

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Изучение организации перспективных в биотехнологическом отношении прокариотических организмов в первую очередь предполагает комплексное исследование всех наследственных структур, в том числе и внехромосомных генетических элементов, являющихся частью генетического аппарата и определяющих ряд важнейших этапов жизнедеятельности бактериальной клетки-хозяина.

В этом плане определенный интерес представляют повсеместно распространенные в природе бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, способные утилизировать широкий спектр органических и неорганических веществ, продуцировать различные биологически активные соединения (ферменты, антибиотики, стимуляторы роста растений и т.д.), вызывать заболевания растений, животных и человека.

Одним из подходов при создании эффективных систем генетического анализа прокариотических организмов, позволяющих изучить тонкую структуру и функции генетического материала, а также обеспечивающих возможность конструирования штаммов-продуцентов биологически активных соединений, является использование для этих целей внехромосомных генетических элементов.

Плазмиды, представляя собой, как правило, небольшие кольцевые молекулы ДНК, являются удобными объектами молекулярной биологии, позволяющими решать комплекс задач фундаментального и прикладного характера. В частности, они могут успешно использоваться при изучении молекулярных механизмов основных биологических процессов: репликации, рекомбинации, репарации, транскрипции, трансляции, регуляции экспрессии генов и др. В практическом отношении плазмиды с успехом применяются при конструировании векторов для транспозонного мутагенеза и молекулярного клонирования в биотехнологических целях.

В связи с вышесказанным, весьма актуальным является выявление и изучение новых внехромосомных генетических элементов природных бактериальных штаммов, поскольку именно в естественных условиях возникают новые комбинации генов, детерминирующие биологически значимые признаки.

Настоящая работа посвящена изучению плазмид бактерий рода *Pseudomonas* и *Bacillus*, поскольку отдельные представители этих таксономических групп микроорганизмов достаточно хорошо охарактеризованы в генетическом и биохимическом отношении (например, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*) и имеют практическую значимость. Подобного рода исследования не только призваны расширить представления об организации генетического аппарата прокариотических организмов в целом, но и обеспечить необходимые предпосылки для различного рода генетических манипуляций с целью конструирования штаммов бактерий с полезными для практического использования свойствами.

Связь работы с крупными научными программами, темами. Значительная часть настоящего исследования проводилась в рамках научно-исследовательских тем и программ: INTAS97-1464 «Function analysis of genes on plasmids in *Bacillus*» (1999-2001), INTAS-99-01487 «The *Pseudomonas* horizontal gene pool: the role of IncP-9 plasmids in the diversity of this genus» (2000-2003), INTAS 01-2383 «Characterisation and exploitation of plasmids controlling biodegradation of naphthalene by *Pseudomonas* species» (2002-2005), «Молекулярно-генетический анализ систем репликации и стабильного поддержания плазмид тета-типа грамположительных и грамотрицательных бактерий (2003-2005)» (N госрегистрации 974), тема 17.17 государственной программы «Генетическая инженерия»: «Создать систему хозяин-вектор для клонирования и экспрессии про- и эукариотических генов в бактериях *Bacillus subtilis*» (2003-2006), тема 13 государственной программы «Биотехнология» «Выделить из природных источников штаммы бактерий *Bacillus subtilis*, наследующие плазмиды различных типов. Охарактеризовать основные свойства плазмид и создать на их основе векторы для молекулярного клонирования» (2004-2006), проект Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Изучение плазмид с тета-типом репликации, содержащихся в штаммах *Bacillus subtilis*, выделенных из почв Беларуси и России» (2004-2006) (N госрегистрации Б04Р-054).

Цель и задачи исследования. Целью представляемой работы являлась характеристика систем репликации наиболее распространенных внехромосомных генетических элементов бактерий *Pseudomonas* и *Bacillus*, выделенных из природной среды обитания, и разработка методов создания на их основе хромосоммобилизующих факторов, векторов для транспозонного мутагенеза и молекулярного клонирования.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Проанализировать плазмидный состав метанол- и нафталинутилизирующих бактерий рода *Pseudomonas*, а также спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis*.
2. Определить таксономическую принадлежность наиболее часто встречающихся в природной среде обитания внехромосомных генетических элементов изучаемых грамотрицательных и грамположительных бактерий.
3. Охарактеризовать круг исходных и потенциальных хозяев плазмид группы несовместимости P-9 и определить характер их наследования в гомо- и гетерологичных бактериях. Изучить сходство систем репликации (*rep*-гены и *oriV*-сайты) и детерминант биodeградации плазмид группы IncP-9.
4. Клонировать, секвенировать и провести функциональный анализ *rep*-области плазмиды pM3 бактерий *P. putida* (IncP-9) и pBS72 бактерий *B. subtilis*.
5. Охарактеризовать свойство температурной нестабильности плазмиды pM3 (IncP-9).
6. Оценить возможность использования плазмиды pM3 в качестве вектора для транспозонного мутагенеза и хромосоммобилизующего фактора.

8. Изучить влияние репликативного аппарата клетки-хозяина на наследование плазмиды pBS72 *B. subtilis*.

9. Определить пригодность плазмиды pBS72 для создания на ее основе вектора для молекулярного клонирования в бактериях *B. subtilis* и *E. coli*.

Объект и предмет исследования. Объектами настоящего исследования являлись плазмиды бактерии природных штаммов *Pseudomonas* и *Bacillus*. Предметом исследования – генетические системы плазмиды pM3 группы несовместимости P-9 и плазмиды тета-типа pBS72, обеспечивающие их репликацию и стабильное поддержание в бактериальном хозяине.

Гипотеза. Изучение внехромосомных генетических элементов, начавшееся в начале 60-х годов прошлого века, позволило расширить представления о возможных путях адаптации бактериального генома к изменяющимся условиям окружающей среды, детализировать механизмы фундаментальных биологических процессов и создать новые биологически безопасные технологии получения модифицированных штаммов микроорганизмов для практического использования.

Повсеместно распространенные и достаточно хорошо изученные в генетическом отношении бактерии рода *Pseudomonas* и *Bacillus* обладают широким метаболическим потенциалом и являются перспективными биотехнологическими объектами. Предполагалось, что изучение плазмидного состава этих микроорганизмов, выделенных из природной среды обитания, позволит выявить новые внехромосомные генетические элементы и разработать на их основе векторные системы пригодные для конструирования штаммов с заданными свойствами.

Методология и методы проведенного исследования. Для решения поставленных задач использовались микробиологические (способы культивирования микроорганизмов, идентификации и фаготипирования), генетические (трансформация, конъюгационные скрещивания и конъюгационное картирование, химический и транспозонный мутагенез), а также основные молекулярно-биологические методы (выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ, клонирование, секвенирование, гибридизационный анализ, репортерные системы анализа).

Научная новизна и значимость полученных результатов. Полученные результаты являются оригинальными и характеризуются новизной.

• Изолирована новая плазида тета-типа pBS72 бактерий *B. subtilis*, которая является уникальной и не имеет аналогов среди известных внехромосомных генетических элементов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

- Показано, что репликоны, подобные рBS72, широко распространены среди бактерий природных штаммов *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси.

- Выявлены хромосомные детерминанты, необходимые для стабильного поддержания плазмиды рBS72, и установлена новая, ранее неописанная функция генов, детерминирующих синтез белков праймосомного комплекса и системы инициации репликации бактериальной хромосомы.

- Изолирована минимальная область плазмидного репликона рBS72, на основе которой создан вектор для молекулярного клонирования в бактериях *B. subtilis*.

- Охарактеризованы плазмиды группы несовместимости Р-9. Выявлен полиморфизм в молекулярной организации областей инициации репликации (*rep*-гене и *oriV*-сайте) и генов, детерминирующих деградацию нафталина (*nahAC*, *nahG*). Показано, что исходными хозяевами плазмид группы IncP-9 могут являться флуоресцирующие и нефлуоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*.

- Впервые клонирован и секвенирован мини-репликон R-плазмиды группы IncP-9. В результате функционального анализа установлено, что для репликации плазмид IncP-9 в бактериях *P. putida* достаточно наличие *rep*-гена и сайта инициации репликации *oriV*, тогда как в гетерологичных хозяевах (*E. coli*) дополнительно требуется присутствие в цис-положении *par*-локуса. Системы репликации подобного типа ранее описаны не были.

- Установлено, что плазмиды рМЗ группы IncP-9 не способны поддерживаться в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* при температуре 37°C (*Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia herbicola*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*). Выявленное свойство позволило сконструировать на основе плазмиды рМЗ суицидный вектор и использовать его для транспозонного мутагенеза бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Практическая (экономическая, социальная) значимость полученных результатов. В процессе выполнения работы было сконструировано два типа векторных систем, которые используются и могут быть использованы в последующем: 1. для интродуцирования различных изменений бактериального генома без нарушения жизненно важных функций хозяина; 2. для изучения при молекулярном клонировании экспрессии генетического материала и создания биотехнологически ценных штаммов с заданными свойствами.

На основе плазмиды рМЗ (IncP-9) созданы универсальные векторные системы для транспозонного мутагенеза бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus*. Полученные конструкции успешно использованы в научных и практических целях, в частности для получения серии мутантных штаммов фитопатогенных бактерий *Erwinia*.

На основе плазмиды рBS72 создана векторная система для молекулярного клонирования в клетках штаммов *B. subtilis*, используемых в биотехнологиче-

ских процессах. Сконструированные плазмиды пригодны для клонирования чужеродных молекул ДНК размером до 10 kb и являются базовыми для создания векторов специального назначения, в частности векторов регулируемой экспрессии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- В клетках природных штаммов метанол- и нафталинутилизирующих бактерий рода *Pseudomonas* с высокой частотой обнаруживаются плазмиды группы несовместимости P-9. Указанные внехромосомные генетические элементы характеризуются полиморфностью генетических детерминант, обеспечивающих инициацию репликации (*rep*-ген и *oriV*-сайт) и биodeградацию нафталина (*nahAC* и *nahG*).

- Плазмида широкого круга хозяев рМЗ, относящаяся к группе несовместимости P-9, характеризуется структурной и температурной нестабильностью. Свойство термочувствительности проявляется в клетках бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Для репликации плазмиды рМЗ в бактериях *E.coli*, помимо *rep*-гена и сайта инициации репликации *oriV*, необходимо дополнительное присутствие в *cis*-положении *par*-локуса.

- Нестабильность наследования плазмиды рМЗ в клетках бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при температурах выше 37°C связана с функцией системы ее репликации и определяется уровнем экспрессии *rep*-гена, детерминирующего белок инициации репликации.

- Транспозонсодержащие варианты плазмиды рМЗ могут использоваться в качестве хромосоммобилизующих факторов и векторов для транспозонного мутагенеза бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus*.

- В клетках бактерий природных штаммов *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси, широко распространены криптохромосомные плазмиды размером 96,7 kb. Организация систем репликации обнаруженных внехромосомных генетических элементов не имеет соответствующих аналогов среди плазмид грамотрицательных и грамположительных бактерий.

- Репликация плазмиды тета-типа рBS72 осуществляется без участия кодируемого хромосомным геном белка DnaA. Для стабильно наследования данной плазмиды не требуется функция *par*-локуса. Распределение плазмидных копий между дочерними клетками обеспечивается *rep*-геном и сайтом инициации репликации, а также праймосомным комплексом клетки-хозяина.

- Мини-репликон плазмиды рBS72 может служить основой при конструировании векторов для молекулярного клонирования в клетках бактерий *B. subtilis*.

Личный вклад соискателя. Постановка задач, выбор подходов, теоретические разработки и большая часть экспериментальной работы выполнены лично соискателем. Часть экспериментального материала получена при участии аспирантов, магистрантов и студентов (Василенко С.Л., Лагодич В.А., Левчук А.А., Севастьянович Я.Р., Штанюк Я.В., Черва Е.А., Исаенко Е.В, Передирий А.П., Булыга И.М.), руководство которыми осуществлялось непосредственно

соискателем. Неоценимую помощь в обсуждении результатов оказали Ю.К. Фомичев, Н.П. Максимова, В.А. Прокулевич, А.Н. Евтушенков, В.В. Лысак, Прозоров А.А., Жаньер Л., С.Д. Эрлих, К.М. Томас, И.А. Кошелева и другие коллеги из Бирмингемского университета (Англия), Научно-исследовательского агрономического института (Франция), Института генетики им. Вавилова (Москва), Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (Москва), Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пущино-на-Оке), с которыми соискатель сотрудничал на протяжении длительного времени.

Апробация результатов диссертации. Основные результаты работы представлены в материалах и обсуждены: на конференциях «Плаزمиды» (Пущино-на-Оке, 1985, 1986), конференции «Физиология, генетика и биохимия метилотрофных микроорганизмов» (Киев, 1986), V съезде Белорусского общества генетиков и селекционеров (Горки, 1986), Всесоюзных Симпозиумах «Молекулярные механизмы генетических процессов» (Москва, 1987, 1990), VI съезде Белорусского общества генетиков и селекционеров (Минск, 1992), симпозиуме INTAS (Москва, 1999), международной конференции «Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия» (Минск, 2000), симпозиумах INTAS (Москва, 2000, 2001), семинаре «Replication» (Париж, 2000), международном симпозиуме «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология» (Москва, 2001), международном симпозиуме «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология» (Москва, 2001), I координационном совещании по программе INTAS (Минск, 2002), III симпозиуме по программе МЕСВАД (Берлин, 2002), Международной конференции «Микробиология и биотехнология XXI столетия» (Минск, 2002), VIII съезде генетиков и селекционеров Республики Беларусь «Генетика и селекция в XXI веке» (Минск, 2002), конгрессе «Plasmid Biology» (Pittsburgh, 2002), семинаре «Mobile Genetic Element» (Бирмингем, 2003), II координационном совещании по программе INTAS (Бирмингем, 2003), международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 2004), конгрессе «Plasmid Biology» (Корфу, 2004), III координационном совещании по программе INTAS (Корфу, 2004), Международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология» (Минск, 2004).

Опубликованность результатов. Материалы диссертации опубликованы в 57 работах, в том числе в одной монографии, 18 статьях в научных журналах, 15 статьях в сборниках научных работ, 23 тезисах докладов научных конференций, которые достаточно полно отражают содержание работы. Без соавторов опубликована монография и 3 статьи. Общий объем опубликованных материалов составляет 284 стр.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, 4 глав, заключения, списка литературы и приложений. Объем диссертации составляет 258 стр., включая 49 рис. на 52 стр., 54 табл. на 57 стр., 3 приложений на 20 стр. и ссылок использованных источников из 441 наименований, в том числе 378 иностранных, на 36 стр.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ. СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представлен аналитический обзор литературных данных, касающихся организации систем репликации плазмид грамотрицательных и грамположительных бактерий, реплицирующихся в соответствии с механизмом «тета-типа» и «разматывающегося рулона». Приводится современная классификация плазмид и рассматриваются основные принципы организации систем, обеспечивающих репликацию и распределение плазмидных копий между формирующимися в процессе деления дочерними клетками.

На основании проведенного анализа и систематизации имеющихся представлений о молекулярно-генетической организации систем репликации и стабильного поддержания известных внехромосомных генетических элементов грамотрицательных и грамположительных бактерий сформулированы цель и задачи исследования.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

В процессе выполнения данного раздела работы был проанализирован плазмидный состав природных метанол- и нафталинутилизирующих микроорганизмов, а также бактерий *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников.

Установлено, что более 20% метанолутилизирующих бактерий (68 штаммов из 335 проверенных) обладают внехромосомными генетическими элементами размером от 3,5 до 160 kb. При этом половина изученных бактерий (37 штаммов из 68) содержит единичные внехромосомные генетические элементы, среди которых наиболее часто встречаются плазмиды размером 75 kb, имеющие идентичные сайты рестрикции (рис. 1) и детерминирующие устойчивость к стрептомицину и тетрациклину.

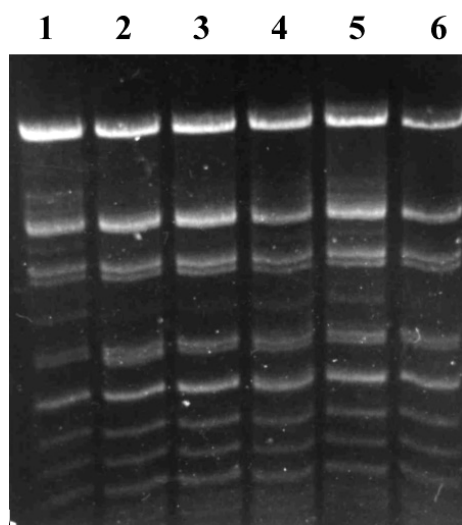


Рис. 1. Электрофореграмма *PstI*-фрагментов плазмидной ДНК, выделенной из клеток шести различных штаммов *Pseudomonas*. Цифрами обозначены номера дорожек. 1 – штамм 7; 2 – штамм 139; 3 – штамм 180; 4 – штамм 195; 5 – штамм 198; 6 – штамм 253.

На основании теста на несовместимость одна из этих плазмид (pM3 из бактерий штамма 253) была идентифицирована как новая R-плазмида группы несовместимости P-9 (табл. 1).

Таблица 1

Совместимость плазмиды pM3 с тесторной плазмидой группы IncP-9

Донор	Реципиент	Группа несовместимости плазмид реципиента	Частота переноса плазмиды pM3	Плазмиды трансконъюгантов
<i>P. putida</i> M (pM3)	<i>P. putida</i> BS483	плазмида отсутствует	$5,6 \times 10^{-2}$	pM3
	<i>P. putida</i> BS483 (R2)	P-9	$1,8 \times 10^{-5}$	pM3

Клетки 50% природных штаммов нафталинутилизирующих бактерий содержат плазмиды группы IncP-9 (30 штаммов из 60). Анализ плазмидных репликационных групп IncP-9 позволил выявить полиморфизм входящих в их состав последовательностей ДНК, определяющих инициацию репликации.

Не выявлено ни одной плазмиды β -подгруппы (типовой плазмидой данной подгруппы является pWWO). Показано, что все изолированные R-плазмиды (pM3, p80, p77) входят в α -подгруппу, большинство D-плазмид (например pNL4, pNL35, pNL33) принадлежат к δ -подгруппе (типовой плазмидой данной подгруппы является pDTG1), а плазмиды pNL60, pNL15 и pNL28, pNL25 образуют новые подгруппы, соответственно обозначенные как ζ -, η - и P-9-подобные. Последние в наибольшей степени отличаются от плазмид группы IncP-9, поскольку не обладают гомологией в области *rep*-гена, но имеют сходные с плазмидами IncP-9 сайты инициации репликации. В табл. 2 приведены данные, показывающие сходство последовательностей сайта *oriV* плазмид группы IncP-9 природных штаммов метанолутилизирующих (плазмиды pM3, p80, p77) и нафталинутилизирующих бактерий (плазмиды pNL4, pNL35, pNL33, pNL60, pNL15, pNL28, pNL25), а также типовой плазмиды β - (pWWO) и δ -подгруппы (pDTG1).

Рестрикционный анализ продуктов амплификации генов *nahAc* и *nahG*, детерминирующих синтез ключевых ферментов деградации нафталина (нафталин-1,2-диоксигеназы и салицилат-1-гидроксилазы) позволил установить, что помимо известных типов последовательностей этих генов две плазмиды (pNL55 и pNL22) природных нафталинутилизирующих штаммов содержат новые типы *nahG*-детерминант. В отличие от известных NAH7- и A88-типов исследованные последовательности содержат другие сайты рестрикции для фермента RsaI.

На основании рестрикционного анализа продуктов амплификации генов 16S рибосомальной РНК установлено, что плазмиды биodeградации нафталина могут наследоваться клетками *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* и *P. species*, а также нефлуоресцирующими бактериями не установленной таксоно-

мической принадлежности. Сиквен-анализ генов 16S рибосомальной РНК позволил идентифицировать исходные хозяева R-плазмид как *P. putida* и *Burkholderia caryophylli*.

Таблица 2
Сходство нуклеотидных последовательностей *oriV*-сайта плазмид группы IncP-9

	pDTG1	pNL4	pNL33	pNL35	pNL60	p77	pM3	p80	pNL15	pWW0	pNL28	pNL25
pDTG1	100	100	100	100	90	73	72	73	73	71	66	66
pNL4		100	100	100	90	73	72	73	73	71	66	66
pNL33			100	100	90	73	72	73	73	71	66	66
pNL35				100	90	73	72	73	71	71	66	66
pNL60					100	73	73	73	73	72	68	68
p77						100	100	100	90	88	66	66
pM3							100	100	90	87	66	66
p80								100	90	88	66	66
pNL15									100	89	67	67
pWW0										100	65	65
pNL28											100	100
pNL25												100

Примечание: сходство последовательностей ДНК установлено с помощью программы ClustalX и выражено в %.

Среди природных грамположительных бактерий *B. subtilis* клетки 20% штаммов содержат внехромосомные генетические элементы (11 штаммов из 55) размером от 6,3 до более 90 kb. При этом в клетках 6 штаммов обнаружено по две плазмиды (размером 8,0 и 96,4 kb), остальные бактерии обладали одиночными плазмидами (размером 6,3, 8 и 96,4 kb) (рис. 2).

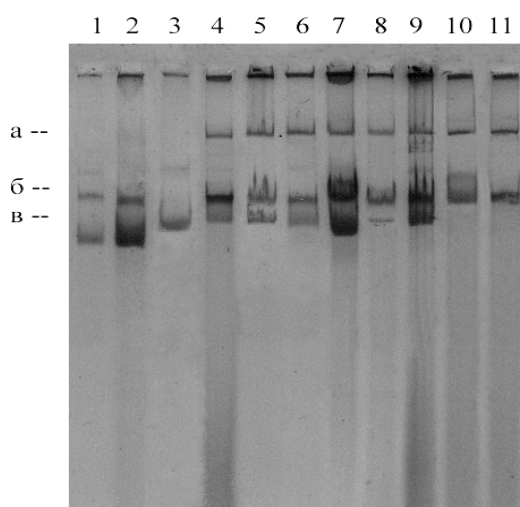


Рис. 2. Электрофореграмма плазмидных ДНК природных штаммов *B. subtilis*.

Цифрами обозначены номера дорожек. 1 – штамм 21Z; 3 – штамм 1; 4 – штамм 57; 5 – штамм N1; 6 – штамм 2; 7 – штамм 4; 8 – штамм 8; 9 – штамм 15; 10 – штамм 19; 11 – штамм 72.

а, в – плазмидная ДНК; б – хромосомальная ДНК.

Таксономическая принадлежность исследованных плазмидсодержащих штаммов к виду *B. subtilis* была подтверждена посредством фаготипирования, рекомбинационного анализа и рестрикционного анализа продуктов амплификации генов 16S рибосомальной РНК. Классификация плазмид бактерий *B. subtilis* осуществлялась посредством гибридизационного анализа. Для этого были клонированы *rep*-области девяти плазмид размером до 10 kb и двух плазмид размером более 90 kb. В результате гибридизационного анализа с использованием в качестве зонда клонированных репликонов установлено, что плазмиды размером до 10 kb принадлежат к рС194 семейству, а плазмиды тета-типа размером 96,7 kb не обнаруживают гомологии ни с одной из известных плазмид грамположительных бактерий (рис. 3).

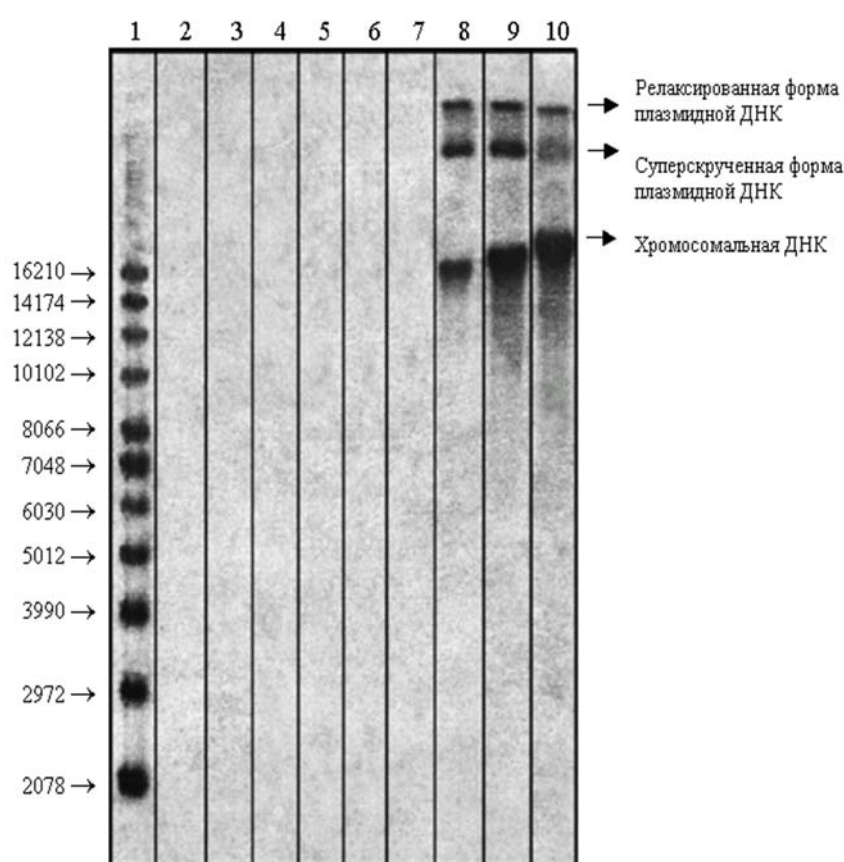


Рис. 3. Результаты гибридизации ДНК типовых и природных плазмид с мини-репликоном рМТLBS72, меченным [α - 32 P]dCTP. Цифрами обозначены номера дорожек. 1 – реперная ДНК; 2-7 – типовые плазмиды грамположительных бактерий (2 – репликон рAM β 1; 3 – репликон рTB19; 4 – рT181; 5 – рE194; 6 – рC194; 7 – рLS20); 8-10 – крупные плазмиды, выделенные из природных штаммов (8 – штамм N1; 9 – штамм 8; 10 – штамм 19). Числа слева указывают размер фрагментов, образующихся в результате электрофоретического фракционирования молекул реперной ДНК (в п.н.).

Широкое распространение плазмид группы IncP-9 среди природных грамотрицательных бактерий и новых криптических плазмид тета-типа среди грамположительных бактерий обосновало дальнейшее более детальное изучение двух из них, а именно R-плазмиды рМЗ бактерий *P. putida* (штамм 253) и рBS72 бактерий *B. subtilis* (штамм 72).

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИДЫ рМЗ (INC P-9) БАКТЕРИЙ *P. putida*

При выполнении данного раздела работы было установлено, что плазида рМЗ, детерминирующая устойчивость к тетрациклину и стрептомицину, способна передаваться при конъюгации в клетки различных грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas* и семейства *Enterobacteriaceae*. При этом

уровни резистентности к стрептомицину и тетрациклину, обеспечиваемые плазмидой рМЗ, в реципиентных бактериях практически всех видов *Pseudomonas* (за исключением *P. mendocina*) не отличались от таковых исходного хозяина. В клетках реципиентных бактерий других родов уровень резистентности к указанным антибиотикам существенно снижался (примерно на два порядка) (табл. 4).

Таблица 4

Наследование плазмиды рМЗ клетками грамотрицательных бактерий

Бактерии-реципиенты	Частота восприятия плазмиды	Уровни устойчивости трансконъюгантов (мкг/мл) к		Сохранность плазмиды (в %) при	
		Tc	Sm	28°C	37°C
<i>P. putida</i> M	$1,9 \times 10^{-1}$	1000	3000	100	-
<i>P. putida</i> pPG1	$5,8 \times 10^{-7}$	1000	2000	100	-
<i>P. aeruginosa</i> PAT	$1,0 \times 10^{-7}$	1500	3000	100	100
<i>P. mendocina</i> BKMB1299	$3,3 \times 10^{-5}$	300	500	100	100
<i>P. fluorescens</i> B172	$3,8 \times 10^{-8}$	1000	1000	100	-
<i>P. stutzeri</i> BKMB148	$1,1 \times 10^{-7}$	500	3000	100	100
<i>P. syringae</i> 345	$6,8 \times 10^{-7}$	1000	3000	100	-
<i>P. diminuta</i> BKMB968	$2,5 \times 10^{-7}$	1000	2500	100	100
<i>P. methylica</i> 2	$1,8 \times 10^{-8}$	1500	3000	100	-
<i>M. capsulatum</i> ИМ65	$1,1 \times 10^{-8}$	1500	3000	100	-
<i>Methylobacillus</i> M75	$1,0 \times 10^{-9}$	10	30	100	-
<i>E. coli</i> C600	$1,8 \times 10^{-6}$	50	100	68	0
<i>Erw. chrysanthemi</i> ENA49	$4,6 \times 10^{-6}$	10	100	99	0
<i>Erw. herbicola</i> EH103	$3,1 \times 10^{-7}$	25	100	89	0
<i>Erwinia</i> species 106-7	$4,4 \times 10^{-6}$	50	200	90	0
<i>S. typhimurium</i> 487	$1,6 \times 10^{-7}$	100	200	25	0
<i>C. freundii</i> 467	$8,5 \times 10^{-8}$	100	100	47	0
<i>K. aerogenes</i> 62-1	$1,7 \times 10^{-4}$	200	200	99	0
<i>S. marcescens</i> B140	$5,6 \times 10^{-7}$	500	500	99	0
<i>A. chroococcum</i>	$1,9 \times 10^{-7}$	20	10	100	-

Примечание: в качестве доноров во всех скрещиваниях использовали бактерии *P. putida* M 214/рМЗ; "-" отсутствие роста бактерий-хозяев.

Анализ наследования плазмиды рМЗ бактериями семейства *Enterobacteriaceae* выявил зависимость от температуры нестабильность, тогда как в клетках *Pseudomonas* эта же плазида стабильно сохранялась независимо от температуры культивирования (табл. 4).

Как указывалось выше, плазмиды группы несовместимости Р-9 характеризуются полиморфностью областей инициации репликации. Поскольку *rep*-область служит основной функциональной единицей, определяющей сохранение внехромосомного элемента в бактериальной популяции, представлялось интересным выяснить насколько отличается стабильность наследования плазмиды

мид разных подгрупп IncP-9 клетками *E. coli* по сравнению с плазмидой pM3. Для этого на первом этапе была осуществлена инсерция транспозона мини-Tn5 (детерминирует устойчивость к канамицину) в плазмиды биodeградации нафталина pBS101 (β -подгруппа), pNL4 (δ -подгруппа), pNL29 (ξ -подгруппа), pNL15 (η -подгруппа) и капролактама pBS267 (γ -подгруппа). Введение дополнительного селективного маркера позволило осуществлять отбор трансконъюгантов *E. coli*, воспринявших изучавшиеся внехромосомные элементы. Кроме плазмид биodeградации использовалась также R-плазида R2 (ϵ -подгруппа), а в качестве контроля плазида pM3 (α -подгруппа).

Анализ сохранения указанных плазмид клетками *E. coli* выявил различную степень стабильности их наследования. Все изученные плазмиды в той или иной степени способны поддерживаться в реципиентных бактериях при температуре 28°C, но при выращивании плазмидсодержащих клеток *E. coli* при 37°C плазмиды pM3, R2, pBS101, pNL29, pNL4 полностью утрачивались, тогда как плазида pNL15 сохранялась с частотой 2 %, а плазида pBS267 наследовалась стабильно (98 – 100%) (табл. 5).

Таблица 5
Стабильность наследования плазмид группы IncP-9 бактериями *E. coli* C600-2

Плазида	Подгруппа	Частота передачи плазмиды	Стабильность наследования при (в %)	
			28°C	37°C
pM3	α	$5,0 \times 10^{-7}$	78	0
pBS101	β	$2,8 \times 10^{-3}$	70	0
pBS267	γ	$4,0 \times 10^{-5}$	100	98
R2	ϵ	$2,0 \times 10^{-9}$	65	0
pNL4	δ	$2,3 \times 10^{-7}$	68	0
pNL29	ζ	$1,1 \times 10^{-7}$	97	0
pNL15	η	$3,9 \times 10^{-4}$	3	2

Примечание: в качестве доноров использовали бактерии *P. putida* KT2442.

Выявленные различия свидетельствуют в пользу того, что причину температурной нестабильности плазмид IncP-9 скорее всего надо искать в особенностях функционирования самих плазмидных репликонов и данное свойство лишь косвенно связано с влиянием генома клеток-хозяев на определенные этапы репликации плазмидной ДНК и распределения вновь образующихся молекул между дочерними клеткам.

Клонированный мини-репликон pMT2 размером 9,7 kb обладал всеми свойствами, присущими исходной плазмиде pM3, а именно способностью наследоваться клетками различных грамотрицательных бактерий, наличием де-

терминант несовместимости и нестабильностью наследования при 37⁰С в бактериях семейства *Enterobacteriaceae*.

В пределах секвенированной области плазмиды рМТ2 (регистрационный номер AF078924) обнаружено 10 открытых рамок считывания, девять из которых (*orf2-orf10*) детерминируют белки (Rep, ParA, ParB, KorA, TolA, MpfA, MpfB, MpfC и TnpR), гомологичные белковым молекулам, участвующим в инициации репликации, стабильном поддержании и конъюгационном переносе известных внехромосомных генетических элементов, а также в сайт-специфической рекомбинации транспозона Tn21. Особого внимания заслуживают функциональные единицы *rep*- и *par*-областей плазмиды рМТ2, обеспечивающие соответственно инициацию репликации и распределение плазмидных копий по дочерним клеткам. В частности, Rep-белок обнаруживает 44% гомологии с белком инициации репликации плазмиды рВВ1 *Bordetella bronchiseptica*. Однако плаزمиды рМТ2 (IncP-9) и рВВ1 совместимы и стабильно поддерживаются в одной клетке, что свидетельствует об их принадлежности к различным таксономическим группам, и, следовательно, о различиях их систем инициации репликации. Четыре гена *par*-оперона *parA*, *parB*, *korA*, *tolA* детерминируют белки, соответственно гомологичные белку IncC плазмиды R751 IncP-1 (36% гомологии), KorB плазмиды RK2 IncP-1 (24% гомологии), KorA плазмиды R751 IncP-1 (25% гомологии) и TolA бактерий *P. putida* (30% гомологии). Подобная организация *par*-локуса является уникальной и не имеет аналогов среди изученных в этом отношении бактериальных репликонов.

Наличие полной нуклеотидной последовательности мини-репликона рМТ2 создало необходимые предпосылки для изучения системы ее репликации. В результате функционального анализа мини-репликона рМТ2 был выявлен ряд особенностей, характеризующих плазмиды группы IncP-9 в целом.

Во-первых, для репликации плазмид группы IncP-9 в бактериях *P. putida* достаточно присутствие *rep*-гена и сайта инициации репликации, тогда как в клетках *E. coli* дополнительно требуется наличие в цис-положении промоторной области *par*-оперона и *parB*-гена, который может находиться либо в цис-, либо в транс-положении относительно *rep*-области (рис. 4). Функция данных детерминант является строго специфичной и не может компенсироваться аналогичными областями плазмид группы IncP-1.

Роль центромероподобной последовательности, локализованной в пределах промоторной области *par*-оперона и ParB-белка, в процессе репликации плазмиды рМТ2 не определена. По аналогии с известными системами можно полагать, что данные функциональные единицы являются глобальными регуляторами, способными контролировать экспрессию белка инициации репликации плазмиды рМТ2. Следует отметить, что подобного рода системы репликации ранее описаны не были.

Плазмида		Частота образования трансформантов (мкг ДНК)	
		<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>
pMT2		4.8×10^4	1.2×10^3
pBMT	<i>tra</i> <i>parA</i> <i>parB</i> <i>korA</i> <i>tolA</i> <i>res</i> <i>oriV</i> <i>rep</i> <i>orf1</i>	1.5×10^4	1.9×10^3
pBMT-N	_____ Δ _____	2.4×10^4	2.3×10^3
pBMT-R	_____ Δ _____	2.8×10^2	1.1×10^3
pBMT-1	_____ Δ _____	0	4.8×10^3
pBMT-2	_____ Δ _____	0	2.1×10^3
pBMT-3	_____ Δ _____	0	1.3×10^3
pACMT	_____ Δ _____	0	4.1×10^3
pACMT-1	_____ Δ _____	3.2×10^4	н.о.
pACMT-2	_____ Δ _____	2.4×10^4	н.о.
pACMT- Δ parA	_____ Δ _____	1.1×10^4	н.о.
pACMT- Δ parB	_____ Δ _____	0	н.о.
pACMT- Δ korA	_____ Δ _____	5.8×10^2	н.о.
pACMT- Δ tolA	_____ Δ _____	2.4×10^1	н.о.
pACMT-2N	_____ Δ _____	2.3×10^4 *	н.о.
mini-pMT2	_____ Δ _____	0	1.3×10^3

Рис. 4. Результаты функционального анализ *ger*-области плазмиды pMT2 группы IncP-9: Примечание: н.о. – частота трансформации не определялась; * – образование трансформантов наблюдалось только в присутствии ParB-белка; Δ - обозначает положение мутантных локусов.

Детерминанты несовместимости плазмид IncP-9 картируются в области *rep*-гена и последовательности ДНК размером 154 п.н., расположенной в промоторной области *par*-оперона на расстоянии 76 п.н. от стартового кодона *parA*-гена (рис. 5).

Выявленные факты позволяют полагать, что неспособность плазмид группы IncP-9 совместно наследоваться в одной бактериальной клетке связана с системой инициации репликации (конкуренцией близкородственных Rep-белков за связывание с областью *oriV*) и системой распределения плазмидных копий между дочерними клетками при делении (конкуренцией за место прикрепления плазмидной ДНК к клеточной мембране в процессе клеточного деления).

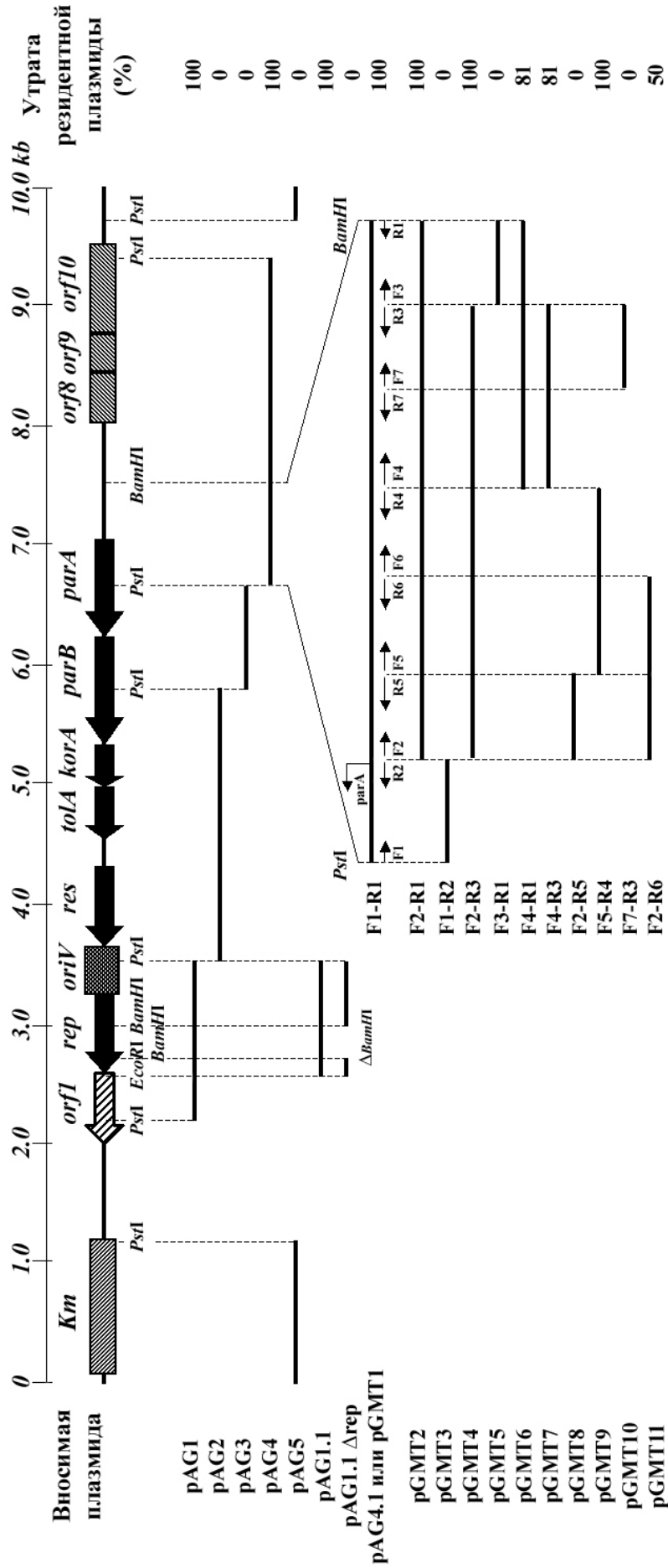
Как указывалось ранее, плазида рМЗ характеризуется свойством температурной нестабильности, проявляющимся в ее утрате клетками при выращивании бактерий-хозяев в течение 20 генераций в неселективных условиях.

Термочувствительность изучалась у мини-репликона рМТ2, который, подобно исходной плазмиде рМЗ, характеризовался нестабильностью наследования в бактериях семейства *Enterobacteriaceae*, и, следовательно, обладал механизмами, оказывающими влияние на данное свойство. Использование минимизированного варианта плазмиды рМЗ имело преимущества, поскольку знание полной нуклеотидной последовательности его ДНК позволяло осуществлять различного рода молекулярно-генетические манипуляции с целью изучения механизмов его наследования в бактериальной клетке.

Известно, что свойство температурной нестабильности у изученных в этом отношении плазмид Rts1 и рPS10 проявляется в клетках гетерологичных хозяев и связано с функцией генетических систем плазмидного генома, определяющих процессы репликации и сегрегации. Исходя из этого, было высказано предположение, что подобного рода механизмы должны иметь место и в случае плазмиды рМТ2, поэтому получение вариантов этой плазмиды с измененной стабильностью наследования должно было способствовать анализу генетических локусов, ответственных за феномен термочувствительности.

Для получения мутантов плазмиды рМТ2 был предпринят подход, заключающийся в отборе спонтанно возникающих терморезистентных вариантов, способных поддерживаться в бактериях *E. coli* при непермиссивной температуре культивирования. Селекцию таких вариантов осуществляли путем выращивания плазмидсодержащих клеток при температуре 37°C в условиях селективного давления (в LB бульон добавлялся канамицин в концентрации 25 мкг/мл).

В результате этих экспериментов был отобран вариант плазмиды рМТ2 (обозначен как рМТ2R), достоверно характеризующийся более высоким уровнем стабильности наследования при температуре 37°C. В непермиссивных температурных условиях культивирования после 20 генераций плазида рМТ2R сохранялась клетками популяции с частотой около 5%.



5. Картирование локусов, ответственных за функцию несовместимости плазмиды рMT2.

Примечание: резидентной плазмидой являлась рMT2R

В результате сиквенс-анализа варианта рМТ2R была выявлена единичная точечная мутация в положении "–10" промоторной области *rep*-гена, возникшая в результате трансверсии, обусловившей замену цитозина на аденин в положении 3273 (рис. 6). Поскольку подобное изменение промоторной области должно сказываться на эффективности транскрипции *rep*-гена, были изучены активности мутантного и исходного промоторов.



Рис. 6. Результаты сиквенс-анализа мутантной плазмиды рМТ2R.

Сверху указана последовательность ДНК промоторной области плазмиды рМТ2, а снизу – соответствующая последовательность плазмиды рМТ2R, жирным шрифтом указано мутационное изменение.

Активность промоторов определялась при наличии и в отсутствии Rep-белка плазмиды рМТ2. В результате было показано, что мутантный промотор характеризуется пятикратным увеличением активности, при этом эффективность обоих промоторов в клетках *E. coli* повышалась при температуре 37°C и ингибировалась при наличии в клетках Rep-белка.

Полученные результаты позволяют предполагать, что стабилизация наследования плазмиды рМТ2R связана с транскрипционной активностью *rep*-промотора и не зависит от изменений его регуляции Rep-белком, что можно было бы ожидать в случае отсутствия ингибирования функции мутантного промотора при выраженной экспрессии *rep*-гена.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что термонестабильность плазмиды рМТ2 в бактериях *E. coli* связана с функцией репликативной системы и зависит от эффективности экспрессии *rep*-гена, детерминирующего синтез белка инициации репликации. Следует отметить, что в этом отношении, плаزمида рМТ2 в некоторой степени напоминает плазмиду рPS10, стабилизация которой в клетках гетерологичных хозяев также связана с системой инициации репликации и повышается при мутациях в LZ-последовательности Rep-белка, приводящих к снижению репрессии промотора *rep*-гена и тем самым увеличению концентрации белка инициации в клетке.

Нестабильность плазмиды рМЗ при 37°C в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* явилась аргументацией попыток создания на ее основе суицидного вектора для транспозонного мутагенеза данных грамотрицательных микроорганизмов. Привлекательность использования плазмиды рМЗ для указанной цели состоит в том, что она нестабильна в клетках энтеробактерий при температурах выше 36°C, а ряд представителей этого семейства, в частности, фитопатогенные *Erwinia*, практически не растут при температурах выше 37°C, в силу чего применение для этих целей известных термочувствительных репликонов, элиминирующихся при 42°C, не представляется возможным.

Исходным материалом для создания суицидных векторов послужил делеционный вариант плазмиды рМЗ, в состав которого были введены транспозоны Tn5 и Tn9.

Культивирование плазмидсодержащих клеток каждого из перечисленных выше штаммов на среде с соответствующим антибиотиком с высокой частотой обуславливало появление клонов, в клетках которых имела место транслокация транспозонов из плазмиды рМТФ59 в хромосому хозяина (табл. 6).

Как видно из таблицы 6 частота транспозиции Tn5 из плазмиды рМТФ59 в хромосому достаточно высокая и в некоторых случаях достигает $1,2 \times 10^{-2}$; при этом регистрировалось появление довольно широкого спектра ауксотрофных мутантов (по следующим маркерам: met^- , his^- , ser^- , arg^- , cys^- , trp^- , leu^- , orn^- , arg^- , thr^- , lys^- , pro^- , aro^- и др.), что свидетельствует о неспецифичности встраивания данного транспозона в хромосому хозяина.

Таблица 6

**Транслокация транспозонов Tn5 и Tn9 из плазмиды рМТФ59
в хромосому бактерий *Enterobacteriaceae***

Штамм	Транспозон	Частота транслокации транспозона	Частота возникновения ауксотрофных мутантов, %.
<i>Erw. herbicola</i> EH103	Tn5 (Km ^R)	$9,9 \times 10^{-4}$	5,5
	Tn9 (Cm ^R)	$1,4 \times 10^{-6}$	0
<i>Erwinia species</i> 106-7	Tn5 (Km ^R)	$5,1 \times 10^{-3}$	1,5
	Tn9 (Cm ^R)	$3,5 \times 10^{-5}$	0
<i>E. coli</i> C600	Tn5 (Km ^R)	$8,8 \times 10^{-3}$	1,1
	Tn9 (Cm ^R)	$1,1 \times 10^{-4}$	0
<i>K. aerogenes</i> 62-1	Tn5 (Km ^R)	$6,7 \times 10^{-3}$	0,4
	Tn9 (Cm ^R)	$1,7 \times 10^{-4}$	0
<i>C. freundii</i> 467	Tn5 (Km ^R)	$1,2 \times 10^{-2}$	0,5
	Tn9 (Cm ^R)	$3,0 \times 10^{-4}$	1,5
<i>S. typhimurium</i> 487	Tn5 (Km ^R)	$3,1 \times 10^{-4}$	2
	Tn9 (Cm ^R)	$4,2 \times 10^{-5}$	3,2
<i>S. marcescens</i> B140	Tn5 (Km ^R)	$2,0 \times 10^{-3}$	0,4
	Tn9 (Cm ^R)	-	-

Примечание: "-" транспозиция не установлена

В то же время транслокация транспозона Tn9 из той же плазмиды в хромосому осуществлялась с более низкой частотой, а в случае бактерий *S. marcescens* его транспозиция вообще не установлена. Появление ауксотрофных мутаций при транслокации Tn9 регистрировалось только у клеток двух штаммов *S. typhimurium* и *C. freundii* с частотой 3,2% - 1,5%, соответственно.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о возможности применения конъюгативной плазмиды рМТФ59 в качестве эффективного суицидного вектора для введения транспозонов в клетки бактерий семейства *Enterobacteriaceae* с целью получения мутантов различного типа.

Результаты, обсуждавшиеся выше, свидетельствуют, что плазмида рМЗ является трансмиссильной плазмидой широкого круга хозяев. Это в свою очередь наводит на мысль о возможности ее использования в качестве хромосоммобилизующего инструмента для конъюгационного генетического анализа определенных видов бактерий.

Анализ хромосоммобилизующей способности плазмиды рМЗ в штаммах *E. coli* и *Erw. chrysanthemi* ENA49 показал, что в изогенных скрещиваниях в случае, если плазмида в клетках-донорах находится в автономном состоянии, формирование доноров типа Hfr не происходит и передача хромосомальных генов не осуществляется. Однако относительно стабильные доноры хромосомальных генов получались при использовании плазмиды, содержащей транспозоны (плазмида рМТФ59). В этом случае транспозиция одного из транспозонов плазмиды (Tn5 или Tn9) в бактериальную хромосому приводила к возникновению областей гомологии в обоих репликациях и создавались условия, обеспечивающие встраивание плазмиды в хромосому, вследствие чего возникала возможность конъюгационного транспорта хромосомальных генов.

Анализ хромосоммобилизующей активности плазмиды рМТФ59 при скрещиваниях бактерий *E. coli* и *Erw. chrysanthemi* ENA49 позволил установить, что частота переноса отдельных генов варьировала в зависимости от типа донорного штамма. Это может указывать на различную локализацию точек начала конъюгационного переноса хромосомы использованных доноров. Контролем служили плазмидсодержащие бактерии, в клетках которых отсутствовали области генетической гомологии, обеспечивающие встраивание плазмиды в хромосому хозяина.

Таким образом, трансмиссильность плазмиды рМЗ обуславливает возможность ее использования в качестве инструмента для создания доноров хромосомальных генов при конъюгационном картировании представителей семейства *Enterobacteriaceae* (например, *Erwinia* и *E. coli*).

Другим способом, позволяющим обеспечить образование доноров Hfr-типа, является подбор клеток-хозяев, в которых при определенных условиях плазмида не способна реплицироваться, но в случае наличия гомологичных нуклеотидных последовательностей в хромосоме и плазмиде за время пребывания в клетке (до элиминирования) может осуществиться процесс интеграции.

Именно таким способом были получены доноры хромосомных генов облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus* M75, которые в стандартных условиях скрещивания не воспринимают плазмиду рМЗ. Однако, если клетки *Methylobacillus* M75, взятые в количестве до 10^{10} кл/мл, скрещивались с донором плазмиды рМЗ (*Erw. chrysanthemi* VY3736) в течении 16 часов, тогда с очень низкой частотой (до 10^{-9}) возникали Tc^R, Sm^R-трансконъюганты *Methylobacillus* M75, клетки которых стабильно наследовали воспринятые маркеры лекарственной устойчивости, однако не обладали способностью передавать плазмиду при конъюгации. Кроме того, посредством электрофоретического анализа у них не обнаруживалась плазмидная ДНК. Выявленные факты дают основание полагать, что после передачи бактериям данного вида плазмида рМЗ способна существовать в них лишь будучи интегрированной в хромосому хозяина.

Поскольку плаزمида рМЗ является трансмиссибельной, её интеграция в хромосому должна обеспечить бактериям способность передавать хромосомные гены при скрещивании с изогенными реципиентами. Действительно в изогенных скрещиваниях *Methylobacillus* M75, наследующих маркеры плазмиды рМЗ, с реципиентными бактериями *Methylobacillus* M75 ($met^- trp^-$) было установлено, что met^+ -рекомбинанты возникают с частотой $9,5 \times 10^{-6}$ (при частоте реверсии $5,0 \times 10^{-9}$). Около 18% trp^+ -рекомбинантов наследовали неселективный met^+ -маркер, в то время как среди met^+ -трансконъюгантов не обнаружено ни одного, который бы одновременно наследовал trp -ген.

Таким образом, конъюгационные эксперименты подтверждают, что бактерии *Methylobacillus* M75, наследующие плазмиду рМЗ, становятся донорами хромосомных генов типа Hfr-доноров *E. coli*, т.е. передача маркеров осуществляется однонаправлено - в описываемом случае met^+ -маркер является проксимальным, а триптофановый располагается более дистально.

Неспособность к автономной репликации плазмиды рМЗ, введенной в клетки облигатных метилотрофных *Methylobacillus* M75, может оказаться перспективным свойством, позволяющим осуществлять с ее помощью транспозонный мутагенез этих генетически малоизученных микроорганизмов. Для этих целей использовали донорные бактерии *Erw. chrysanthemi* VY3736, содержащие плазмиду рМТF59, включающую транспозоны Tn5 и Tn9.

При конъюгационном переносе плазмиды рМТF59 реципиентным клеткам *Methylobacillus* M75, отбираемые на основании приобретения канамицинрезистентности трансконъюганты, возникали с частотой до $6,5 \times 10^{-6}$. Такая относительно высокая частота образования Km^R -трансконъюгантов возможно обусловлена тем, что в данном случае отбираются бесплазмидные варианты клеток, в которых произошла транспозиция Tn5 в хромосому.

Для проверки высказанного предположения была изучена стабильность наследования Km^R -маркера, его способность передаваться при конъюгации в гомологичных и гетерологичных скрещиваниях и наличие автономной плазмидной ДНК. В результате проведенных экспериментов было установлено, что: 1) признак устойчивости к канамицину при культивировании бактерий *Methylobacillus* M75 в неселективных условиях наследуется стабильно; 2) маркер канамицинрезистентности не передается в гомологичных и гетерологичных системах скрещивания; 3) на электрофореграммах не выявляется полоса, соответствующая плазмидной ДНК. Полученные данные могут свидетельствовать о хромосомной локализации Km^R -гена.

В заключительных экспериментах этой серии была установлена передача (с частотой $2,7 \times 10^{-6}$) транспозона Tn5 из хромосомы бактерий *Methylobacillus* M75 в плазмиду RP4 Km^S , путем ее конъюгационного переноса из бактерий *Methylobacillus* M75 (Km^R) клеткам *E. coli* C600, в результате которого регистрировали образование Ap^R , Tc^R , Km^R , Sm^S , Cm^S -трансконъюгантов. Показано, что маркеры Ap^R , Tc^R и Km^R при передаче их в изогенные клетки *E. coli* AB1157 (Rif^R) наследуются совместно. Полученные результаты позволяют считать, что транспозонсодержащие варианты плазмиды рМЗ могут использоваться в качестве векторов для транспозонного мутагенеза бактерий *Methylobacillus* M75.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИДЫ pBS72 БАКТЕРИЙ *B. SUBTILIS*

Мини-репликон плазмиды pBS72 был выделен путем клонирования BglII-фрагментов данной плазмиды в составе вектора *E. coli* pMTL21C. Для детальной характеристики области, ответственной за инициацию репликации и стабильное наследование данной плазмиды в клетках-хозяевах был осуществлен сиквенс-анализ мини-репликона. В пределах секвенированной последовательности *rep*-области плазмиды pBS72 бактерий *B.subtilis* протяженностью в 3081 п.н. (регистрационный номер AY102630), обнаружено четыре открытые рамки считывания, для двух из которых (*orf1* и неполной открытой рамки считывания *orf4*) установлена гомология с известными белковыми молекулами, обеспечивающими инициацию репликации хромосомы (белком DnaA) и сегрегацию дочерних молекул ДНК в процессе клеточного деления (белком семейства ParA/Soj) (рис. 7).

Открытая рамка считывания *orf4*, кодирующая белок гомологичный ParA, лишь частично входит в состав мини-репликона, и в результате этого не может обеспечивать синтез функционально активного продукта. Кроме того, секвенированная последовательность ДНК не содержит *parB*-гена, продукт которого необходим для функциональной активности ParA-белка. Следовательно, мини-репликон плазмиды pBS72 не имеет в своем составе нормально функционирующей *par*-системы.

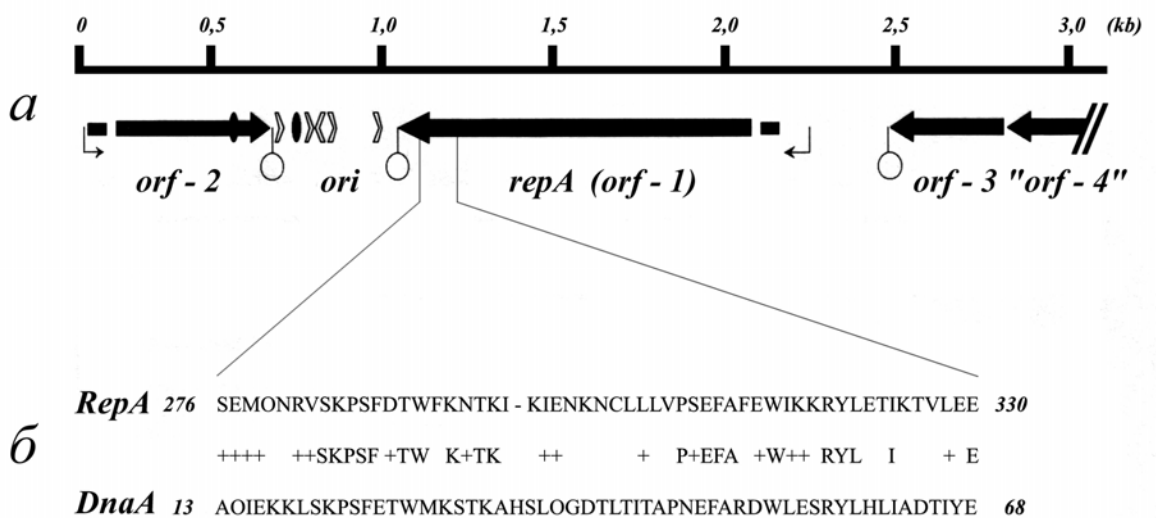


Рис. 7. Схематическое изображение *rep*-области плазмиды pBS72.

а: генетическая организация. BglII-фрагмент плазмиды pBS72 размером 3081 п.н. содержит: три полных (*orf1-3*) и одну неполную ("*orf4*") открытые рамки считывания; регуляторные участки (◀ промотор, ■ последовательность Шайн-Дальгарно, ○ терминатор); повторы (» – правая ориентация, « – левая ориентация); последовательности, связывающие DnaA-белок (●). Открытые рамки считывания (*orf1-4*) детерминируют синтез полипептидов, состоящих из 344, 168, 113, 87 аминокислотных остатков, соответственно.

б: гомология между С-терминальной последовательностью RepA-белка плазмиды pBS72 и N-терминальной областью DnaA-белка бактерий *B. subtilis*. С использованием программ BLASTP2.2.1 и BLOSUM62 установлено, что гомология указанных последовательностей достигает 63%, а в 35% имеет место полная идентичность.

Установлена достоверная гомология между С-терминальной последовательностью белка, кодируемого открытой рамкой считывания 1 (*orf1*), и N-терминальной последовательностью DnaA-белка. Данная последовательность представляет собой функциональный домен, обеспечивающий олигомеризацию DnaA-белка в области *oriC* и его взаимодействие с репликативной хеликазой, ведущее к образованию затравочного комплекса при репликации хромосомы *E. coli*. Остальная часть белка, синтез которого определяется *orf1*, не обнаруживает гомологии с известными белками из банка данных. Полипептидов, подобных обнаруженному, ранее описано не было. Кроме того, белковый продукт, детерминируемый *orf1*, содержит НТН-последовательность (локализуется между 111 и 132 аминокислотными остатками), являющейся ДНК-связывающей областью. Приведенные факты свидетельствуют в пользу того, что продукт, детерминируемый открытой рамкой считывания *orf1*, является новым *rep*-белком, стимулирующим инициацию репликации ДНК плазмиды рBS72.

Последовательность протяженностью в 370 п.н., располагающаяся между *orf1* и *orf2*, включает типичный DnaA-связывающий сайт (ТТАТССАСА), а также четыре прямых и один инвертированный повторы, имеющие сходные нуклеотидные последовательности [АТТАААТ(Т/А)ТТ(А/Г)А(Т/С)], которые являются потенциальными сайтами связывания с белком, иницирующим репликацию. Полученные данные позволяют утверждать, что анализируемая область представляет собой сайт начала вегетативной репликации (*oriV*) плазмиды рBS72.

Таким образом, в результате анализа секвенированной последовательности мини-репликона плазмиды рBS72 не было обнаружено ее сходства с *rep*-областями известных плазмид грамположительных и грамотрицательных бактерий, что свидетельствует об уникальности данной плазмиды и ее принадлежности к новому классу внехромосомных генетических элементов.

В результате функционального анализа установлено, что для репликации и стабильного поддержания плазмиды рBS72 в бактериях *B. subtilis* необходимо присутствие *rep*-гена и сайта инициации репликации (*oriV*) (Рис. 8).

Плазида рBS72 является относительно малокопийной (присутствует в клетке в количестве 6 копий) и, следовательно, для стабильного поддержания в клетке должна содержать элементы *par*-системы. Однако, как указывалось ранее, в пределах секвенированной последовательности функционально активных компонентов *par*-системы обнаружено не было.

Стабильное поддержание плазмиды рBS72, скорее всего, определяется особенностями её репликации. В пользу этого свидетельствуют следующие наблюдения. Нуклеотидные последовательности *rep*-гена и *oriV*-сайта плазмиды рBS72 увеличивают сегрегационную стабильность плазмиды рJIM2279 (исходная плазида рJIM2279 утрачивается клетками-хозяина с частотой более 90%). В клетках с мутированными *dnaB*- и *dnaI*-генами имело место уменьшение числа копий плазмиды и снижение стабильности её наследования. Эти данные свидетельствуют о ключевой роли репликативного аппарата плазмиды в её распределении между дочерними клетками в процессе деления.

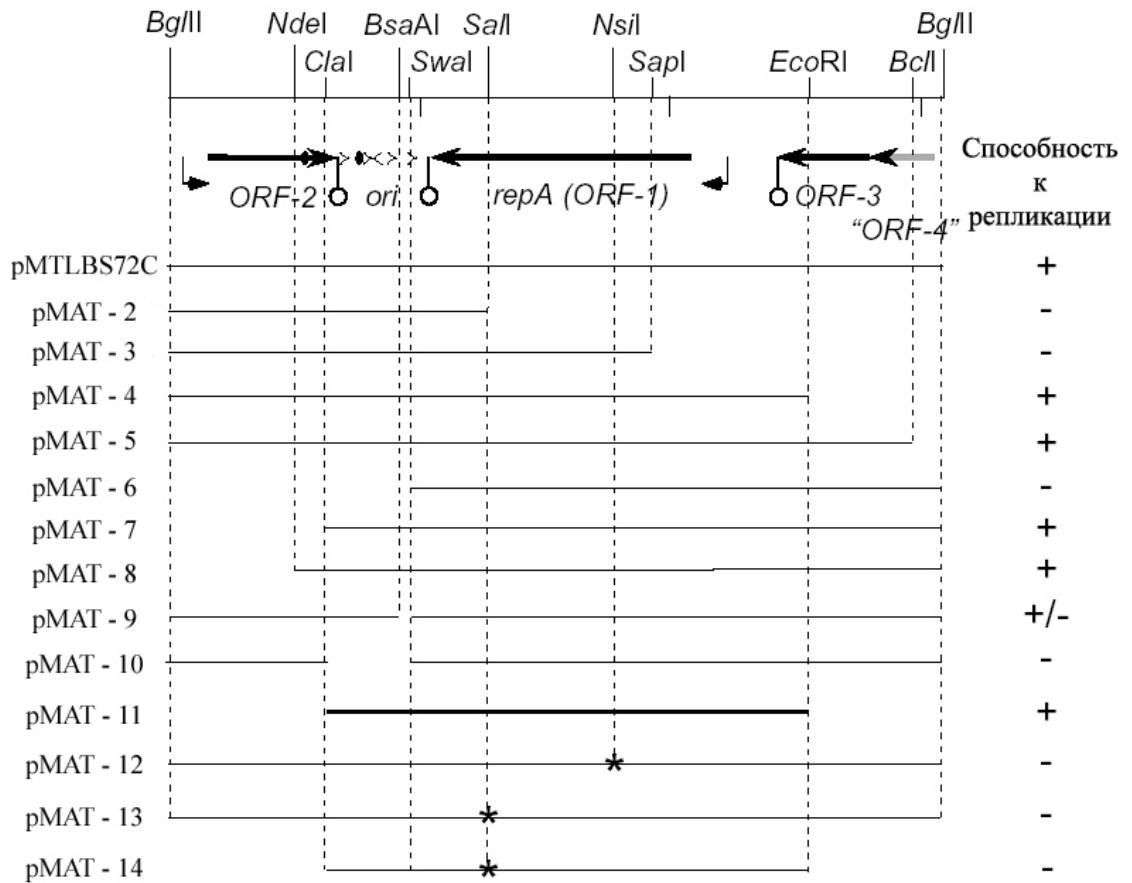


Рис. 8. Результаты функционального анализа *rep*-области плазмиды pBS72 бактерий *B. subtilis*.

Примечание: делеционные (варианты pMAT-2 – pMAT-11) и инсерционные (варианты pMAT-12 – pMAT-14) мутанты были изолированы в бактериях *E. coli* и проанализированы на способность реплицироваться в бактериях *B. subtilis*.

"+" – трансформирующая активность и стабильность наследования соответствует исходному варианту (вариант MTLBS72C); "+/-" – трансформирующая активность и стабильность наследования на порядок ниже чем у исходного варианта; "-" – мутантные плазмиды не трансформируют бактерии *B. subtilis*, * – места инсерций. Минимальный репликон плазмиды pBS72 соответствует варианту pMAT-11.

Изучение стабильности наследования мини-репликона плазмиды pBS72 в клетках *B. subtilis* в зависимости от функции белков, обеспечивающих репликацию хромосомы, выявило ряд интересных моментов, которые обосновывают необходимость дальнейшего исследования механизмов копирования подобных внехромосомных генетических элементов и выяснения участия в них репликативного аппарата клетки-хозяина.

Как видно из таблиц 7-9 репликация плазмиды pBS72 зависит от полноценности ДНК-полимеразы III (PolC, DnaE, DnaX, DnaN), белков праймосомного комплекса (DnaB, DnaD, DnaI, DnaC и DnaG), но не связана с функцией белков инициации репликации хромосомы (DnaA и PriA), ДНК-полимеразы I (PolI) и хеликазы (PcrA).

Таблица 7

Наследование плазмиды рBS72 бактериями с дефектной ДНК-полимеразой III

Мутация	дикий тип	<i>mutI</i>	<i>dnaE2.6</i>	<i>dnaE2.10</i>	<i>dnaX8132</i>	<i>dnaG5</i>
Отсутствует субъединица ДНК-полимеразы III	нет	PolC	DnaE	DnaX	DnaN	нет
Число копий плазмиды	1,0* ±0,03	0,38 ±0,03	0,33 ±0,12	0,27 ±0,02	0,27 ±0,05	0,6 ±0,08
Количество клеток, содержащих плазмиду, %	100%	94%	99%	98%	92%	92%

Примечание: все мутантные штаммы получены из бактерий *B. subtilis* 168. * – за единицу принималось исходное число копий плазмиды (5,9 копий на хромосому), характерное для бактерий дикого типа.

Таблица 8

Наследование плазмиды рBS72 мутантными по генам праймосомного комплекса бактериями

Мутация	дикий тип *	<i>dnaB19</i>	<i>dnaC14</i>	<i>dnaD23</i>	<i>dnaE20</i>	<i>dnaI2</i>	Δ**	Δ**
Отсутствует белок праймосомного комплекса	нет	DnaB	DnaC	DnaD	DnaG	DnaI	DnaA	PriA
Число копий плазмиды	0,9 ±0,09	0,29 ±0,13	0,31 ±0,08	0,3 ±0,1	0,25 ±0,05	0,33 ±0,17	2,41 ±0,64	6,43 ±2,89
Количество клеток, содержащих плазмиду, %	96%	7,6%	81%	94%	74%	17%	98%	NT

Примечание: * все мутантные штаммы получены из бактерий *B. subtilis* L1430. Δ** делеционные мутанты. За единицу принималось исходное число копий плазмиды (5,9 копий на хромосому), характерное для бактерий дикого типа.

В результате анализа характера наследования мини-репликона плазмиды рBS72 в бактериях *B. subtilis* с нарушениями функций отдельных элементов репликативной системы были получены результаты, позволяющие высказать следующие соображения.

Таблица 9

**Наследование плазмиды pBS72 бактериями, дефектными по
ДНК-полимеразе I и хеликазе**

Мутация	<i>polA5</i>	<i>pcrA3</i>
Отсутствующий белок	ДНК полимеразы I (PolI)	Хеликаза (PcrA)
Число копий плазмиды	1,11 ± 0,15	1,08±0,28
Количество клеток, содержащих плазмиду, %	99%	98%

Примечание: За единицу принималось исходное число копий плазмиды (5,9 копий на хромосому), характерное для бактерий дикого типа.

Наследование плазмиды pBS72 бактериями-хозяевами не зависит от активности белков инициации репликации хромосомы (DnaA и PriA). Напротив, в клетках, несущих мутации *dnaA* или *priA*, регистрировалось достоверное увеличение числа копий (в 2,5 и 6,5 раз, соответственно) данной плазмиды. Этот факт достаточно интересен и может указывать на то, что инициация репликации этого внехромосомного генетического элемента обеспечивается исключительно плазмидным белком, гомологичным белку DnaA хромосомального происхождения и не нуждается в помощнике со стороны клетки-хозяина. Подобного типа плазмиды ранее описаны не были.

В мутантных *dnaB*⁻ и *dnaI*⁻-бактериях не только снижается число копий плазмиды pBS72 (примерно в 3 раза), но и уменьшается количество плазмидсодержащих клеток в популяции. Это может объясняться необходимостью участия указанных белков, как в репликации, так и процессе сегрегации плазмиды pBS72. Роль белков DnaB и DnaI как кофакторов репликации была установлена при изучении механизмов DnaA-, PriA- и DnaD-зависимых процессов инициации. Имеются также данные, косвенно свидетельствующие об участии перечисленных белков в сегрегации дочерних хромосом.

Если белки DnaB и DnaI вовлекаются в сегрегацию хромосомы, то можно предположить, что они способны влиять на этот процесс и в случае плазмиды pBS72 посредством взаимодействия праймосомного комплекса с клеточной мембраной. Возможно, для участия рассматриваемых белков в распределении плазмидной ДНК между дочерними клетками, требуется некий дополнительный фактор, связывающий эти белки с клеточной мембраной. Безусловно, для

боле досконального выяснения обнаруженных закономерностей требуется проведение дополнительных исследований.

Снижение числа копий плазмиды pBS72 в клетках с мутацией в гене *dnaE* свидетельствует о том, что продукт этого гена необходим для её нормальной репликации. Плазида pBS72 является третьим по счету репликоном (ранее это было показано для хромосомы *B. subtilis* и плазмиды pAM β 1), репликация которого осуществляется двумя полимеразми – PolC и DnaE. Последнее позволяет утверждать, что DnaE-белок является обязательным, и в тоже время уникальным компонентом репликативного аппарата грамположительных бактерий *B. subtilis*, участвующим в синтезе ДНК.

Репликация плазмиды pBS72 осуществляется в соответствии с механизмом тета-типа, о чём свидетельствуют следующие факты: зависимость репликации от DnaC-хеликазы и отсутствие влияния хеликазы PcrA, участие которой строго необходимо для инициации репликации плазмид RCR-типа. Кроме того, в процессе копирования плазмиды pBS72 не выявляются промежуточные структуры в виде одностранных молекул ДНК, являющихся характерной особенностью плазмид RCR-типа. Анализ нуклеотидной последовательности *rep*-области плазмиды pBS72 не обнаружил особенностей, присущих плазмидам RCR-типа, в тоже время в сайте инициации репликации имеются прямые повторы и *dnaA*-бокс, характерные для плазмид тета-типа.

Механизм репликации плазмиды pBS72 отличается от такового плазмид классов В, С, D (типичными представителями которых являются плазмиды ColE1, ColE2, pAM β 1, соответственно), поскольку не зависит от функции ДНК-полимеразы I.

Таким образом, репликация плазмиды тета-типа pBS72 характеризуется рядом особенностей, свойственных только данному внехромосомному генетическому элементу, среди которых наибольший интерес представляет факт негативного влияния хромосомального белка DnaA на процесс репликации плазмиды, а также участие белков DnaB и DnaI в процессах ее сегрегации.

Результаты изучения системы репликации плазмиды pBS72 бактерий *B. subtilis* свидетельствуют о возможности разработки на её основе двурепликонного вектора, пригодного для молекулярного клонирования.

В качестве базовой конструкции, обеспечивающей сохранность вектора в клетках *E. coli*, использовали многокопийную плазмиду pMTL21C, несущую ColE-репликон, ген ампициллинрезистентности (Ap), выражающийся в *E. coli*, и экспрессирующуюся в бактериях *B. subtilis* устойчивости к хлорамфениколу (Cm), а также полилинкер, располагающийся непосредственно перед *lacZ*-геном. Последнее позволяет осуществлять клонирование фрагментов ДНК по ряду сайтов, вызывая при этом инактивацию *lacZ*-гена.

В качестве последовательности ДНК, обеспечивающей наследование векторных молекул в бактериях *B. subtilis*, использовали фрагмент мини-репликона плазмиды pBS72, содержащий *rep*-ген и сайт инициации репликации. Путём амплификации в полимеразной цепной реакции был получен специфический продукт размером 2077 п.н., который лигировался с плазмидой pMTL21C, предварительно линеализированной рестриктазой AflIII с последующей обработкой фрагментом Кленова. Лигированная смесь использовалась для трансформации бактерий *B. subtilis* 168 (*trpC2*), отбор плазмидсодержащих клонов осуществлялся в результате прямой селекции на среде, содержащей 5 мкг/мл хлорамфеникола. Клетки отобранных клонов проверяли на способность наследовать плазмидный признак антибиотикорезистентности. Из вариантов, стабильно сохраняющих в неселективных условиях маркер антибиотикорезистентности в течение 20 генераций, методом щелочного лизиса выделялась плазмидная ДНК, которой трансформировались бактерии *E. coli*. Из трансформантов выделялась плазмидная ДНК и посредством рестрикционного анализа проверялась её структурная организация. В результате были отобраны два варианта, различающиеся ориентацией *rep*-области плазмиды pBS72.

С целью проверки сегрегационной и структурной стабильности полученных конструкций были проведены эксперименты по изучению характера их наследования в системах *B. subtilis* и *E. coli*. Установлено, что созданные векторные плазмиды отличаются структурной и сегрегационной стабильностью (элиминация плазмиды из клеток *B. subtilis* при выращивании в неселективных условиях в течение 60 генераций не превышала 5%).

Также было установлено, что указанные векторные молекулы характеризуются достаточно большой емкостью (клонированы чужеродные фрагменты ДНК размером до 10 kb) и при включении чужеродного генетического материала сохраняют структурную и сегрегационную стабильность в клетках *E. coli* и *B. subtilis* на неизменном уровне. При этом достаточно легко интродуцируются посредством трансформации в клетки *B. subtilis* (частота трансформации составляла 10^5 на 1 мкг ДНК).

Сконструированные векторные молекулы размером 5,6 kb могут успешно использоваться в качестве векторов общего назначения (полилинкер содержит шестнадцать уникальных сайтов), включают *lacZ*-тест-систему, позволяющую осуществлять прямую селекцию клонированных фрагментов, имеющийся в их составе полилинкер фланкируется известными последовательностями, обеспечивающими возможность использования стандартных праймеров для сиквенс-анализа клонируемых фрагментов. Кроме того, описанные конструкции могут явиться хорошей основой для создания различного рода векторов специального назначения (например, для создания векторов экспрессии).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения данной работы охарактеризованы системы репликации наиболее распространенных внехромосомных генетических элементов бактерий природных штаммов *Pseudomonas* и *Bacillus* и разработаны методы создания на их основе хромосоммобилизующих факторов, векторов для транспозонного мутагенеза и молекулярного клонирования. Полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

Вывод 1. В клетках природных штаммов метанолутилизирующих бактерий наиболее часто встречаются плазмиды размером 75 kb, имеющие идентичные сайты рестрикции и детерминирующие устойчивость к стрептомицину и тетрациклину. Выявленные внехромосомные генетические элементы представляют собой ранее не описанный тип R-плазмид группы IncP-9, исходными хозяевами которых являются бактерии *P. putida* и *Burkholderia caryophylli* [3, 21, 24, 44, 50].

Вывод 2. Клетки 50% природных штаммов нафталинутилизирующих бактерий содержат плазмиды группы IncP-9 (30 штаммов из 60). Выявленные внехромосомные генетические элементы характеризуются полиморфностью нуклеотидных последовательностей ДНК, определяющих инициацию репликации (выявлено 3 новых подгруппы IncP-9) и деградацию нафталина (выявлено два новых типа *nahG*-гена). Исследованные Nah-плазмиды обнаружены в клетках *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* и *P. species*, а также нефлуоресцирующих бактерий не установленной таксономической принадлежности [11, 30, 34, 42, 55, 57].

Вывод 3. Среди природных грамположительных бактерий *B. subtilis* клетки 20% штаммов, содержат внехромосомные генетические элементы. Наиболее распространены плазмиды, размером до 10 kb, принадлежащие к pC194-семейству и плазмиды тета-типа размером 96,7 kb не обладающие гомологией ни с одной из известных плазмид грамположительных бактерий [1, 8, 9, 9, 15, 16, 17, 23, 40, 43, 45, 46, 51, 52].

Вывод 4. Плазида pM3 группы IncP-9, детерминирующая устойчивость к тетрациклину и стрептомицину, является R-фактором широкого круга хозяев. Для плазмиды pM3 и некоторых других представителей группы IncP-9 (плазмид R2, pBS101, pNL30, pNL10) характерно свойство температурной нестабильности в клетках бактерий семейства *Enterobacteriaceae* при 37°C. Наследование плазмид pNL15 и pBS267 этой же группы несовместимости не зависит от температурного фактора [3, 5, 28, 32, 35, 36, 37].

Вывод 5. Секвенированный мини-репликон pMT2 размером 9,7 kb обладающий основными свойствами исходной плазмиды pM3, содержит 10 открытых рамок считывания. Rep-белок обнаруживает 44% гомологи с белком инициации репликации плазмиды pBB1 *Bordetella bronchiseptica*. Четыре гена *par*

оперона (*parA*, *parB*, *korA*, *tolA*), детерминируют белки, соответственно гомологичные белкам IncC плазмиды R751 группы IncP-1 (36% гомологии), KorB плазмиды RK2 группы IncP-1 (24% гомологии), KorA плазмиды R751 группы IncP-1 (25% гомологии) и TolA бактерий *P. putida* (30% гомологии) [6, 7, 39].

Вывод 6. Для репликации плазмиды рMT2 в бактериях *P. putida* достаточно присутствие *rep*-гена и сайта инициации репликации, тогда как репликация ее в клетках *E. coli* дополнительно нуждается в присутствии в cis-положении промоторной области *par*-оперона и *parB*-гена, который может находиться либо в cis-, либо в транс-положении относительно *rep*-области. Детерминанты несовместимости плазмиды рM3 локализованы в промоторной области *par*-оперона на расстоянии 76 п.н. от стартового кодона гена *parA*, а также в области *rep*-гена [18, 27, 29, 33, 48, 56].

Вывод 7. Мутации в промоторной области *rep*-гена и в самом *rep*-гене приводят к способности плазмиды рMT2 реплицироваться в клетках *E. coli* при температуре 37°C. Стабилизация наследования плазмиды рMT2 связана с изменением уровня экспрессии гена, детерминирующего белок инициации репликации [19, 54, 56].

Вывод 8. Транспозонсодержащие варианты плазмиды рM3 могут использоваться в качестве хромосоммобилизующих факторов и векторов для транспозонного мутагенеза бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus* [2, 4, 13, 20, 22, 38, 47].

Вывод 9. В пределах секвенированной нуклеотидной последовательности мини-репликона плазмиды рBS72 бактерий *B. subtilis* находятся четыре открытых рамки считывания. С-терминальная последовательность плазмидного Rep-белка гомологична N-терминальной последовательности белка DnaA. Сайт *oriV* включает *dnaA*-бокс, прямые и инвертированные повторы. Для репликации и стабильного поддержания мини-репликона плазмиды рBS72 достаточно присутствие *rep*-гена и сайта инициации репликации *oriV*. Мини-репликон плазмиды рBS72 может служить основой при конструировании векторов для молекулярного клонирования в клетках бактерий *B. subtilis*. Созданная двурепликонная векторная система, позволяет клонировать чужеродные фрагменты ДНК размером до 10 kb в клетках *E. coli* и *B. subtilis* [1, 12, 14, 25, 26, 31, 49, 53].

Вывод 10. Репликация плазмиды рBS72 в клетках *B. subtilis* осуществляется в соответствии с механизмом тета-типа и обеспечивается бактериальными полимеразы PolC и DnaE. Плазида рBS72 копируется без участия белка DnaA. Стабильное наследование плазмиды рBS72 не зависит от функции *par*-локуса. Распределение плазмидных копий между дочерними клетками определяется *rep*-геном и сайтом инициации репликации, а также праймосомным комплексом клетки-хозяина [1].

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Монографии

1. Титок М.А. Плазмиды грамположительных бактерий / Под ред. Ю.К. Фомичева. – Мн: Изд-во БГУ. – 2004. – 120 с.

Статьи:

2. Титок М.А., Прокулевич В.А., Максимова Н.П., Фомичев Ю.К. Использование плазмиды рМЗ *Pseudomonas sp.* для транспозонного мутагенеза бактерий *Erwinia* // Мол. Генет. Микробиол. Вирусол. – 1989. – № 11. – С. 45-48.

3. Титок М.А., Лысак В.В., Кульба А.М. R-плазмиды факультативных метилотрофных *Pseudomonas*: характеристика плазмиды рМЗ // Вестник БГУ. – Сер. 2, № 2. – 1989. – С. 42-46.

4. Титок М.А., Максимова Н.П., Прокулевич В.А., Фомичев Ю.К. А.с. №1599434 СССР. Плазмидная ДНК рМТF59, предложенная для транспозонного мутагенеза бактерий семейства *Enterobacteriaceae* / Заявлено 20.06.1988. Опубл. 15.10.1990. // Открытия. Изобретения. – 1990. – № 38. – С. 111.

5. Титок М.А., Максимова Н.П., Фомичев Ю.К. Характеристика R-плазмиды рМЗ (IncP9) широкого круга хозяев // Мол. Генет. Микробиол. Вирусол. – 1991. – № 9. – С. 9-13.

6. Титок М.А., Олехнович И.Н., Евтушенков А.Н. Клонирование гер-области плазмиды широкого круга хозяев рМЗ (IncP9) // Мол. Генет. Микробиол. Вирусол. – 1991. – № 3. – С. 18-23.

7. Greated A., Titok M.A., Krasowiak R., Fairclough R.J., Thomas C.M. The replication and stable-inheritance functions of IncP-9 plasmid рМЗ // Microbiol. – 2000. – Vol. 146. – P. 2249-2258.

8. Лотарева О.В., Незаметдинова В.З., Федорина Е.А., Полуэктова Е.У., Титок М.А., Прозоров А.А. Конъюгативная мобилизация, осуществляемая с высокой частотой природным штаммом *Bacillus subtilis*, несущим крупную плазмиду // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 12. – С. 1598-1603.

9. Лотарева О.В., Полуэктова Е.У., Титок М.А., Прозоров А.А. Крупная плазида из почвенного штамма *Bacillus subtilis*, осуществляющая конъюгативную мобилизацию с высокой частотой // Доклады Акад. Наук. – 2001. – Т. 379, № 1. – С. 130-131.

10. Лотарева О.В., Полуэктова Е.У., Титок М.А., Прозоров А.А. Почвенный штамм *Bacillus subtilis*, содержащий крупную плазмиду, обеспечивающую высокую частоту мобилизационного переноса // Микробиология. – 2002. – Т. 71., № 2. – С. 255-257.

11. Krasowiak R., Smalla K., Sokolov S., Kosheleva I.A., Sevastianovich Y.R., Titok M.A., Thomas C.M. PCR primers for detection and characterization of IncP-9 plasmids // FEMS Microbiol. Ecol. – 2002. – Vol. 42, № 2. – P. 217-225.

12. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich, A.V., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Janniere L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analy-

sis and construction of a new theta-replicating vector // *Plasmid*. – 2003. – Vol. 49, № 1. – С. 53-62.

13. Титок М.А. Использование плазмиды широкого круга хозяев рМЗ (IncP-9) для генетического анализа бактерий семейства *Enterobacteriaceae* // *Генетика*. – 2003. – Т. 39, № 12. – С. 1606-1611.

14. Титок М.А., Лагодич А.В. Молекулярно-генетический анализ гер-области плазмиды тета-типа рBS72 бактерий *Bacillus subtilis* // *Доклады НАН Беларуси*. – 2003. – Т. 47, № 4. – С. 67-70.

15. Титок М.А., Лагодич А.В., Селезнева Ю.В. Плазмидный состав бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из природных источников // *Вестник БГУ*. – 2003. – Сер. 2, № 3. – С. 35-38.

16. Лагодич А.В., Штанюк Я.В., Прозоров А.А., Титок М.А. Характеристика систем репликации плазмид природных штаммов *Bacillus subtilis* // *Мол. Биол.* – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 1-5.

17. Титок М.А., Лагодич А.В. Характеристика гер-областей плазмид *Bacillus subtilis* // *Вести НАН Беларуси*. – 2004. – № 2. – С. 61-65.

18. Титок М.А. Генетические детерминанты несовместимости плазмиды рMT2 (IncP-9) // *Вестник БГУ*. – 2005. – Сер. 2, № 1. – С. 31-36.

19. Титок М.А. Свойство температурной нестабильности плазмиды рMT2 (IncP-9) // *Вестник БГУ*. – 2005. – Сер. 2, № 1. – С. 26-31

Статьи в сборниках

20. Титок М.А. Система для транспозонного мутагенеза бактерий *Erwinia* с использованием плазмиды рMTF59 // *Фитонциды. Бактериальные болезни растений*. – Киев-Львов. – 1990. – Ч. 2. – С. 5-6.

21. Титок М.А., Желдакова Р.А., Могилевская М.И. Характеристика R-плазмид, детерминирующих тетрациклинрезистентность у факультативных метилотрофных бактерий // *Физиология, генетика и биохимия метилотрофных микроорганизмов*. – Киев. – 1986. – С. 88-93.

22. Титок М.А. Использование плазмиды рМЗ (IncP9) для генетического анализа бактерий *Enterobacteriaceae* // VI съезд БОГИС. Матер. конф., Минск. 2-4 июля 1992. – 1992. – С. 104-105.

23. Селезнева Ю.В., Титок М.А., Прокулевич В.А. Выделение и характеристика плазмид природных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* // *Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия*. Матер. межд. конф., Минск. 1-2 июня 2000. – 2000. – С. 89-91.

24. Титок М.А., Севастьянович Я.Р. Распространение и характеристика R-плазмид Р-9 группы несовместимости // *Микробиология и биотехнология XXI столетия*. Матер. межд. конф., Минск. 22-24 мая 2002. – 2002. – С. 150-151.

25. Титок М.А., Лагодич А.В., Прокулевич В.А. Особенности организации и наследования мини-репликона плазмиды BS72 бактерий *Bacillus subtilis* // *Микробиология и биотехнология XXI столетия*. Матер. межд. конф., Минск. 22-24 мая 2002. – 2002. – С. 151-152.

26. Титок М.А., Лагодич А.В., Прокулевич В.А. Молекулярно-генетический анализ гер-области плазмиды тета-типа рBs72 бактерий *Bacillus subtilis* // Генетика и селекция в XXI веке. VIII съезд БОГИС. Матер. конф., Минск. 23-25 июля 2002. – 2002. – С. 254-256.

27. Титок М.А., Севастьянович Я.Р., Greated A., Krasowiak R., Thomas C.M. Молекулярно-генетический анализ плазмиды рМЗ (IncP-9) бактерий *Pseudomonas putida* // Генетика и селекция в XXI веке. VIII съезд БОГИС. Матер. конф., Минск. 23-25 июля 2002. – 2002. – С. 257-258.

28. Василенко С.Л., Передирый А.П., Титок М.А. Особенности наследования плазмид широкого круга хозяев IncP-9 группы // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Матер. межд. конф., Минск. 26-26 мая 2004. – 2004. – С. 144-145.

29. Исаенко Е.В., Титок М.А. Функциональный анализ гер-области плазмиды рМТ2 IncP-9 группы // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Матер. межд. конф., Минск. 26-26 мая 2004. – 2004. – С. 150-152.

30. Левчук А.А., Булыга И.М., Титок М.А. Распространение и характеристика штаммов, содержащих плазмиды биodeградации нафталина, изолированных на территории Беларуси // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Матер. межд. конф., Минск. 26-26 мая 2004. – 2004. – С. 25-27.

31. Лагодич А.В., Штанюк Я.В., Черва Е.А., Прокулевич В.А., Титок М.А. Создание векторных систем для молекулярного клонирования в клетках бактерий *Escherichia coli* – *Bacillus subtilis* // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Матер. межд. конф., Минск. 26-26 мая 2004. – 2004. – С. 156-158.

32. Василенко С.Л., Передирый А.П., Титок М.А. Особенности наследования плазмид IncP-9 группы в клетках гомологичных и гетерологичных хозяев // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология. Матер. межд. конф., Минск. 24–26 ноября 2004. – 2004. – С. 38-40.

33. Исаенко Е.В., Титок М.А. Функциональный анализ гер-области плазмиды широкого круга хозяев рМТ2 (IncP-9) // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология. Матер. межд. конф., Минск. 24–26 ноября 2004. – 2004. – С. 66-67.

34. Левчук А.А., Титок М.А. Характеристика природных nah-плазмид IncP-9 группы // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология. Матер. межд. конф., Минск. 24–26 ноября 2004. – 2004. – С. 81-83.

Тезисы докладов

35. Титок М.А., Максимова Н.П., Желдакова Р.А. Природа детерминанты тетрациклинрезистентности плазмиды рМЗ бактерий *Pseudomonas sp.* М // Плазида. – Пушино. – 1985. – С. 123.

36. Титок М.А., Максимова Н.П., Могилевская М.И. Взаимодействие плазмиды рМЗ и RSF2124 в клетках *E. coli*. // Плазмида. – Пушино. – 1986. – С. 125-126.
37. Титок М.А., Желдакова Р.А. Плазмида рМЗ метилотрофных *Pseudomonas sp.* М. // V съезд белорусского общества генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. Тез. докл., Горки. 25-27 июня 1986. – 1986. – С. 79-80.
38. Titok M.A., Maksimova N.P. Plasmid pMTF59 (IncP-9) as vector for transposon mutagenesis in *Enterobacteriaceae* // 6th International symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Strasbourg, France. 12-18 August 1990. – 1990. – P. 137.
39. Титок М.А., Евтушенков А.Н. Клонирование *rep*-области плазмиды рМЗ Р-9 группы несовместимости // Молекулярные механизмы генетических процессов. Тез. докл. всесоюз. симп., Москва. 1990. – 1990. – С. 89.
40. Prosorov A.A., Poluectova E.U., Lotareva O.V., Nezamendinova V.Z., Prokulevich V.A., Titok M.A., Selezneva Y.V. Isolation and characterization of small and large cryptic plasmids from *Bacillus subtilis* // Microbial and cellular systems for pharmacology, biotechnology, medicine and environment. INTAS symposium. Annual report. Moscow. May 26-30, 1999. – 1999. – P. 42.
41. Titok M.A., Prokulevich V.A., Erlich S.D., Janniere L. Characterisation of theta replication functions of plasmids from natural bacilli // INTAS symposium. Annual report. Moscow. December 14-17, 2000. – 2000. – P. 36.
42. Titok M.A., Thomas C.M., Fomichev Y.K. Diversity of bacteria *Pseudomonas* being determined by plasmid of IncP9 group of incompatibility // INTAS symposium. Annual report. Moscow. December 14-17, 2000. – 2000. – P. 75.
43. Titok M.A., Halpern D., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Janniere L. Analysis of *rep*-regions of plasmids in *Bacillus* // INTAS symposium. Annual report. Moscow. May 30 – June 3, 2001. – 2001. – P. 20.
44. Sevastyanovich Y.R., Skovorodko Y.N., Titok M.A., Fomichev Y.K. Distribution of IncP9 plasmids in natural bacterial isolates originating from Belarus // INTAS symposium. Annual report. Moscow. May 30 – June 3, 2001. – 2001. – P. 55.
45. Полуэктова Е.У., Лотарева О.В., Незаметдинова И.З., Федорина Е.А., Титок М.А., Прозоров А.А. Крупные плазмиды из почвенных штаммов *Bacillus subtilis* и осуществляемая ими конъюгативная мобилизация // Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. Тез. докл. межд. симп., Москва – Минск. 18-24 ноября 2001. – 2001. – С. 132-133.
46. Титок М.А., Прокулевич В.А., Ehrlich S.D., Janniere L. Характеристика *rep*-области плазмид тета-типа бактерий *Bacillus* // Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. Тез. докл. межд. симп., Москва – Минск. 18-24 ноября 2001. – 2001. – С. 170-171.
47. Titok M.A., Prokulevich V.A., Fomichev Yu.K. The use of pMTF59 plasmid (IncP9) for transposon mutagenesis in *Enterobacteriaceae* // Mobile genetic elements contribution to bacterial adaptability and diversity. Third symposium of the EU-concerted action. Berlin, Germany. September 21-25, 2001. – 2001. – P. 37.

48. Krasowiak R., Titok M.A., Konieczny I., Thomas C.M. Dissection of the mini-replicon of IncP-9 plasmid pM3 // *Plasmid Biology*. Pittsburgh, USA. June 22-28, 2002. – 2002. – P. 76.

49. Лагодич А.В., Титок М.А. Характеристика гер-области плазмиды тета-типа pBS72 бактерий *Bacillus subtilis* // Биология – наука 21-го века. Шестая Пушинская школа-конференция молодых ученых. Тез. докл., Пушино. 20-24 мая 2002. – 2002. – С. 145.

50. Севастьянович Я.Р., Титок М.А. Характеристика плазмид IncP-9 группы несовместимости // Биология – наука 21-го века. Шестая Пушинская школа-конференция молодых ученых. Тез. докл., Пушино. 20-24 мая 2002. – 2002. – С. 167.

51. Лагодич А.В., Титок М.А. Распространение плазмид тета-типа размером более 90 kb среди природных штаммов *Bacillus subtilis* // Актуальные проблемы генетики. Вторая научная конференция Московского общества генетиков и селекционеров. Тез. докл. межд. конф., Москва. 20-21 февраля 2003.– 2003. – Т. 2. – С. 88-89.

52. Лагодич А.В., Титок М.А. Характеристика плазмиды тета-типа pBS57 природного штамма *Bacillus subtilis* // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. Третий съезд генетиков и селекционеров России. Тез. докл. межд. конф., Москва. 6 – 12 июня 2004. – 2004. – Т. 1. – С. 387.

53. Лагодич А.В., Титок М.А. Создание вектора для молекулярного клонирования в грамположительных и грамотрицательных бактериях // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. Третий съезд генетиков и селекционеров России. Тез. докл. межд. конф., Москва. 6 – 12 июня 2004. – 2004. – Т. 1. – С. 388.

54. Титок М.А., Thomas C.M. Особенности системы репликации плазмид группы Inc P-9 // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. Третий съезд генетиков и селекционеров России. Тез. докл. межд. конф., Москва. 6 – 12 июня 2004. – 2004. – Т. 1. – С. 413.

55. Левчук А.А., Титок М.А. Особенности плазмидного состава нефталинутилизирующих штаммов, выделенных на территории Беларуси // Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. Третий съезд генетиков и селекционеров России. Тез. докл. межд. конф., Москва. 6 – 12 июня 2004. – 2004. – Т. 1. – С. 456.

56. Titok M.A., Sevastsyanovich Y.R., Krasowiak R., Thomas C.M. Inheritance properties of the IncP-9 plasmid in original and heterologous bacterial hosts. // *Plasmid biology*. Corfu, Greece. September 14-21, 2004. – 2004. – P. 153.

57. Sevastsyanovich Y.R., Krasowiak R., Bingle L., Sokolov S., Kosheleva I.A., Levchuk A.A., Titok M.A. Thomas C.M. Phylogeny and diversity of the IncP-9 plasmids of *Pseudomonas*. // *Plasmid biology*. Corfu, Greece. September 14-21, 2004. – 2004. – P. 134.

Резюме

Ключевые слова: *Pseudomonas*, *B. subtilis*, плаزمида, репликон, группа несовместимости P-9, *rep*-ген, сайт инициации репликации *oriV*, *par*-система, репликативный комплекс клетки-хозяина.

В ходе выполнения настоящего исследования подробно охарактеризованы плазмиды группы несовместимости P-9. Выявлен полиморфизм в молекулярной организации областей инициации репликации (*rep*-гене и *oriV*-сайте) и генов, детерминирующих деградацию органических соединений (*nahAC*, *nahG*). Показано, что исходными хозяевами плазмид группы IncP-9 могут являться флуоресцирующие и нефлуоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas*.

Клонирован и секвенирован мини-репликон R-плазмиды группы IncP-9. При проведении функционального анализа установлено, что для репликации плазмид IncP-9 в бактериях *P. putida* достаточно наличие *rep*-гена и сайта инициации репликации *oriV*, тогда как в гетерологичных хозяевах (*E. coli*) дополнительно требуется присутствие в *cis*-положении *par*-локуса, обеспечивающего эффективное распределение плазмидных копий в процессе клеточного деления.

Установлено, что плаزمида pM3 группы IncP-9 не способна поддерживаться в бактериях семейства *Enterobacteriaceae* при температуре 37°C (*Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemii*, *Erwinia herbicola*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*). Выявленное свойство позволило сконструировать на основе плазмиды pM3 суицидальный вектор и использовать его для транспозонного мутагенеза бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Изолирована новая плазмида тета-типа pBS72 бактерий *B. subtilis*, которая является уникальной и не имеет аналогов среди известных внехромосомных генетических элементов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

Показано, что репликоны, подобные pBS72, широко распространены среди бактерий природных штаммов *B. subtilis*, выделенных из различных природных источников на территории Беларуси.

Выявлены хромосомные детерминанты, необходимые для стабильного поддержания плазмиды pBS72, и установлена новая, ранее неописанная функция генов, детерминирующих синтез белков праймосомного комплекса и системы инициации репликации бактериальной хромосомы.

Изолирована минимальная область плазмидного репликона pBS72, на основе которой создан вектор для молекулярного клонирования в бактериях *B. subtilis*.

Рэзюмэ

Ключавыя словы: *Pseudomonas*, *B. subtilis*, плазмiда, рэплiкон, група несумяшчальнасцi Р-9, *rep*-ген, сайт iнiцыяцыi рэплiкацыi *oriV*, *par*-сiстэма, рэплiкатыўны комплекс клеткi-гаспадара.

У ходзе выканання дадзенага даследавання былі падрабязна ахарактарызаваныя плазмiды групы несумяшчальнасцi Р-9. Выяўлены палiмарфiзм у малекулярнай арганiзацыi вобласцяў iнiцыяцыi рэплiкацыi (*rep*-гене i *oriV* сайце) i генаў, што дэтэрмiнуюць дэградацыю арганiчных злучэнняў (*nahAc*, *nahG*). Паказана, што зыходнымi гаспадарамi плазмiд групы IncP-9 могуць з'яўляцца здольныя i не здольныя да флюарэсцэнцыi бактэрыi роду *Pseudomonas*.

Кланiраваны i секвенiраваны мiнi-рэплiкон R-плазмiды групы IncP-9. Пры правядзеннi функцыянальнага аналізу было вызначана, што для рэплiкацыi плазмiд IncP-9 у бактэрыях *P.putida* дастаткова наяўнасцi *rep*-гену i сайту iнiцыяцыi рэплiкацыi *oriV*, у той час калi у гетэралагiчных гаспадарох (*E.coli*) дадаткова неабходная прысутнасць у цыс-станавiшчы *par*-локусу, якi забяспечвае эфектыўнае размеркаванне плазмiдных копiяў у працэсе клетачнага дзялення.

Вызначана, што плазмiда рМЗ групы IncP-9 не здольная падтрымлiвацца у бактэрыях сям'i *Enterobacteriaceae* пры тэмпературы 37°C (*Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia herbicola*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*). Выяўленая ўласцiвасць дазволiла сканструяваць на аснове плазмiды рМЗ суiцыдальны вектар i выкарыстоўваць яго для транспазоннага мутагенезу бактэрыi сям'i *Enterobacteriaceae*.

Изалявана новая плазмiда тэта-тыпу рBS72 бактэрыi *B.subtilis*, якая з'яўляецца ўнiкальнай i не мае аналагаў сярод вядомых пазахрамасомных генетычных элементаў грамдадатных i грамадмоўных мiкраарганiзмаў.

Паказана, што рэплiконы, падобныя да рBS72, шырока распаўсюджаны сярод бактэрыi прыродных штамаў *B.subtilis*, якiя былі выдзелены з розных прыродных крынiц на тэрыторыi Беларусi.

Выяўлены храмасомныя дэтэрмiнанты, неабходныя для стабiльнага падтрымання плазмiды рBS72, i вызначана новая, раней не апiсаная функцыя генаў, што дэтэрмiнуюць сiнтэз бялкоў праймасомнага комплексу i сiстэмы iнiцыяцыi рэплiкацыi бактэрыяльнай храмасомы.

Изалявана мiнiмальная вобласць плазмiднага рэплiкону рBS72, на аснове якой створаны вектар для малекулярнага кланiравання у бактэрыях *B.subtilis*.