

13. Polak P., Domany E. Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes // BMC Genomics.- 2006.- vol.7.- P.133.
14. Hamdi H.K., Nishio H., Tavis J., Zielinski R., Dugaiczuk A. Alu-mediated phylogenetic novelties in gene regulation and development // J.Mol.Biol.- 2000.- vol.299, № 4.- P.931-939.
15. Усманова Н.М., Казаков В.И., Томилин Н.В. Ретротранспозоны *Alu*- семейства из цис-регуляторных модулей промоторов генов *DNaseII* и *CAML* влияют на генную экспрессию в клетках А549 и НЕК293 // Цитология.- 2008.- Т.50, № 3.- С.249-255.
16. Pegg A.E. Repair of O<sup>6</sup>-alkylguanine by alkyltransferases // Mutat. Res.- 2000.- vol.262, № 2-3.- P.83-100.
17. Guan Q., Matsumoto K., Nakabeppu Y., Iwaki T. A comparative immunohistochemistry of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 in diffusely infiltrating astrocytomas // Neuropathology.- 2003.- vol.23, № 3.- P.203-209.
18. Kohany O., Gentles A.J., Hankus L., Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and Censor // BMC Bioinformatics.- 2006.- vol.7.- P. 474.
19. Mariño-Ramírez L., Lewis K.C., Landsman D., Jordan I.K. Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes // Cytogenet. Genome Res.- 2005.- vol.110, №1-4.- P.333-341.
20. Polavarapu N., Mariño-Ramírez L., Landsman D., McDonald J.F., Jordan I.K. Evolutionary rates and patterns for human transcription factor binding sites derived from repetitive DNA // BMC Genomics.- 2008.- vol.9.- P.226.
21. Bourque G., Leong B., Vega V.B., Chen X., Lee Y.L., Srinivasan K.G., Chew J.L., Ruan Y., Wei C.L., Ng H.H., Liu E.T. Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements // Genome Res.- 2008.- vol.18, №11.- P.1752-1762.
22. Oei S.L., Babich V.S., Kazakov V.I., Usmanova N.M., Kropotov A.V., Tomilin N.V. Cluster of regulatory signals for DNA polymerase II transcription associated with Alu family repeats and CpG islands in human promoters // Genomics.- 2004.- vol.83, № 5.- P.873-882.

#### Резюме

В промоторной области гена *MGMT Homo sapiens* идентифицировано *AluSp*-повтор, который несет сайты связывания для восьми транскрипционных факторов. Наличие цис-регуляторного модуля может свидетельствовать о функциональной активности данного МГЕ.

*AluSp* repeat having eight binding sites for transcription factors have been identified in the human *MGMT* promoter. The availability of cis-regulatory module may be evidence of possible functional significance of this mobile element.

**РОМАНИЮК Л.В.<sup>1</sup>, ЖУМИНСКАЯ А.И.<sup>2</sup>, МУКВИЧ Н.С.<sup>1</sup>, ТОВКАЧ Ф.И.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,  
Украина, Киев ГСП, Д03680, ул. Академика Заболотного, 154,  
e-mail: lyuromanyuk@rambler.ru

<sup>2</sup>Одесский национальный университет им. И.И Мечникова,  
Украина, 65029, Одесса, ул. Дворянская, 2

### **ОБЩАЯ ТРАНСДУКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ И ПЛАЗМИДНЫХ МАРКЕРОВ ЭРВИНИОФАГОМ ZF40**

Явление трансдукции - это перенос бактериальных генов из одной клетки в другую бактериофагами, приводящий к изменению наследственных признаков клетки.

Трансдукция рассматривается как один из методов генной инженерии, где фагам отведена роль универсального инструмента при горизонтальном переносе генов [1]. Как и плазмиды, вирусы бактерий способны преодолевать межвидовые генетические барьеры, широко распространяя различные гены, в том числе и гены, отвечающие за формирование патогенности у бактерий [2]. Трансдукция осуществляется как умеренными, так и вирулентными бактериофагами, способными переносить хромосомные гены, а также внехромосомные генетические элементы [3,4]. Главным этапом в образовании трансдуцирующих частиц бактериофагов является процесс упаковки ДНК. В основе механизма генерализованной трансдукции лежит циклическая пермутация фагового генома, которая позволяет упаковывать в прокапсид не только фаговую, но и плазмидную ДНК или любой участок бактериальной хромосомы [5].

Ранее было установлено, что для фага ZF40 *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Есс) характерны циклическая пермутация вирионной ДНК и механизм упаковки генома по типу "заполнения" головки [6]. Цель представленной работы состояла в изучении возможности фага ZF40 осуществлять перенос хромосомных генов и внехромосомных генетических элементов.

Трансдуцирующими фагами в работе были два *cleag*-мутанта фага ZF40-  $c_6$  и 421. ZF40 $c_6$  – точечный мутант, был получен с помощью гидроксилamina [7]. Вирулентный мутант ZF40/421 имел более существенные и значимые изменения в упаковке ДНК [8]. Трансдуцирующие лизаты фагов ZF40 $c_6$  и ZF40/421 получали методом слитного лизиса на штамме-доноре Есс RC5297. Реципиентами для последующего заражения служили ауксотрофные мутанты *E. carotovora*. Биохимические мутанты, зависимые по урацилу Есс62А-d1/7, Есс62А-d1/8 получены после действия 2 – аминопуриннитрат [9]. Группа других мутантов, Есс62А-d1/50arg<sup>-</sup>, Есс62А-d1/P5met<sup>-</sup>, Есс62А-d1/17-8met<sup>-</sup> Есс62А-d1/58met<sup>-</sup> получены с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина - НГ [9]. Для определения переноса генов нехромосомного происхождения использовали плазмиду рКМ101 *Salmonella typhimurium* TA38 с геном устойчивости к ампициллину. Ранее эта плазида была перенесена помощью трансконъюгации в клетки бактерии Есс RC5297, которая является индикатором для фага ZF40 [1]. Эксперименты по трансдукции осуществляли на твердой среде LB. Трансдуцирующие лизаты ZF40/421 и ZF40 $c_6$  по 5 мкл с титром  $2,0 \times 10^{10}$  БОЕ/мл, а также их разведения  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  и  $10^{-3}$  наносили непосредственно на чашечные газоны индикаторных штаммов и инкубировали 18 часов при 28°C. В местах нанесения пятен фаголизатов вырезали агаровые блочки размером 3×3×3 мм с выжившими клетками индикаторного штамма и помещали их в 2 мл жидкой среды LB. Блочки инкубировали 18 часов при 28°C. Суспензию клеток центрифугировали при 10000 об/мин, 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл жидкой минимальной среды наносили на селективные чашки. Отбор и учет трансдуктантов проводили через 72 часа. Частоту трансдукции выражали отношением числа трансдуктантов к числу бляшкообразующих частиц в 1 мл (БОЕ/мл) [10].

В результате проведенных экспериментов нам удалось осуществить перенос хромосомных маркеров arg<sup>+</sup>, met<sup>+</sup>, ura<sup>+</sup> двумя *cleag*-мутантами фага ZF40, а перенос плазмиды рКМ 101 только одним из *cleag*-мутантов - ZF40 $c_6$  (Таблица). Частота трансдукции плазмидного маркера обычно ниже, чем любого из хромосомных. Мы объясняем это тем, что плазида рКМ 101 является экзогенной по отношению к *E. carotovora* и поэтому, хотя и имеет соответствующий рас-сайт, упаковывается в фаговую головку менее эффективно, чем фаговая ДНК и ДНК бактерии-хозяина. Так передача Ar<sup>r</sup> – маркера плазмиды рКМ101 фагом ZF40 $c_6$  происходит с частотой  $10^{-8}$ , а перенос фагом ZF40/421 вообще не был зафиксирован. Существенные изменения в геноме ZF40/421, связанные с нарушением упаковки ДНК в прокапсид, возможно и объясняют этот факт. [8]. В отличие от этого, трансдукция хромосомных маркеров не только возможна, но и характеризуется высокими показателями частоты: от  $1,4 \times 10^{-6}$

до  $7,5 \times 10^{-5}$  для представителей двух популяционных наборов фага ZF40/421 (Таблица). Частоты трансдукции биохимических маркеров ауксотрофных мутантов характеризуются широким диапазоном значений:  $7,0 \times 10^{-8}$  -  $2,0 \times 10^{-4}$ . Показатель низкой частоты для маркера  $ura^{+}-1$  очевидно, связан с особенностью мутации в этом локусе. Это подтверждается достаточно высоким значением частоты трансдукции для другого локуса  $ura^{+}-2$  - оперона. То, что эти локусы отличаются, демонстрируют показатели частоты обратных мутаций -  $< 2,2 \times 10^{-9}$  и  $7,5 \times 10^{-8}$  для  $ura^{+}-1$  и  $ura^{+}-2$  соответственно (Таблица).

**Таблица**

Частота трансдукции генетических маркеров *Erwinia carotovora* фагом ZF40

Трансдуцируемый маркер	Мутанты фага ZF40			Частота обратных мутаций
	c <sub>6</sub>	421-1*	421-2*	
$ura^{+}-1$	$7,0 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-6}$	—	$< 2,2 \times 10^{-9}$
$ura^{+}-2$	$1,3 \times 10^{-5}$	—	$1,1 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-8}$
$arg^{+}$	—	$7,0 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-7}$
$met^{+}-1$	$2,0 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-7}$
$met^{+}-2$	—	$6,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$
$met^{+}-3$	$7,5 \times 10^{-8}$	не обнаружено	не обнаружено	$< 2,0 \times 10^{-8}$
$Ap^r$	—	—	—	—

\* - представители двух популяционных наборов фага ZF40/421

“ — “ не исследовали

Как было отмечено выше, специфические мутации в геноме фага, а также низкая множественность инфекции (0,01-0,1) позволили получить жизнеспособные трансдуктанты. При первичном отборе наблюдали выраженную гетерогенность колоний трансдуктантов. Однако, все варианты хорошо росли на селективных средах и были резистентны к трансдуцирующим фагам.

Способность *clearg*-мутантов фага ZF40 переносить гены: *arg*, *met*, *ura* бактерии-хозяина, а также внехромосомные маркеры плазмиды pKM101 позволило нам отнести эти фаги к общетрансдуцирующим. Подобная ситуация характерна для фагов Erch12, EC2 *E. chrysanthemi* [11,12], 59 и 49, фКР *E. carotovora* [10,13], где перенос *arg*, *met*, *ura* генов наблюдался с частотой  $2,0 \times 10^{-8}$ –  $9,0 \times 10^{-6}$ . Использование твердой среды LB позволило увеличить частоту трансдукции от  $7,0 \times 10^{-8}$  до  $2,0 \times 10^{-4}$ . Применение такого подхода важно для фагов подобных ZF40, которые характеризуются процессом реадсорбции фаговых частиц.

Таким образом, впервые показана способность эрвиниофага ZF40 осуществлять общую трансдукцию хромосомных и плазмидных генов. Это создает предпосылки для использования этого фага в качестве инструмента при исследовании молекулярно-генетической организации практически значимой бактерии *E. carotovora*.

#### Литература

1. Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Метод исследования горизонтального переноса плазмид у *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2002. – 64, №3. – С. 20 – 26.
2. Mann B.A., Slauch J.M. // Transduction of low-copy number plasmids by bacteriophage P22 // Genetics. – 1997. – 146. – P.447 – 456.

3. Casjens S.R., Gilcrease E.B., Winn-Stapley D.A. et al. The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18: complete genome sequence and DNA packaging strategy // J. Bacteriol. – 2005. – 187, №3. – P. 1091 – 1104.
4. Hertwig S., Popp A., Freytag B. et al. Generalized transduction of small *Yersinia enterocolitica* plasmids // Appl. and Environ. Microbiol. – 1999. – 65, №9. – P.3862 – 3866.
5. Jobocka M.B., Rose D.J., Plunkett G. et al. Genome of bacteriophage P1 // J. Bacteriol. – 2004. – 186, №21. – P.7032 – 7068.
6. Паницина Ф.И., Товкач Ф.И. Внутригеномная гетерогенность умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2006. – 68, №6. – С. 42 – 47.
7. Кушкина А.И., Товкач Ф.И. Индикаторная система для изучения лизогенного развития умеренного бактериофага ZF40 // Мікробіол. журн. – 2005. – 67, №3. – С.50 – 60.
8. Ivanytsya T.V., Kushkina A.I., Tovkach F.I. Mechanism of formation of defective phage particles of *Erwinia carotovora* // Abstr. International conference "Phage Biology, Ecology and Therapy Meeting., Tbilisi, June 12 – 15, 2008. – Tbilisi, Georgia. – P42.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – Москва: Мир, 1976. – 436 с.
10. Муквич Н.С., Романюк Л.В., Кушко Я.Г. Генетический перенос хромосомальных маркеров *Erwinia horticola* 450 умеренными фагами 49 и 59 // Мікробіол. журн. – 1987 – 49, №4. – С.31 – 35.
11. Chatterjee A.K., Brown M.A. Generalized transduction in the enterobacterial phytopathogen *Erwinia chrysanthemi* // J. Bacteriol. – 1980. – 143, №3. – P.261 – 268.
12. Resibois A., Colet M., Faelen et al. OEC2, new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi* // Virology. – 1984. – 137, №1. – P.102 – 112.
13. Toth I., Perombelon M., Salmond G. Bacteriophage ОКР mediated generalized transduction in *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* // J. Gen. Microbiol. – 1993. – 139, №4. – P.2705 – 2709.

## Резюме

Впервые показано, что умеренный эрвиниофаг ZF40 способен осуществлять общую трансдукцию хромосомных и плазмидных генов бактерии *Erwinia carotovora*. На твердой среде LB удалось получить повышение эффективности трансдукции. Такой подход важен для фагов подобных ZF40, у которых наблюдается процесс реадсорбции фаговых частиц. Перенос бактериальных генов по типу общей трансдукции сопряжен с циклической пермутацией фаговой ДНК. Полученные данные создают предпосылки для молекулярно-генетического изучения процесса патогенеза у эрвиний.

Вперше показано, що помірний ервініофаг ZF40 здатен здійснювати загальну трансдукцію хромосомних і плазмідних генів бактерії *Erwinia carotovora*. На твердому середовищі LB вдалося отримати підвищення ефективності трансдукції. Такий підхід важливий для фагів подібних ZF40, у яких спостерігається процес реадсорбції фагових часток. Перенос бактеріальних генів по типу загальної трансдукції сполучений з циклічною пермутацією фагової ДНК. Отримані створюють умови для молекулярно-генетичного вивчення процесу патогенеза у ервіній.

For the first time it was shown that the temperate erwiniaphage ZF40 was capable to mediate the generalized transduction of chromosomal and plasmid genes of bacterium *Erwinia carotovora*. The increasing of transduction efficiency was firstly obtained on solid medium LB. This method has the great importance for the phage ZF40 because such phages

were characterized by the readsorption of phage particles. The transmission of bacterial genes due to the generalized transduction links with the permutation of phage DNA. The obtained data are the importance prerequisite for molecular and genetical studying of pathogenesis processes in erwinias.

**САМАТАДЗЕ Т.Е.,<sup>1</sup> ЗЕЛЕНИНА Д.А.,<sup>3</sup> ШОСТАК Н.Г.,<sup>1</sup> ВОЛКОВ А.В.,<sup>3</sup>  
ПОПОВ К.В.,<sup>1</sup> РАЧИНСКАЯ О.А.,<sup>1</sup> БОРИСОВ А.Ю.,<sup>2</sup> ТИХОНОВИЧ И.А.,<sup>2</sup>  
ЗЕЛЕНИН А.В.,<sup>1</sup> МУРАВЕНКО О.В.<sup>1</sup>**

*1-Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН Россия, 119991,  
Москва, ул. Вавилова, 32, , e-mail: tsamatadze@gmail.com*

*2 – ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук, Санкт-  
Петербург, Пушкин-8 196608; e-mail: Alexey\_Borisov@arriam.spb.ru*

*3 - Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и  
океанографии, Москва 107140; e-mail: dzel67@mail.ru*

## **ХРОМОСОМНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНОМА ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.).**

Бобовые (FABACEAE) представлены 18000 видами растений включающие в себя как мелкие однолетние травянистые растения, так и крупные тропические деревья. Эти растения обладают уникальной способностью создавать симбиотические сообщества с некоторыми родами бактерий и микориз, образуя важнейшие азотфиксирующие системы в биосфере.

Среди бобовых подсемейство PAPILIONOIDEA содержит большое число сельскохозяйственных культур, одной из которой является горох посевной (*Pisum sativum* L.). Небольшой размер генома (1С=4,3 млрд.п.н.), семь пар хромосом (2n=14) среднего размера (4-6 мкм) делают его прекрасным объектом для цитогенетических исследований. Кроме того, горох является лучшим модельным объектом для изучения тройного симбиоза (бобовое растение+грибы арбускулярной микоризы+клубеньковые бактерии).

Несмотря на то, что в России и за рубежом создано большое количество сортов различного направления селекции (зерновые, кормовые, овощные), однако, как правило, все коммерческие сорта гороха обычно имеют недостаточно высокий симбиотический потенциал. Кроме того, сравнительного анализа геномов сортов и линий гороха различного направления селекции с помощью хромосомных и молекулярных маркеров до настоящего времени не проводилось, что и явилось целью данного исследования.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили семена четырех сортов зернового гороха: Frisson, Sparkle, Rondo, Капитал, двух овощных сортов: Finale и Виола, одного кормового сорта Роза Краун, двух генетических линий: SGE и Sprint-2, а также двух транслокационных линий: L-108 (T<sub>2-4s</sub>) и M-10 (T<sub>2-7s</sub>).

С-дифференциальное окрашивание, Ag-ЯОП-окрашивание, двуцветный FISH с зондами рТа 71, содержащими 45S рДНК, рТа 794, содержащими 5S рДНК, хромосомный и RAPD-PCR анализ проводили по описанным ранее методикам (Саматадзе и др., 2002; 2005; Зеленина и др., 2006; Muravenko et al., 2009).

### **Результаты и обсуждение**

Проведено изучение рисунков С-окраски хромосом в изучаемых сортах и линиях гороха. По морфологии и рисунку С-бэндинга были идентифицированы все