

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ

*На правах рукопису*

УДК 575.224

ПІДПАЛА Ольга Володимирівна

ДНК-ІНДУКОВАНА ГЕНЕТИЧНА  
НЕСТАБІЛЬНІСТЬ У *BACILLUS SUBTILIS*  
ТА ЇЇ ОСОБЛИВОСТІ

03.00.26 - молекулярна генетика

А в т о р е ф е р а т  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

К н і в - 1 9 9 7



Дисертацією в рукопис

Роботу виконано у відділах молекулярної генетики та генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, І.С.КАРПОВА

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,

професор

С.С.МАЛЮТА,

доктор медичних наук,

професор

Т.І.БУЖІЄВСЬКА

Провідна установа: Український науковий гігієнічний центр  
МОН України

Захист відбудеться 20 травня 1997 року о 10 годині  
на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д.01.86.01. Інституту  
молекулярної біології та генетики НАН України за адресою:  
252143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного,150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту  
молекулярної біології та генетики НАН України.

Автореферат розіслано \_\_\_\_\_ 1997 року.

Вчений секретар  
Спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

Л. Л. Лукаш

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ.** Тривалий час спадкову мінливість розглядали як хаотичний і некерований процес. Із відкриттям мобільних генетичних елементів стало очевидним, що в природі явище мінливості, зокрема різні прояви генетичної нестабільності, можуть зумовлюватися наявністю та активністю певних ДНК-змісних структур. На сьогодні геном розглядають як динамічну систему, що активно реагує на зміни навколишнього середовища.

Природні нестабільні мутації мають тенденцію до стабілізації, що ускладнює їх вивчення. З'ясувалося, що для експериментального моделювання генетичної нестабільності зручними є полінуклеотидні послідовності, які можуть спричиняти мутації у про- і еукаріотів із тривалою генетичною нестабільністю. За аналогією до поведінки природних мобільних генетичних елементів, припускають, що фрагменти чужорідної ДНК можуть інтегрувати до генома господаря, активізувати його власні мобільні елементи, або може відбуватися і те, і те (Гершензон С.М., 1991). Використання ДНК-мутагенезу для експериментального моделювання генетичної нестабільності дає змогу тривалий час вивчати це явище за різних контрольованих умов, що є підходом до розкриття механізмів регульованої мінливості.

**МЕТА РОБОТИ** - вивчити прояв ДНК-індукованої генетичної нестабільності *Bacillus subtilis* порівняно із відомими прикладами природних та експериментальних систем генетичної нестабільності.

Перша частина роботи присвячена дослідженню явища наднестабільності, спричиненої дією еукаріотичної ДНК на прикладі лейцинового аутокотрофа із наголосом на таких проявах, що можуть свідчити про наявність та активність транспозоноподібної структури. Були поставлені конкретні завдання: вивчити якісні та кількісні характеристики нестабільності, зокрема частоту та

спектр мутацій у поколіннях; дослідити вплив стресових умов ( температури ) та системи загальної рекомбінації на прояв нестабільної мутації та її транспозиції; спроба виділення фактора генетичної нестабільності.

Друга частина роботи присвячена: 1) розробленню простої тест - системи для відбору потенційно мутагенних конструкцій; 2) моделюванню явища генетичної нестабільності з використанням відомих еукаріотичних послідовностей у складі рекомбінантних ДНК. Завдання другої частини роботи охоплювали: порівняльне дослідження мутагенної активності ДНК споріднених рекомбінантних плазмід із вставкою еукаріотичних послідовностей; відбір інсерційних мутацій; пошук нестабільних варіантів та їх молекулярно-генетична характеристика; одержання прямих доказів транспозиційності інсерційних мутацій.

НАУКОВА НОВИЗНА. Охарактеризовано наднестабільну систему на прикладі ауксотрофного по лейцину мутанта *E. subtilis*, спричиненого дією еукаріотичної ДНК (оселедця), що відрізняється від відомих систем генетичної нестабільності позданням певних властивостей як еукаріотичних систем ( напевно висока частота ревертування, варіабельність фенотипового прояву ознаки), так і прокаріотичних (подовжений у часі процес ревертування, гетерогенність ревертантів, зміна характеру ревертування).

Розроблено просту тест-систему для відбору потенційно мутагенних рекомбінантних молекул ДНК. Показано, що мутагенна активність залежить від якості клонованого фрагмента, де найбільшу мутагенність виявляє Alu-повтор генома людини сам чи в поєднанні із іншими генами еукаріотів.

Молекулярно-генетичними методами на прикладі Alu-повтору генома людини доведено, що чужорідна ДНК може інтегрувати до генома *E. subtilis* і спричиняти генетично нестабільні мутації.

З'ясовано, що Alu-повтор генома людини може тривалий час реплікуватись у складі бактеріальної хромосоми та змінювати свою локалізацію.

Одержана колекція нестабільних мутантів може бути використана для поглибленого дослідження природи й закономірностей ДНК-індукованої генетичної нестабільності, специфічності інсерційного мутагенезу та умов, що сприяють утворенню de novo нових мобільних генетичних структур.

**ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ.** Клітини *B. subtilis*, які здатні поглинати будь-яку ДНК у простих експериментальних умовах, можуть бути зручні для тестування потенційно мутагенних конструкцій, що є важливим для генної терапії та генної інженерії. Водночас відібрані високомутагенні конструкції молекул ДНК зможуть бути використані для одержання рідкісних мутацій та з метою маркерування генів і регуляції їхньої активності.

**ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВИНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ:**

1. Еукаріотична ДНК із високою частотою може спричиняти у бактерії тривалу генетичну нестабільність.
2. Мутагенна активність чужорідної ДНК залежить від якості полінуклеотидної послідовності, зокрема наявності повторюваних елементів.
3. Причиною генетичної нестабільності може бути інтеграція чужорідної ДНК.
4. Інтегрована чужорідна послідовність може тривалий час утримуватись у хромосомі реципієнта і змінювати свою локалізацію.

**АПРОВАЦІЯ РОБОТИ.** Основні результати дисертації доповідалися на конкурсі молодих вчених (ІФРiГ, 1987) та були представлені тезово на XVI Міжнародному генетичному конгресі (Канада, Торонто, 1988), конференції молодих вчених (ІФРiГ, 1989), на VI

та VII Всесоюзних симпозиумах " Молекулярні механізми генетичних процесів " (Москва, 1987, 1991). За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей і тези трьох доповідей.

**СТРУКТУРА ТА ОБСЯГ РОБОТИ.** Дисертацію викладено на 139 сторінках. Вона містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи, експериментальну частину, обговорення результатів, висновки, а також додатки. Список літератури охоплює 215 найменувань. Дисертацію проілюстровано 31 рисунком та 11 таблицями.

Основні результати, викладені у дисертації, одержані автором самостійно. Експерименти з молекулярно-генетичного аналізу мутантів (дот- і блот-гібридизація) були здійснені спільно зі співробітниками відділу регуляторних механізмів клітини ІМБіГ НАНУ І.Є.Костецьким, С.Є.Римар та співробітниками відділу генетики мікроорганізмів Інституту загальної генетики РАН (Москва) Г.В.Савченко, В.І.Башкіровим та Ф.К.Хасановим.

#### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Штами бактерій та плазміди. У процесі виконання роботи використовувалися такі штами *Bacillus subtilis*: SHGW, SHP42 (із колекції ІЯФ РАН, С.-Петербург); штами K1Tiv, BD170, BD224, надані Г.В.Савченко (із колекції лабораторії генетики мікроорганізмів ІЗГен РАН, Москва); LeuB-3, одержаний І.С.Карповом.

Для здійснення експериментів використано плазміди : pBD64 (із колекції лабораторії генетики мікроорганізмів ІЗГен РАН, Москва); pBR322, pUC18 та pUC19 ( із колекції ІМБіГ НАНУ ); pBR322ins та pBR322insN, надані Ю.М.Пацковським (ІМБіГ НАНУ); pAL1 ( із колекції Інституту цитології РАН, С.-Петербург ); pWT і pA401, надані В.П.Шульженком та pAins - І.С.Вараановою (ІМБіГ НАНУ).

Середовища і реактиви. Для вирощування бактеріальних куль-

тур як повноцінне середовище використовували 1,5 % агар Хот-тінгера, а як мінімальне - напівтверде 1 % середовище агару, розведене розчином Спіцайзена. До селективних агаризованих середовищ додавали амінокислоти в кінцевих концентраціях: для L-амінокислот - 50 мкг/мл, для DL-амінокислот - 100 мкг/мл; асортисти основи - 20 мкг/мл; вітаміни - 1 мкг/мл та антибіотики у таких кінцевих концентраціях: хлорамфенікол - 20 мкг/мл, канаміцин - 5 мкг/мл, мітоміцин - 0,05 мкг/мл, рифампіцин - 3 мкг/мл.

У роботі використовували рестрикційні ендонуклеази виробництва НВО "Фермент" (Вільнюс, Литва) за умов, рекомендованих виробниками ферментів.

Трансформація компетентних клітин *B. subtilis* здійснювали за модифікованим методом Анагностопулоса і Спіцайзена (Прогоров, 1980).

Одержання препаратів ДНК. Хромосомну ДНК *B. subtilis* одержували за модифікованим методом Кірбі (Прогоров, 1980) та методом міні-екстракцій (за курсами ЕМВО). Плазмідну ДНК із клітин *B. subtilis* одержували методом лужної денатурації Бірнбойма і Доли (Birnboim, Doly, 1979).

Рестрикцію здійснювали, як зазначено (Маниатис, 1984).

Електрофорез ДНК проводили у горизонтальних пластинках 0,8 % агарози у трис-ацетатному буфері протягом 16 годин за кімнатної температури. Візуалізацію смуг у гелі здійснювали шляхом забарвлення розчином бромистого етидію (1,5 мкг/мл). Фотографували на ультрафіолетовій лампі через оранжевий фільтр на плівку мікрат 200.

ДНК - мутагеназа здійснювали за модифікованою методикою (Карпова і др., 1994).

Дот- і блот-гібридизація. Перенесення ДНК на нітроцелю-

ловні фільтри адійснювали за методом Смита і Саммерса ( Smith, Summers, 1980). Гібридацію ДНК із міченою пробкою проводили у поліетиленових пакетах за загальноприйнятою методикою ( Маниатис и др., 1984).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ, СПРИЧИНЕНОЇ ДІЄЮ СУМАРНОГО ПРЕПАРАТУ ЧУЖОРІДНОЇ ДНК

#### Зміна прояву нестабільності з часом у лейциназалежного ауксотрофа Leu 5-3

Об'єктом дослідження був представник групи нестабільних лейцинових мутантів, спричинених дією комерційного препарату еукаріотичної ДНК (ДНК оселедця) (Карпова И.С., 1979).

Головною особливістю лейцинового ауксотрофа Leu 5-3 була надавичайно висока частота ревертування, яка на дев'ять порядків перевищувала частоту ревертування батьківського штаму. У первісного мутанта частота варіювала від клону до клону за середнього значення 54,5 %.Надавичайно високу частоту ревертування, що сягає десятків відсотків, описано для вищих рослин на прикладі антоціанових пігментів. Її пояснюють інсерцією контролюючого елемента не до структурного гена, а до регуляторної зони, що призводить до прояву/непрояву гена на рівні транскрипції (Fincham J.R.S., 1973). У рослин варіювали розмір та інтенсивність забарвлення плям. У нестабільного лейциназалежного ауксотрофа Leu 5-3 варіювали розмір колоній ревертантів, мозаїчність їх складу, чутливість до лейцину.

Після зберігання культури впродовж тривалого часу прояви

нестабільності помітно змінювались, а саме: частота ревертування зменшилась до 20-25 %; динаміка ревертування змінилась так, що процес формування ревертантів відбувався не 72 години, а тривав до 96 годин (рис.1). Явище зміни проявів нестабільності аутотрофності відоме для штамів сальмонели, що містять природний мобільний генетичний елемент (Smith-Keary P.F., 1972).

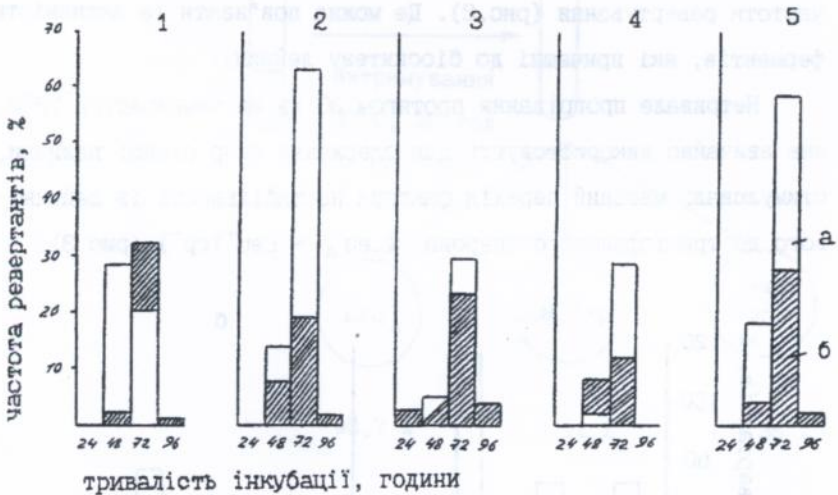


Рис.1. Розподіл ревертантів у розсівах окремих клонів лейцинового аутотрофа Leu 5-3 за часом їх формування на селективному середовищі:  
а - після виділення мутантів;  
б - після тривалого зберігання;  
1-5 - номери клонів

Дослідження впливу температури на прояв нестабільності

Відомо, що температурний стрес може впливати на прояви генетичної нестабільності.

Вивчення впливу температури на прояв нестабільності лейцинового мутанта Leu 5-3 показало, що помірне підвищення температури інкубації до 45° С не впливало на виживання за умов повноцінного середовища. Проте на селективному середовищі без лейцину, а особливо із лейцином, спостерігали значне зниження частоти ревертування (рис.2). Це можна пов'язати із активністю ферментів, які причетні до біосинтезу лейцину.

Нетривале прогрівання протягом 30 хв за температури 75°С, яке звичайно використовують для одержання спор сінної палички, стимулювало масовий перехід фактора нестабільності із лейцинового до триптофанового оперона ( $Leu^-_{\Delta} \rightarrow Leu^{+}Trp^-$ ) (рис.3).

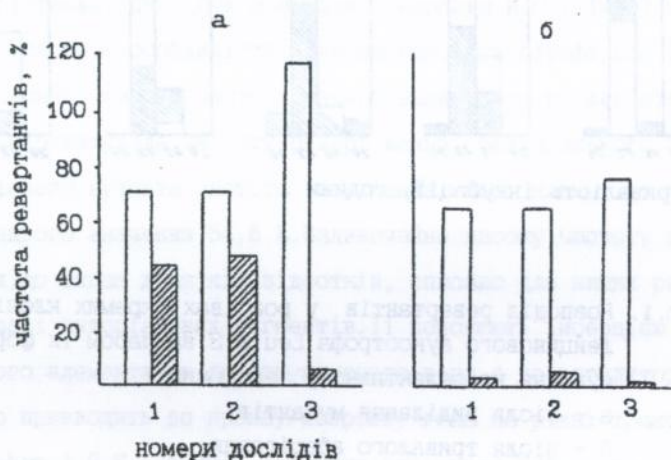


Рис.2. Вплив зміни температури на характер ревертування лейциназалежного мутанта Leu 5-3 на середовищі без лейцину (а) та з лейцином (б);

□ - 37°С; ▨ - 45°С

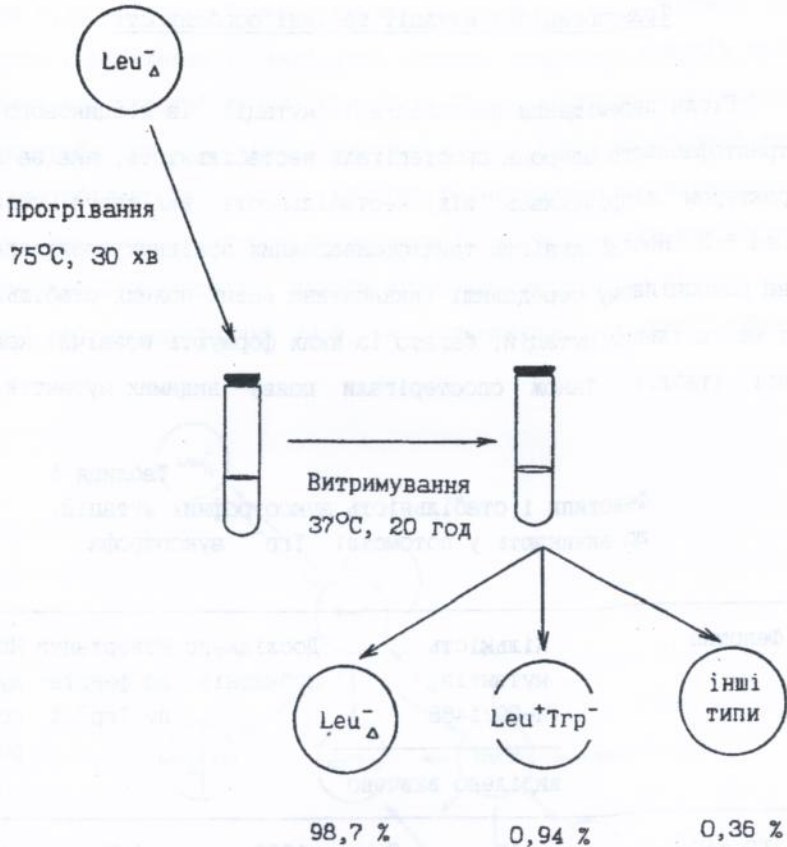


Рис.3. Умови переміщення нестабільної мутації із лейцинового до триптофанового оперона

Триптофанаалежні ауксотрофи морфологічно відрізнялись від вихідного батьківського мутанта  $Leu$  5-3. При їх розсіві спостерігали появу видимих мозаїчних колоній, а також "ревертантів" до вихідного типу ( $Leu^+Trp^- \rightarrow Leu^-_{\Delta}$ ).

Отже, за дії високої температури в потомстві нестабільного мутанта спостерігали одночасне повднання двох або більше мутаційних подій.

Транспозиційні мутації та їхні особливості

Після переміщення нестабільної мутації із лейцинового до триптофанового оперона спостерігали нестабільність, яка за характером відрізнялась від нестабільності вихідного мутанта Leu 5-3. Нестабільність триптофаназалежних похідних проявлялась на повноцінному середовищі (виникнення нових прямих стабільних і нестабільних мутацій, багато із яких формують мозаїчні колонії) (табл.1). Також спостерігали появу видимих мутантів, у

Таблиця 1  
Фенотипи і стабільність ауксотрофних мутацій,  
що виникають у потомстві  $\text{Trp}^-$  ауксотрофа

Фенотип	Кількість мутантів, n=39/1488		Досліджено субклонів	Ревертанти до фенотипу $\text{Trp}^-$ , %	Нові ауксотрофи, %
	виділено	вивчено			
$\text{Trp}^- \text{Nic}^-$	12	2	1630	1,7	1,4
$\text{Trp}^- \text{Leu}^-$	2	2	179	0	1,7
$\text{Trp}^- \text{Met}^-$	2	2	190	0	2,7
$\text{Trp}^- \text{Cys}^- (\text{Met}^-)$	2	2	206	7,0	0
$\text{Trp}^- \text{Cys}^\pm (\text{Met}^\pm)$	1	1	311	0	2,3
$\text{Trp}^- \text{Ala}^-_\Delta$	1	1	112	0	0,9
$\text{Trp}^- \text{Nic}^- \text{Met}^\pm$	1	1	135	3,7	6,7
$\text{Trp}^- \text{Met}^- \text{Thr}^-$	1	1	130	75,4	1,5
$\text{Trp}^- \text{Pur}^- \text{Vit}^\pm$	1	1	436	61,9	8,9
Не ідентифіковані	16				

Примітка: Vit - суміш водорозчинних вітамінів, що стимулює ріст;

Pur - ріст на аденіні або гуаніні;

$\pm$  - неповний ауксотроф;

$\Delta$  - нестабільність за типом мутації Leu 5-3.

яких були зміннені: форма і розмір колоній, будова і густина поверхні, забарвлення і деякі інші ознаки. Внаслідок пошуків найскладніших нестабільних мутантів було знайдено аланінового ауксотрофа (рис.4), який поєднував у собі два вище згадані типи нестабільності: високу частоту ревертування за селективних умов, яка за характером нагадувала ревертабільність вихідного штаму *Leu* 5-3; здатність давати прямі ауксотрофні та видимі мутації за неселективних умов, як у триптофанових ауксотрофів.

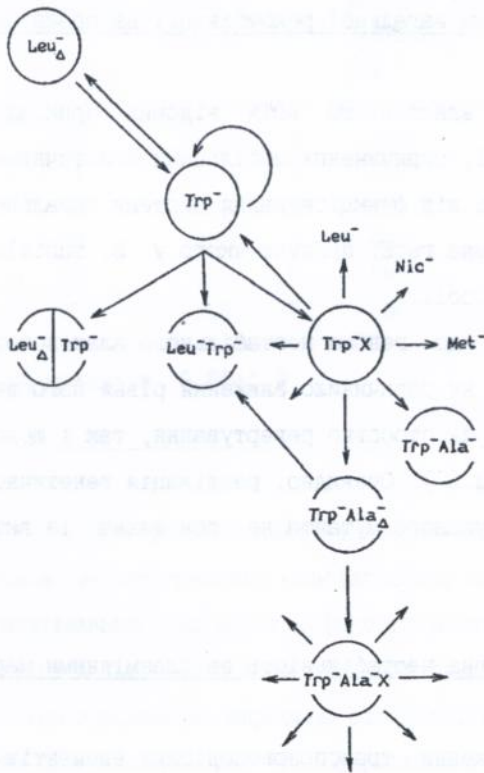


Рис.4. Схема перетворення нестабільної мутації в експериментальній системі генетичної нестабільності лейцинозалежного ауксотрофа *Leu* 5-3

Зазначені особливості можна пояснити, припустивши, що фактор нестабільності внаслідок тривалого зберігання, пересівання, температурного стресу, зберігши здатність до індукування високої ревертабільності в межах лейцинового оперона, набув властивість викликати мутації у ріаних локусах, віддалених один від одного. Можливо, внаслідок таких переміщень фактор нестабільності сам зазнає якісних змін.

### Вплив системи загальної рекомбінації на прояв нестабільності

Спільною властивістю всіх відомих прикладів генетичної нестабільності, спричинених мобільними генетичними елементами, є незалежність від функціонування системи загальної рекомбінації, а саме гена *recE*, продукт якого у *B. subtilis* є аналогом *Rec-A* білка *E. coli*.

Введення до генома нестабільного аланінового аукоотрофа мутації *recE4* не спричинило зниження рівня його двонаправленої мутабільності як стосовно ревертування, так і щодо прямого мутування (табл.2). Очевидно, реалізація генетичної нестабільності досліджуваного мутанта не пов'язана із активністю гена *recE4*.

### Генетична нестабільність за плазмідними маркерами

Для виділення транспозоноподібних елементів дотримуються загальноприйнятої схеми, коли до клітини вводять плазмиду-мішень із кількома маркерами стійкості до антибіотиків і за інактивацією одного із маркерів проводять селекцію структур, що вклучили транспозон (транспозоноподібну структуру).

Таблиця 2  
Частота прямих аукоотрофних мутацій у потомстві не-  
стабільного штаму до і після введення маркера *gcsE4*

Штам							
П-1 ( <i>gcs<sup>+</sup></i> )				П-1 ( <i>gcsE4</i> )			
Клон	Дослід- жено	Кількість мутантів	Частота мутан- тів, %	Клон	Дослід- жено	Кількість мутантів	Частота мутан- тів, %
	субкло- нів				субкло- нів		
1	1368	170	12,4	1	345	21	6,1
2	103	1	1,0	2	287	1	0,4
3	621	5	0,8	3	1191	34	2,9
4	878	38	4,3	4	936	2	0,2
5	830	15	1,8	5	1687	51	3,0
6	3669	37	1,0	6	98	19	19,2
Середня частота мутантів			3,55±1,9				5,3±3,0
				P<0,95			

Із метою виділення фактора нестабільності ми ввели до не-  
стабільних штамів неінтегративну стафілококову плазмиду pBD64  
( $St^rKm^r$ ), сподіваючись на перехід фактора нестабільності на  
плазмиду. Із частотою близько 5 % ми отримали плазмідних транс-  
формантів із інактивованим маркером стійкості до канаміцину  
( $St^rKm^S$ ). Проте при розсівах цих трансформантів з'ясувалось, що  
вони набули нестабільності за плазмідними маркерами. У деяких  
випадках плазмідна нестабільність поєднувалась із новою ауко-  
отрофністю за хромосомними маркерами. Електрофоретичне дослі-  
дження препаратів плазмідної ДНК, виділених із цих мутантів, по-

казало наявність поряд із плазмідною ДНК, високомолекулярної ДНК. Рестриктивний аналіз і блот-гібридація показали, що досліджена високомолекулярна ДНК нагадує хромосомну послідовність із невеликими фрагментами ДНК плазмідного походження.

Аналізуючи одержані результати, можна припустити, що фактор нестабільності відрізняється від класичних транспозонів тим, що ще перебуває у стані формування і не має еволюційно закріпленого механізму транспозиції. Це може бути пов'язане з тим, що нестабільність цього типу спричинена фрагментом еукаріотичної ДНК, яка інтегрувала до бактеріального генома.

#### РОЗРОБЛЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СИСТЕМИ ГЕНЕТИЧНОЇ НЕСТА- ВІЛЬНОСТІ З ВИКОРИСТАННЯМ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

##### Порівняльна оцінка мутагенності рекомбінантних плазмід

Друга частина роботи присвячена моделюванню явища генетичної нестабільності з використанням відомих еукаріотичних послідовностей у складі рекомбінантних плазмід. Було використано 9 плазмід *E. coli* загального походження, які різнилися між собою розмірами та якістю клонованого фрагмента, із них три векторні (pBR322, pUC18 і pUC19) і 6 рекомбінантних із вставками: Alu-повтору генома людини (pAL1), гена інсуліну людини (pBR322ins, pBR322insN), Alu-повтору і гена інсуліну людини (pAins), Alu-повтору і гена аполіпропротеїну людини apoA1 (pWT) та ще ARS-послідовності кукурудзи (pA401) (рис.5). Мутагенну активність рекомбінантних плазмід визначали за частотою індукції ауксотрофних мутантів.

Серед комерційних плазмід мутагенний ефект проявляла рBR322, тоді як мутагенність у випадку дії рUC18 та рUC19 достовірно не перевищувала спонтанний (рис.5). Немутагенними виявились також і дві похідні рBR322 - рBR322ins та рBR322insN.

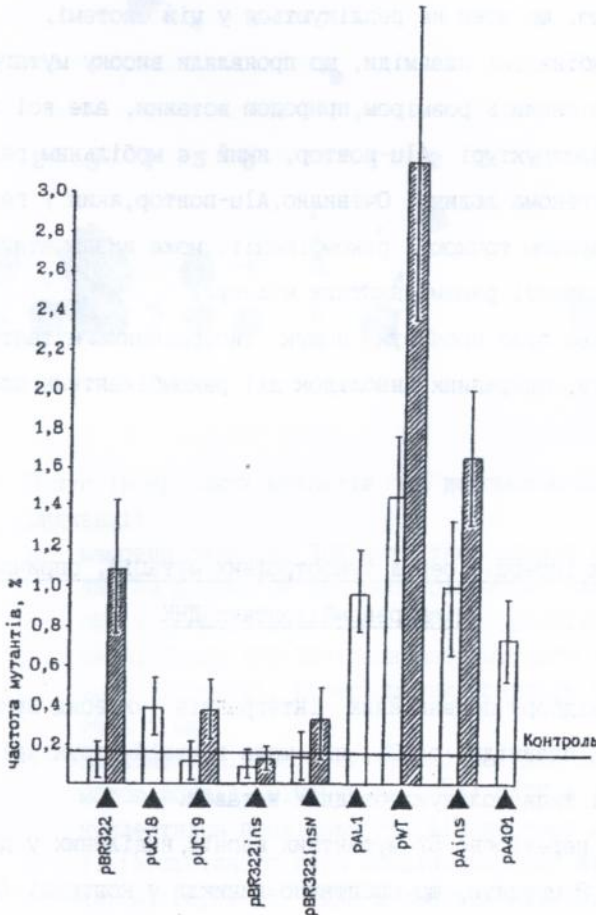


Рис.5. Мутагенна активність рекомбінантних плазмід у трансформаційній системі *B.subtilis*

□ - 50 мкг/мл  
▨ - 100 мкг/мл

Чотири похідні рUC18, які у своїй структурі несуть Alu-повтор людини сам, чи у поєднанні із іншими генами еукаріотів ( рAL1, рWT, рAins, рA401), проявляли високу мутагенну активність. Серед них наймутагеннішою була рекомбінантна плазмід рWT.

Мутагенну активність рекомбінантних плазмід E.coli можна пояснити їхньою інтеграцією до хромосоми сінної палички, оскільки відомо, що вони не реплікуються у цій системі.

Рекомбінантні плазмід, що проявляли високу мутагенну активність, різнилися розміром, природою вставки, але всі вони мали у своїй структурі Alu-повтор, який є мобільним генетичним елементом генома людини. Очевидно, Alu-повтор, який у геномі людини є "гарячою точкою" рекомбінації, може визначати інтеграційні можливості рекомбінантних молекул.

Важливо було провести пошук інсерційних мутантів серед ауксотрофів, одержаних внаслідок дії рекомбінантних плазмід.

#### Пошук інсерцій серед ауксотрофних мутацій, спричинених дією рекомбінантних ДНК

Для відбору потенційних інтегрантів як зонд використали мічену ДНК плазмід рA401, яка мала в своїй структурі всі досліджувані типи полінуклеотидних вставок.

Було перевірено 57 мутантних клонів, виділених у дослідних пробах, і 3 мутанти, що спонтанно виникли у контролі (рис.6а). За результатами дот-гібридації видно, що із зондом гібридувалась ДНК 8 з 20 мутантів, індукованих нативною плазмідною

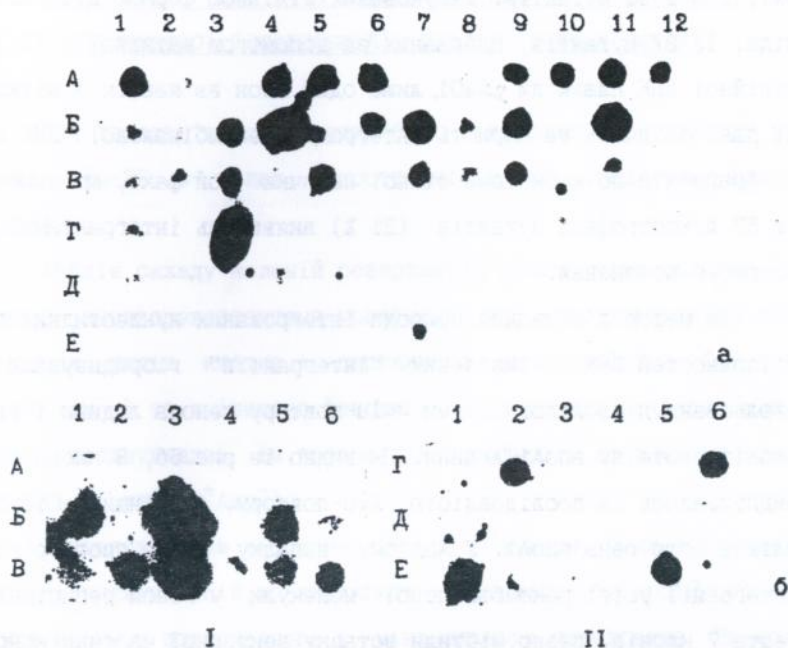


Рис.6. Пошук інсерційних мутантів за допомогою дот-гібридації:

а - масовий скринінг ДНК мутантних клонів, одержаних за допомогою ДНК рекомбінантних плазмід : pWT (A1- Б8); pWT/EcoR1 (Б9-Б6); pA401(Б7-Г7); pA401/EcoR1 (Г8-Д9); спонтанні мутанти у контролі (Д10-Д12); Е-негативний контроль ДНК фагу  $\lambda$  1  $\mu$ г

б - ідентифікація вставки чужорідної ДНК за допомогою зондів, мічених по ( $^{32}$ P) dATP : I-полінуклеотидна послідовність Alu-повтору людини, II-ізольованого гена аполіпопротеїну А1 людини: А1-Б6,Г1-Д6 - ДНК мутантних клонів; В,Е - контрольні проби ( В1-Б3 - ДНК Alu-повтору у розведеннях; Б5,Б6 - ДНК фагу  $\lambda$ ; Б6, Е5 - ДНК плазміди pA401 ; Е1-Е3 - послідовність гена apoA1 у розведеннях)

pWT, і 3 з 10 мутантів, індукованих лінійною формою цієї плазміди. Із 27 мутантів, одержаних за допомогою нативної (13) і лінійної ДНК плазміди pA401, лише один клон зв'язався з міткою. Ці дані свідчать на користь інтеграції рекомбінантної ДНК або її фрагмента до хромосоми сінної палички. Той факт, що лише 12 із 57 ауксотрофних мутантів (21 %) виявились інтегрантами, ще потребує пояснення.

Із метою з'ясування природи інтегрованих нуклеотидних послідовностей ДНК 12 виявлених "інтегрантів" гібридизували із ізолюваними послідовностями Alu-повтору генома людини і гена аполіпропротеїну apoA1 людини. Як видно із рис.66, 3 клони гібридизувались із послідовністю Alu-повтору, а 2 інших - із послідовністю гена apoA1. У жодному випадку ми не спостерігали інтеграції усієї рекомбінантної молекули у геном реципієнта. Решта 7 клонів, певно, містили вставку векторної частини конструкції.

Використання бактеріальної моделі давало можливість простежити за долею одиничного Alu-повтору генома людини і встановити ймовірність його реплікації, транспозиції чи елімінації за умов гетерологічного оточення.

З огляду на високу частоту ревертування (від  $1,6 \cdot 10^{-3}$  -  $3,2 \cdot 10^{-4}$  до  $5 \cdot 10^{-4}$  -  $1 \cdot 10^{-5}$ ), а також зростання частоти прямих ауксотрофних мутантів (яка досягала 2,5 - 3,4 %), всі три Alu-інтегранти виявляли двонаправлену нестабільність. Треба зазначити, що спектр як первинного, так і вторинного мутагенезу обмежувався чотирма основними фенотипами (Asp<sup>-</sup> - аспарагінова кислота; Ile<sup>-</sup> - ізолейцин-валін; Orn<sup>-</sup> - орнітин; Thr<sup>-</sup> - треонін).

Молекулярно-генетична характеристика нестабільності,  
спричиненої інсерцією Alu-повтору генома людини

Для детальнішого вивчення було відібрано інсерційного мутанта Alu-33 з новою аукоотрофністю по ізолейцину-валіну ( $Lys^{-}Ilv^{-}$ ).

Аналіз складу колоній ревертантів цього штаму показав, що вони є псевдоревертантами-мозаїками, які складаються із двох основних типів клітин: первинного аукоотрофного фенотипу ( $Lys^{-}Ilv^{-}$ ) та аміненого фенотипу, де реверсія по ізолейцину-валіну пов'язувалась із появою аукоотрофності по аспарагіновій кислоті ( $Lys^{-}Ilv^{+}Asp^{-}$ ).

Використовуючи гібридизацію по Саузерну були досліджені основні типи колоній, що виникають у потомстві інсерційного мутанта за умов повноцінного і мінімального середовища. Як зонд використовували ДНК плазмиди pAL1, що містить Alu-повтор генома людини.

Елот-гібридизація хромосомної ДНК, виділеної із клонів, що вирости на повноцінному середовищі, в усіх випадках показала наявність двох зон гібридизації (рис.7, а-в). Аналіз матеріалу клонів псевдоревертантів показав появу додаткових зон гібридизації (рис.7, г-е). Зв'язування міченого зонду із хромосомою в усіх випадках свідчить про збереження інтегрованого повтору в ході реплікації, а поява додаткових зон гібридизації у разі використання селективного середовища може бути наслідком переміщення Alu-повтору генома людини. Отже, фенотипові відмінності колоній за аукоотрофністю збігаються із даними денситометрії радіоавтографів ДНК, виділеної із клонів вихідного інсерційного мутанта і похідних від нього псевдоревертантів.

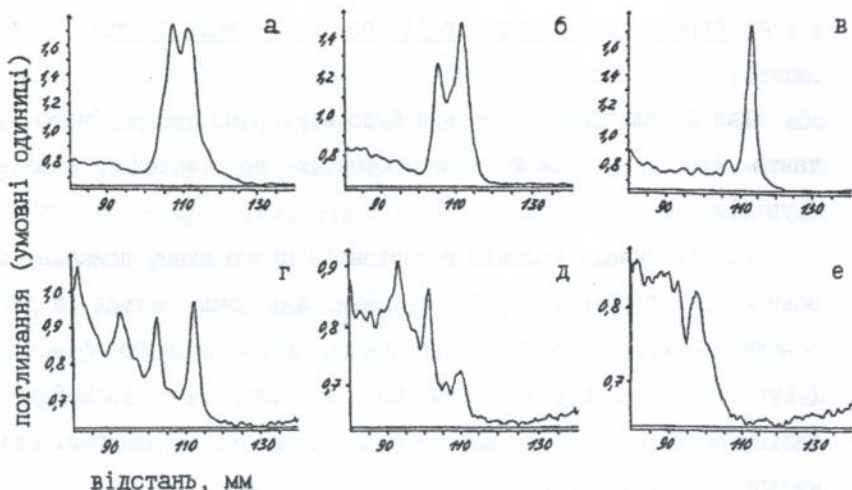


Рис.7. Результати денситометрії радіоавтографів, одержаних після гібридації по Саузерну хромосомної ДНК, виділеної із субклонів інсерційного мутанта *B.subtilis* (а-в) та його нащадків, сформованих на селективному середовищі (г-е)

Таким чином, можна підсумувати, що обидві досліджені нами системи генетичної нестабільності, маючи між собою спільні риси, відрізняються від відомих природних та індукованих нестабільних мутантів прокаріотів. Особливості досліджуваної нестабільності логічно пов'язати із тим, що вони були спричинені дією екзогенної ДНК еукаріотичного походження, яка на 60-80 % збагачена повторюваними послідовностями різних класів. Це підтверджується фактом високої мутагенності рекомбінантних плазмід, що мають у своєму складі Alu-повтор генома людини. Очевидно, що мутагенна активність і, пов'язана з нею, генетична нестабільність визначається певними подіюклетидними послідовностями, які здатні інтегрувати до бактеріального генома за механізмом незаконної рекомбінації.

## ВИСНОВКИ

1. Охарактеризовано систему генетичної нестабільності лейцинозалежного мутанта *Bacillus subtilis* Leu 5-3, спричиненого дією сумарного препарату еукаріотичної ДНК (оселедця).
2. Одержано сукупність даних, які свідчать про наявність у нестабільного лейцинозалежного мутанта Leu 5-3 транспозонподібної структури: зміна частоти та спектру мутагенезу у часі; вплив температури на ревертабільність і транспозиційність; одночасне поєднання двох або більше мутаційних подій; транспозиційність мутацій; гес-незалежний характер прояву генетичної нестабільності.
3. Створено контрольовану експериментальну систему генетичної нестабільності *Bacillus subtilis*, індуктором якої є рекомбінантні плазмиди, що містять еукаріотичні гени.
4. Показано, що мутагенна активність рекомбінантних конструкцій залежить від їхньої структури, зокрема наявності Alu-повтору генома людини.
5. Продемонстровано інсерційну природу мутацій у *Bacillus subtilis*, спричинених дією ДНК рекомбінантних плазмід, що містять еукаріотичні послідовності.
6. Одержано прямі докази на користь участі мобільного елемента людини у виникненні генетичної нестабільності у *Bacillus subtilis*: інсерційна природа; варіабельність вставки у подальших поколіннях; факт транспозиції.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Карпова И.С., Пидпала О.В. Проявления нестабильности у дейциनावисимого аукоотрофа *Bacillus subtilis*, полученного с помощью ДНК сельди // Цитология и генетика. - 1986. - 20, N1. - С.40-46.
2. Карпова И.С., Пидпала О.В. Нестабильность и транспозиции мутации, индуцированной у сенной палочки с помощью чужеродной ДНК. - Тезисы VI Всесоюзного симпозиума "Молекулярные механизмы генетических процессов", Москва, 1987. - С.164-165.
3. Karpova I.S., Pidpala O.V. Instability in *Bacillus subtilis* which involves chromosomal and plasmid markers // XVI th International Congress of Genetics, Toronto, 1988. - P.425.
4. Пидпала О.В., Карпова И.С. Транспозиция нестабильной мутации сенной палочки, полученной с помощью чужеродной ДНК // Докл. АН УССР, Серия "Б". - 1989, N 9. - С.78-80.
5. Карпова И.С., Пидпала О.В. Генетическая нестабильность у *Bacillus subtilis*, индуцируемая чужеродной ДНК // Мутагенное действие природных и синтетических полинуклеотидов. - Киев: Наук. думка, 1990. - С.48-71.
6. Карпова И.С., Пидпала О.В. Рес-независимая нестабильность у *Bacillus subtilis*. - Тезисы VII Всесоюзного симпозиума "Молекулярные механизмы генетических процессов", Москва, 1990. - С.226.
7. Карпова И.С., Пидпала О.В. Рес-независимая нестабильность у *Bacillus subtilis* // Биополимеры и клетка. - 1991. - 7, N 2. - С.15-19.
8. Карпова И.С., Пидпала О.В., Шульженко И.Н., Костецкий И.Е., Корецкая Н.В., Лукаш Л.Л. Мутагенная активность ДНК рекомбинантных плазмид в компетентной культуре *Bacillus subtilis* // Цитология и генетика. - 1994. - 28, N 1. - С.66-73.

АННОТАЦИЯ

Пидпала О.В. ДНК-индуцированная генетическая нестабильность у *Bacillus subtilis* и ее особенности.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.26 - молекулярная генетика.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 1997.

Защищаются 5 научных работ, которые содержат результаты исследований по изучению ДНК-индуцированной генетической нестабильности у *Bacillus subtilis*. Показано, что чужеродная ДНК эукариотического происхождения (коммерческий препарат, либо фрагменты, клонированные в составе рекомбинантных плазмид) может вызывать у *B. subtilis* генетическую нестабильность. Установлено, что исследуемая система генетической нестабильности имеет общие черты с некоторыми известными нестабильными системами эукариот и прокариот. С помощью метода блот-гибридизации выявлено, что в геноме ряда генетически нестабильных мутантов произошла встройка Alu-повтора. Обнаружено, что Alu-повтор генома человека сохраняется в составе бактериального генома и может при этом изменять свою локализацию. Предполагается, что исследуемые ДНК-мутагены и генетическая нестабильность связаны с присутствием определенных полинуклеотидных последовательностей, очевидно повторами, которые способствуют неадекватной рекомбинации между негомологичными последовательностями ДНК.

SUMMARY

Pidpala O.V. DNA-induced genetic instability in *Bacillus subtilis* and its peculiarities.

The Candidate Thesis for a Philosophy Doctor degree in speciality 03.00.26 - molecular genetics.

Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Science of the Ukraine, Kyiv, 1997.

5 scientific publications, which contain results of the investigation of DNA-induced genetic instability in *Bacillus subtilis* are presented. Genetic instability in *B. subtilis* induced by foreign DNA of eukariotic origin (commercial preparation or fragments being cloned in recombinant plasmids) was investigated. It has been shown that the similarity of genetic instability under study with some known eukariotic and prokariotic genetic instability systems occurs. Data obtained by blot-hybridization demonstrated the Alu-repeat insertion in some genetically instable mutants. It was shown that Alu-repeat of the human genom remains in the bacterial genome and can change its location there. DNA-mutagenic activity and genetic instability under study are supposed to be connected with particular polynucleotide sequences, presumably repeats which stimulate illegitimate recombination between nonhomologous sequences.

Ключові слова: ДНК-мутагенез, рекомбінантні плазміди, генетична нестабільність, інсерційні мутації, транспозиції, Alu-повтор генома людини.

*O. Pidpala*

---

Підписано до друку 07.04.97р. Формат 60x84/16.  
Ум. друк. арк. 1,0. Обл.-вид. арк. 1,0.  
Наклад 100. Зам. 116.

---

Відділ оперативної поліграфії  
Центру Міжнародної освіти  
227-12-75, 227-37-86

1.2.5048

AB 37.557