ և նրա դերը ուսումնասիրվող պլազ-  
միդի պաշտպանիչ էֆեկտի ապահովման գործում:

#### ЛИТЕРАТУРА – ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- <sup>1</sup> J Radicella, J. Bacteriol., v 175, p.7732-7736 (1993). <sup>2</sup> A Potter e a., Mut. Res., v.131,  
p 197-204 (1984). <sup>3</sup> Н.Н.Саркисян и др., Биохимия, т.50, с.673-679 (1985).  
<sup>4</sup> K.Isakchanova, V.Verbenko e a., Abstracts of Internat. Congr. on Radiation Prot., Vienna,  
p 61-64, 1996. <sup>5</sup> K.Isakchanova e a., PNPI Res. Report, Gatchina, p.33-40, 1996.  
<sup>6</sup> D Lacey, S Krauss, Proc. Nat. Acad. Sci., v 79, p 330-334 (1982).