



УДК 579.873.31:579.252.5:581.557

ГОМОЛОГИЯ МЕЖДУ СТРУКТУРНЫМИ ГЕНАМИ НИТРОГЕНАЗЫ (*nifHDK*) *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* И ЭКСТРАХРОМОСОМНЫМИ ДНК ВЕЗИКУЛ МИКРОСИМБИОНТА *ALNUS GLUTINOSA*

С. В. Добрица, А. Ю. Томашевский

Введение. Способность образовывать азотфиксирующие корневые клубеньки в симбиозе с актиномицетами рода *Frankia* обнаружена у широкого круга (свыше 170 видов) древесных и кустарниковых растений [1]. Специфическими стадиями морфогенеза микросимбионта актиноризных растений являются ветвящиеся септированные гифы, везикулы и спорангии с неподвижными спорами. Ряд фактов [2, 3] свидетельствует о том, что везикулы *Frankia* являются специализированными клетками, обеспечивающими функционирование азотфиксирующего ферментного комплекса — нитрогеназы.

Ранее мы обнаружили в везикулах микросимбионта из клубеньков черной ольхи (*Alnus glutinosa*) комплекс циклических экстрахромосомных ДНК, состоящий, по крайней мере, из 14 классов молекул размером от 0,75 до 83 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.) [4]. Уникальной особенностью этого комплекса является высокое относительное содержание (до 40 %) минициклических молекул ДНК (от 0,75 до 2 т. п. н.). Самые мелкие из них, имеющие размеры ниже минимального предела, необходимого для автономной репликации, очевидно, не могут рассматриваться как плазмиды. В связи с этим возникло предположение [5], что обнаруженные в везикулах циклические ДНК (или часть из них) являются по своей природе интегрированными последовательностями, переходящими в автономное состояние в результате перестроек генома, индуцируемых дифференциацией везикул в клубеньке.

Аналогично другим азотфиксирующим организмам [6, 7] в геномах *Frankia* обнаружены консервативные последовательности, гомологичные структурным генам нитрогеназы (*nifHDK*) *Klebsiella pneumoniae* [6, 8].

В настоящей работе плазмиду *pSA30*, содержащую гены *nifHDK* *K. pneumoniae* [9], гибридизовали с фракцией циклических ДНК везикул эндосимбионта *A. glutinosa*. Обнаружено, что два класса этих ДНК проявляют сильную гомологию с генами *nifHDK*.

Материалы и методы. Фракционирование везикул из клубеньков *A. glutinosa*, их лизис, выделение экстрахромосомных ДНК и электронную микроскопию последних выполняли, как описано ранее [4]. Культивирование штамма *Frankia* sp. *Ea110*, полученного от Л. С. Шарой, выделение из него суммарной ДНК и ее гидролиз рестриктазой *XhoI* проводили по [10]. Штамм *Escherichia coli* GMU, содержащий плазмиду *pSA30*, был любезно предоставлен К. М. Злотниковым. Этот штамм выращивали на среде LB [11], содержащей 20 мкг/мл тетрациклина, при 37 °С. ДНК плазмиды *pSA30* выделяли методом Бирнбойма и Доли [12] с последующей гель-фильтрацией на колонке с биогеелем А-15 («Bio-Rad», США). Электрофорез ДНК и их гибридизацию с [³²P]-ДНК плазмиды *pSA30* проводили, как в работе [8].

Результаты и обсуждение. 14 классов циклических ДНК, обнаруженных в экстрахромосомной фракции везикул микросимбионта *A. glutinosa* при измерении контурных длин молекул на электронных микрофотографиях, представлены на рис. 1.

Используя в качестве радиоактивного зонда плазмиду *pSA30*, содержащую все три структурных гена нитрогеназного комплекса [9], мы обнаружили в геномах *Frankia* последовательности, гомологичные генам *nifHDK* *K. pneumoniae*. На рис. 2 представлены результаты гибридизации меченой ^{32}P ДНК плазмиды *pSA30* с *XhoI*-фрагментами ДНК *Frankia sp. Eal10* и с фракцией циклических ДНК везикул микросимбионта ольхи. Как следует из рис. 2, плазмида *pSA30* проявляет гомологию как с суммарной ДНК из клеток чистой культуры *Frankia sp. Eal10*, так и с двумя циклическими ДНК везикул эндосимбионта. Среди *XhoI*-рестриктов ДНК штамма *Eal10* только фрагмент(ы) около 3,2 т. п. н. проявляет гомологию с плазмидой *pSA30*, причем степень гомологии сравнительно низкая, как и в

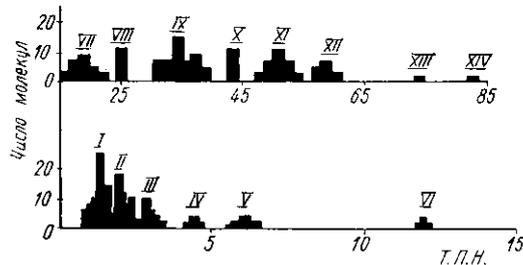
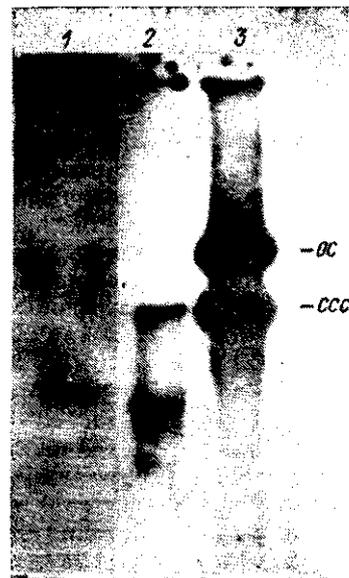


Рис. 1. Распределение по размерам кольцевых молекул ДНК везикул микросимбионта *A. glutinosa* на основе электронно-микроскопических измерений. Установленные классы указаны римскими цифрами

Fig. 1. Size distribution of circular DNA molecules from microsymbiont vesicles of *A. glutinosa* root nodules from electron microscope measurements of contour lengths. The size classes established are indicated by the Roman numerals

Рис. 2. Гибридизация ДНК *Frankia sp.* с ^{32}P -ДНК плазмиды *pSA30*: 1 — *XhoI*-гидролизат суммарной ДНК штамма *Eal10*; 2 — фракция экстрахромосомных ДНК везикул микросимбионта *A. glutinosa*; 3 — контроль: ДНК плазмиды *pSA30*. CCC — ковалентно замкнутая кольцевая форма; OC — открытая кольцевая форма

Fig. 2. Hybridization of *Frankia sp.* DNA with ^{32}P DNA of the plasmid *pSA30*: 1 — *XhoI*-digest of total DNA from the strain *Eal10*; 2 — extrachromosomal DNAs from microsymbiont vesicles of *A. glutinosa*; 3 — control: *pSA30* DNA. CCC — a covalently closed circular form; OC — an open circular form



случае других штаммов *Frankia* [8]. В то же время экстрахромосомные ДНК, выделенные из везикул эндофита ольхи, достаточно интенсивно гибридизуются с меченой ДНК плазмиды *pSA30*. Вероятно, это обусловлено использованием чистой фракции экстрахромосомных ДНК, тогда как фрагменты, содержащие *nif*-гены, могут представлять лишь незначительную часть популяции негомологичных фрагментов суммарной ДНК штамма *Eal10*, имеющих аналогичную электрофоретическую подвижность.

Гибридуемые с *pSA30* циклические ДНК везикул относятся к V и VI классам (рис. 1 и [4]) и имеют размеры около 5,2 и 10,5 т. п. н. по электрофоретической подвижности (рис. 2) или соответственно около 6,0 и 11,8 т. п. н. по результатам электронно-микроскопических измерений кольцевых молекул. Размер более крупной гибридуемой кольцевой ДНК в 2 раза превышает длину меньшей ДНК. Поэтому наиболее вероятно, что первая представляет собой димер второй. Сле-

дует отметить, что размер меньшей гибридизуемой ДНК соответствует длине оперона *nifHDK K. pneumoniae* [9]. Однако, чтобы установить, действительно ли эта экстрахромосомная ДНК содержит все три структурных гена нитрогеназы, необходимо провести аналогичные эксперименты с ДНК-зондами, несущими индивидуальные *nif*-гены.

Гомология низкомолекулярных ДНК везикул с генами *nifHDK* является довольно неожиданной прежде всего в связи с тем, что все известные случаи внехромосомной локализации *nif*-генов у diaзотрофов связаны с большими плазмидами порядка 150 т. п. н. и более [7, 13]. Кроме того, в клетках *Frankia sp. in vitro* плазмиды обнаруживаются крайне редко; среди сотен обследованных штаммов только примерно у 4 % найдены плазмидные ДНК [14—16 и данные авторов]. Поэтому трудно допустить, что плазмиды, не являясь непременной принадлежностью генома *Frankia*, детерминируют такую существенную особенность, как фиксация азота. Действительно, плазмиды аналогичных размеров (7—8 т. п. н.), наиболее часто встречающиеся у штаммов *Frankia* [14] и нередко идентичные между собой по характеристикам рестрикции [15], не проявляют гомологии с генами *nifHDK K. pneumoniae* [16]. Хотя единственная большая плаزمиды (около 190 т. п. н.), обнаруженная до сих пор в клетках *Frankia sp.*, и проявляет некоторую гомологию с *nif*-генами *K. pneumoniae*, уровень гомологии крайне низок по сравнению с гибридизацией хромосомной ДНК [17].

Противоречие между редким обнаружением плазмидных ДНК в клетках *Frankia in vitro* и появлением многочисленных циклических ДНК *in vivo*, а также непредвиденная локализация *nif*-генов на столь небольших циклических ДНК легко объяснимы гипотезой о геномных перестройках, происходящих в везикулах эндосимбионта [5]. Высокая нестабильность генома присуща многим актиномицетам [18]. Процесс образования клубеньков и развития в них везикул можно рассматривать как взаимодействие геномов микро- и макросимбионтов. Не исключено, что это взаимодействие приводит к разнообразным перестройкам в геноме *Frankia*. Гомология циклических ДНК везикул с *nif*-генами безусловно свидетельствует об их прокариотном происхождении, но не исключает образования под влиянием растения-хозяина. Примером воздействия растения на геном микроорганизма является циклизация фрагмента *Ti*-плазмиды, включающего Т-ДНК, при совместном культивировании *Agrobacterium tumefaciens* с растительными клетками [19]. Множественность классов циклических ДНК в везикулах может указывать на множественность геномных перестроек. В частности, некоторые из кольцевых ДНК в везикулах, в том числе и гомологичные *nif*-генам, могут быть экстракопиями, образованными в результате амплификации генов.

Смысл предполагаемых геномных перестроек в везикулах может быть неоднозначным. Некоторые, возможно, являются случайным следствием общей нестабильности генома, другие — целенаправленными, аналогичными, например, перестройкам, обнаруженным в гетероцистах *Anabaena* [20]. Действительно, везикулы *Frankia* структурно и функционально ближе к гетероцистам цианобактерий [2], чем к бактероидам клубеньковых бактерий. Дифференциация гетероцист — специализированных азотфиксирующих клеток — сопровождается у *Anabaena* геномными перестройками, коррелирующими по времени с экспрессией нитрогеназной активности и затрагивающими структурные гены нитрогеназы. Сайт-специфическая рекомбинация между прямыми повторами, фланкирующими гены *nifK* и *nifD*, удаляет неинформативный фрагмент ДНК (11 т. п. н.), разделяющий гены *nifHD* и *nifK* в вегетативных клетках. Тем самым в гетероцистах три *nif*-гена структурно объединяются и начинают координированно считываться с общего промотора как единый оперон. Вырезанный из хромосомы фрагмент (11 т. п. н.) обнаруживается в гетероцистах в виде циклической молекулы с неопределенной функцией [20]. Показано, что у штамма *Frankia* из клубеньков ольхи ген *nifH* отделен от генов *nifDK* участком не менее 30 т. п. н.

[21]. Поэтому не исключено, что аналогичные перестройки происходят и в процессе дифференциации везикул *Frankia*, возможно, даже без влияния растения. Последнее может быть проверено на везикулах, образованных *in vitro*, которые, как известно, способны обеспечивать достаточно высокий уровень нитрогеназной активности, хотя и более низкий, чем в клетках растения-хозяина [2].

Возможно, эксцизия *nif*-генов из хромосомы *Frankia* происходит лишь при определенных условиях, например при высоком содержании кислорода в тканях клубенька. Так, у *Enterobacter agglomerans* штаммы одного биотипа содержат гены *nifHDK* на плазидах и проявляют высокую нитрогеназную активность при атмосферном давлении кислорода. Активная нитрогеназа у штаммов другого биотипа обнаруживается только при низком парциальном давлении кислорода, а гены *nifHDK* локализируются у них на хромосоме [7]. Не исключено, что у *Frankia* эти биологические особенности являются обратимыми и регулируются механизмом эксцизии-интеграции ДНК. С другой стороны, возможно, что в везикулах происходит эксцизия псевдогенов, гомологичных *nifHDK*. В геномах ряда diaзотрофов обнаружены повторяющиеся *nif*-последовательности [22, 23], но иногда только одна копия структурных *nif*-генов является функциональной, а экстракопии, отличающиеся по первичной структуре,— молчащими. Определение функциональной активности *nif*-последовательностей, локализованных на экстрахромосомных ДНК везикул, позволит сделать выбор между возможными альтернативами.

HOMOLOGY BETWEEN STRUCTURAL NITROGENASE GENES (*nifHDK*) FROM *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND EXTRACHROMOSOMAL DNAs FROM MICROSymbiont VESICLES OF *ALNUS GLUTINOSA*

S. V. Dobritsa, A. Yu. Tomashevskii

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino

Summary

The fraction of circular extrachromosomal DNAs of 14 classes detected previously in vesicles of a *Frankia* microsymbiont from nitrogen-fixing root nodules of black alder was hybridized with [³²P] DNA of the plasmid *pSA30* carrying *K. pneumoniae nifHDK* genes. Circular DNAs of two classes (about 6 and 12 kb) were shown to contain sequences homologous to the nitrogenase genes. Possible genome rearrangements inducing multiple circular DNAs in vesicles are discussed.

1. Becking J. H. Nitrogen fixation in nodulated plants other than legumes // Adv. in agricult. microbiol. / Ed. N. S. Subba Rao.—London: Butterworth Scientific, 1982.—P. 89—110.
2. Torrey J. G., Callaham D. Structural features of the vesicle of *Frankia* sp. *Cp11* in culture // Can. J. Microbiol.—1982.—28, N 7.—P. 749—757.
3. Meesters T. M. Localization of nitrogenase in vesicles of *Frankia* sp. *Cc1.17* by immunogoldlabelling on ultrathin cryosections // Arch. Microbiol.—1987.—146, N 4.—P. 327—331.
4. Dobritsa S. V. Extrachromosomal circular DNAs in endosymbiont vesicles from *Alnus glutinosa* root nodules // FEMS Microbiol. Lett.—1982.—15, N 2.—P. 87—91.
5. Добрица С. В. Молекулярная организация генома *Frankia* // Пробл. биохимии и физиологии микроорганизмов / Под ред. Г. К. Скрябина.—Пушчино, 1985.—С. 294—302.
6. Ruckun G. B., Ausubel F. M. Interspecies homology of nitrogenase genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77, N 1.—P. 191—195.
7. Diversity of *nif* gene location and nitrogen fixation among root-associated *Enterobacter* and *Klebsiella* strains / O. Väisänen, K. Haahela, L. Bask et al. // Arch. Microbiol.—1985.—141, N 2.—P. 123—127.
8. Томашевский А. Ю., Добрица С. В. Гибридизация ДНК актиномицетов рода *Frankia* со структурными генами нитрогеназы (*nifHDK*) *Klebsiella pneumoniae* и *nif*-генами *Rhizobium meliloti* // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.—1987.—№ 3.—С. 27—32.
9. Cannon F. C., Riedel G. E., Ausubel F. M. Overlapping sequences of *Klebsiella pneumoniae nif* DNA cloned and characterized // Mol. and Gen. Genet.—1979.—174, N 1.—P. 59—66.

10. Dobritsa S. V. Restriction analysis of the *Frankia* spp. genome // FEMS Microbiol. Lett.— 1985.— 29, N 1—2.— P. 123—128.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
12. Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.— 1979.— 7, N 6.— P. 1513—1523.
13. Evidence for nitrogen fixation (*nif*) genes on indigenous *Rhizobium* plasmids / M. P. Nuti, A. A. Lepidi, R. K. Prakash et al. // Nature.— 1979.— 282, N 5738.— P. 533—535.
14. Plasmids in *Frankia* sp. / P. Normand, P. Simonet, J. L. Butour et al. // J. Bacteriol.— 1983.— 155, N 1.— P. 32—35.
15. Restriction enzyme digestion patterns of *Frankia* plasmids / P. Simonet, P. Normand, A. Moiroud, M. Lalonde // Plant and Soil.— 1985.— 87, N 1.— P. 49—60.
16. Normand P., Lalonde M. The genetics of actinorhizal *Frankia*: A review // Nitrogen fixation with non-legumes / Eds F. A. Skinner, P. Uomala.— Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1986.— P. 429—453.
17. Localization of *nif* genes on a large plasmid in *Frankia* sp. strain ULQ0132105009 / P. Simonet, J. Haurat, P. Normand et al. // Mol. and Gen. Genet.— 1986.— 204, N 3.— P. 492—495.
18. Стародубцева Л. И., Даниленко В. Н., Павашин С. М. Плазмиды и нестабильность генома *Streptomyces* // Антибиотики.— 1984.— 29, № 7.— С. 536—555.
19. Involvement of circular intermediates in the transfer of T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells / Z. Koukoliková-Nicola, R. D. Shillito, B. Hohn et al. // Nature.— 1985.— 313, N 5999.— P. 191—196.
20. Golden J. W., Robinson S. J., Haselkorn R. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* // Ibid.— 314, N 6010.— P. 419—423.
21. Ligon J. M., Nakas J. P. Isolation and characterization of the genes from *Frankia* that code for the component I proteins of nitrogenase // Nitrogen fixation research progress / Eds H. J. Evans, P. J. Bottomley, W. E. Newton.— Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1985.— P. 188.
22. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli* / C. Quinto, H. de la Vega, M. Flores et al. // Nature.— 1982.— 299, N 5885.— P. 724—726.
23. Scolnick P. A., Haselkorn R. Activation of extra copies of genes coding for nitrogenase in *Rhodospseudomonas capsulata* // Ibid.— 1984.— 307, N 5948.— P. 289—292.

Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,
Пушино Моск. обл.

Получено 03.06.86

УДК 572.5:576.312

ТРАНСФОРМАЦИЯ Ltk-aprt^- КЛЕТОК ДНК В СОСТАВЕ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ НУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Р. А. Захарян, Г. Г. Галстян,
Н. Р. Геворкян, М. Г. Галстян, Л. М. Амирханова

Введение. Перенос гена в клетки млекопитающих привлекает внимание как метод коррекции генетических дефектов *in vitro* и *in vivo* [1, 2]. Ранее Апошьяном [3] и нами [4] сообщалось о конструировании искусственных вирусоподобных частиц (ИВЧ) на основе преформированных капсид вируса полиомы в качестве переносчика гена в клетки эукариот. Было показано, что трансформирующая активность ИВЧ на два порядка выше таковой ДНК в составе Ca^{2+} -преципитата, ДНК-поликативных комплексов [5—7], метафазной хромосомы [8], липосомных везикул [9, 10]. Использование ИВЧ, однако, в ряде случаев ограничено, так как в преформированную капсиду вируса полиомы может быть включена ДНК с молекулярной массой не более $1,2 \cdot 10^6$.

Вместе с тем были получены данные о возможности циркуляции ДНК пневмококка и вируса полиомы в крови без существенной деградации, и что 20-кратное повышение количества введенной в кровь ДНК не меняло количества циркулирующей радиоактивной инфекционно активной ДНК [11]. Это указывает на наличие в крови компонентов, комплексообразование с которыми определяет уровень циркулирующей внеклеточной ДНК крови, недоступной для нуклеазного рас-