

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 576.858.9:756.815.48

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

**Изменение радиочувствительности бактериальных клеток
Salmonella derby и *Escherichia coli*, трансформированных
плазмидой pSD89 Sm^r из *S. derby* K89**

(Представлено 11/IX 1996)

Эффективным подходом как для изучения этапов репарации, лимитирующих репаративный потенциал бактериальных клеток, так и для управления устойчивостью к неблагоприятным факторам среды является клонирование генов систем репарации и рекомбинации. Однако высокая концентрация белковых продуктов, как правило, возникающая при использовании многокопийных плазмид для клонирования, может интерферировать с нормальной репарацией и рекомбинацией. В то же время ряд природных плазмид, например, pR46, ее производная pKM101, pTR110, pCol1, а также сенсibiliзирующая плаزمида pR391 обладают способностью усиливать или ослаблять устойчивость к инактивирующему действию УФ-света и ряда химических агентов.

Природная плазмида pR89 из штамма *Salmonella derby* K89, выделенная из клинического материала, в связи с проблемой множественной лекарственной устойчивости (Sm, Sm, Pn) привлекла внимание ввиду предварительных указаний на то, что излеченный от плазмид вариант *S. derby* K82 отличается по чувствительности к инактивирующему воздействию УФ-света (1) от родительского штамма. Результаты, полученные нами (2), показали, что содержащий плазмиду штамм оказался более чувствителен к действию ионизирующей радиации в сравнении с бесплазмидным вариантом. Методом электрофореза в агарозе было подтверждено наличие нескольких плазмид в штамме *S. derby* K89 с молекулярными весами от 2 до 60 Мд. В этой же работе были выявлены защитные фенотипические свойства плазмиды pSD89 Sm^r – участка валовой плазмидной ДНК с молекулярным весом 13,2 Мд, ранее рассматриваемым в связи с аналогом ДНК-полимеразы I *E. coli* (1).

Исходя из электрофоретических результатов, показавших, что валовая плазмидная ДНК содержит несколько плазмид, а также из предварительных

указаний на то, что дикий тип *S. derby* K89 устойчив к нескольким типам антибиотиков, было высказано предположение о том, что именно с плазмидами, несущими другую, отличную от *Sm* лекарственную резистентность, связана повышенная радиочувствительность дикого типа *S. derby* K89 по сравнению с *S. derby* K82.

В отношении *Sm* подтвердились ранее полученные результаты по жизнеспособности плазмидного штамма *S. derby* K89 (3) на среде, содержащей высокую концентрацию этого антибиотика (8 тыс. мкг/мл). Выживаемость клеток штамма *S. derby* K82 в этих условиях крайне низкая. Целью настоящей работы стало получение однородной бактериальной культуры, несущей именно данный участок плазмиды, сцепленный с маркером устойчивости к *Sm*. Перенос исследуемого плазмидного участка на генетический фон *E. coli* и изучение последствий трансформации для радиочувствительности штаммов *S. derby* и *E. coli*.

Работы проводили на природном, условно-патогенном штамме *S. derby* K89, изолированном из клинического материала (4), его бесплазмидном производном *S. derby* K82, а также на диком типе *E. coli* K-12 – AB1157.

Для выращивания бактериальных культур использовали: максимальную среду, среду со стрептомицином в концентрации действия 8 тыс. мкг/мл. Для разведения и облучения клеток использовали буфер М9. Культуры штаммов выращивали при 30°C в АП-бульоне с добавлением стрептомицина в случае плазмидных вариантов. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса, трансформацию клеток кальциевым методом и электрофоретическое разделение плазмидной ДНК проводили по общепринятым методикам (5).

В наших исследованиях проведена проверка на наличие плазмидной ДНК в трансформантах AB1157/pSD89 *Sm*^r и K82/pSD89 *Sm*^r, полученных путем переноса плазмиды pSD89 *Sm*^r в бесплазмидные клетки реципиентных штаммов *S. derby* и *E. coli*.

После трансформации штаммов K82 и AB1157 с отбором по устойчивости к стрептомицину обнаруживается только одна плазида. Сравнение с маркерными плазмидными ДНК позволяет оценить молекулярный вес плазмиды pSD89 *Sm*^r как равный 3,6 Мд.

Трансформанты K82/pSD89 *Sm*^r и AB1157/pSD89 *Sm*^r оказались значительно более чувствительными к γ -лучам, чем их бесплазмидные варианты. ФИД=1,8 при $S=0,37$ и 1,9 при $S=10^{-7}$ в случае K82/pSD89 *Sm*^r. Радиочувствительность трансформанта AB1157/pSD89 *Sm*^r оказалась также почти вдвое выше, чем у реципиента. ФИД=2,02 при $S=0,37$ и ФИД=1,5 при выживаемости, равной 10^{-7} .

Для проверки полученных путем трансформации бактериальных штаммов на устойчивость к воздействию УФ-света был проведен спот-тест. Все полученные в данной работе трансформанты отличались от исходных штаммов по

своим радиобиологическим характеристикам. Было убедительно продемонстрировано значительное снижение выживаемости штаммов *S. derby* K82 и *E. coli* AB1157 после занесения в них плазмиды pSD89 Sm^r в условиях УФ-облучения.

Учитывая тот факт, что трансформанты AB1157/pSD89 Sm^r и K82/pSD89 Sm^r оказались более радиочувствительными по сравнению с реципиентными штаммами, можно предположить, что фенотип Gam^s сцеплен с детерминантой устойчивости к стрептомицину и что, что всей видимости, эта плазида несет ген, продукт которого может снижать репаративный потенциал бактериальных клеток *S. derby*.

Исходя из результатов настоящей работы, можно утверждать, что нам удалось получить другую, отличную от pSD89 Cm^r плазмиду pSD89 Sm^r, сцепленную с маркером устойчивости к стрептомицину, входящую в состав валовой плазмидной ДНК *S. derby*, и что, возможно, именно этой плазмидой обусловлена повышенная чувствительность дикого типа *S. derby* K89 к воздействию радиации по сравнению с бесплазмидным вариантом *S. derby* K82. Вероятно, тут мы имеем дело с двумя автономно-реплицирующимися плазмидами, одна из которых, pSD89 Cm^r, обуславливает защитные фенотипические свойства донорного штамма, в то время как другая, pSD89 Sm^r, экспрессирует сенсibiliзирующий эффект в ответ на воздействие как γ -лучей, так и УФ-света, и специфическое взаимодействие этих двух плазмид является причиной столь значительной разницы в выживаемости плазмидного и бесплазмидного штаммов *S. derby* в процессе облучения.

В свою очередь, может быть вполне обоснованной альтернатива опосредованного механизма защиты бактериальной клетки, обусловленного отсутствием R-плазмиды и связанного с изменениями в структуре мембраны биохимическими процессами, происходящими в ней, так как отсутствие плазмиды влияет на липидный состав клеточной стенки, меняя физико-химическую характеристику липидов (6). К тому же отсутствие плазмиды приводит к резкому, почти 10-кратному уменьшению фосфолипидов мембраны (6). Было показано (6), что R-плазида влияет на антирадикальную активность клеточной стенки, которая, как известно, имеет важное значение в ответе бактериальных клеток на воздействие радиации (7).

Таким образом, можно заключить, что белковые продукты, экспрессируемые с R-плазмиды pR89, либо прямо, как показали результаты предыдущей работы (2), полученные на мутантных штаммах *E. coli*, а также эксперименты, проведенные в настоящем исследовании, участвуя в различных репаративных процессах клетки, либо опосредованно, через антирадикальный механизм защиты могут обуславливать ту или иную степень устойчивости бактериальной клетки к воздействию облучения.

Институт молекулярной биологии НАН Армении

Կ. Գ. ԻՍԱԽԱՆՈՎԱ, Վ. Ն. ՎԵՐԲԵՆԿՈ, Ժ. Ա. ԿՇՈՅԱՆ, Ն. Ն. ՍԱՐԳՍՅԱՆ,
Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Կ. Գ. ՂԱՐԱԳՅՈՉՅԱՆ, Ի. Վ. ՎԱՐԴԵՐԵՍՅԱՆ

**S. derby K89-ից pSD 89Sm^r պլազմիդայով տրանսֆորմացված Salmonella derby
և Escherichia coli բակտերիալ բջիջների ռադիոզգայնության փոփոխությունը**

pSD 89 թնական պլազմիդան մեկուսացվել է S. derby K89 կլոնիկական նյութից, այդ
պլազմիդան S. derby K89 և E. coli K12 պլազմիդազուրկ բջիջներ տրանսֆորմացնելու
միջոցով, ընտրելով Sm^r-տրանսֆորմատորները:

Ստացված S. derby K82 (pSD89Sm^r և E. coli K12) pSD89Sm^r տրանսֆորմանտներ-
ում էլեկտրոֆորեզի մեթոդով ցույց է տրված մեկ պլազմիդի առկայությունը՝ 3,6 Md
մոլ. կշռով: Sm-ի նկատմամբ կայուն տրանսֆորմատորները դրսևորում են զգայնություն
γ-ճառագայթների և ՈՒՑ-լույսի նկատմամբ, ռեցիպիենտ բջիջների հետ համեմատած:

Ինքնուրույն ռեպլիկացվող պլազմիդան 3,6 Md մոլ կշռով, պայմանավորում է
S. derby դոնոր շտամի և E. coli տրանսֆորմանտների զգայնության ֆենոտիպը ՈՒՑ-
լույսի և γ-ճառագայթների նկատմամբ:

ЛИТЕРАТУРА – ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

¹ Н.Н.Саркисян, Р.Г.Антонян, М.Г.Светлова и др., Биохимия, т.50, №4, с.673-679
(1985). ² К.Г.Исаханова, В.Н.Вербенко, Тезисы науч. школы "Мол. биология: конец
XX века", Черноголовка, 1995. ³ Ж.А.Кцоян, А.С.Таисова и др., Антибиотики и химио-
терапия, т.33, №10, с.760 (1988). ⁴ М.К.Вартанян, Б.П.Карабеков, Материалы II
науч. конф. ИЭБ АН АрмССР, Ереван, вып.22, 1968. ⁵ Э.Маниатис, Э.Фрич,
Дж.Самбрук, Методы генной инженерии. Молекулярное клонирование, М., Мир,
1984. ⁶ А.З.Пепоян, Ж.А.Кцоян, А.А.Шагинян и др., Биофизика, т.36, №3, с.475-479
(1991). ⁷ Е.Б.Бурлакова, Л.Н.Шишкина, Инф. бюл., Научный совет АН СССР по
проблемам радиобиологии, №35, с.11-12 (1989).