

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.13:577.21

**scpA – НОВЫЙ ГЕН САЛИЦИЛАТГИДРОКСИЛАЗЫ, ЛОКАЛИЗОВАННЫЙ
НА ПЛАЗМИДАХ ДЕГРАДАЦИИ САЛИЦИЛАТА/КАПРОЛАКТАМА**

© 2013 г. А. В. Панов^{1*}, О. В. Волкова¹, И. Ф. Пунтус¹, Т. З. Есикова¹,
И. А. Кошелева^{1,2}, А. М. Боронин^{1,2}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук,
Пушино, 142290 Московская область

²Пушинский государственный естественнонаучный институт, Пушино, 142290 Московская область

Поступила в редакцию 25.05.2012 г.

Принята к печати 05.07.2012 г.

Установлено, что способность штаммов псевдомонад к биодegradации капролактама и салицилата определяется крупными конъюгативными плазмидами (SAL/CAP), часть из которых относится к P-7-группе несовместимости. В составе SAL/CAP-плазмид обнаружен и частично секвенирован новый ген салицилат-1-гидроксилазы *scpA*, на уровне нуклеотидной последовательности идентичный известным генам не более чем на 72–74% и филогенетически примерно одинаково удаленный от ближайших гомологов – генов *nahG* (NAH7), *salA* (*Pseudomonas reinekei* MT1) и *nahU* (pND6-1). Синтез салицилат-1-гидроксилазы ScpA не индуцируется салицилатом, фермент имеет широкую субстратную специфичность и наибольшую удельную активность проявляет по отношению к 4-метилсалицилату и незамещенному салицилату. Кроме того, впервые описаны поддерживаемые в бактериях рода *Pseudomonas* плазмиды биодegradации салицилата, которые не имеют *nah2*-оперона и несут только “неклассический” ген салицилат-1-гидроксилазы, *nahU*.

Ключевые слова: салицилат-1-гидроксилаза, капролактама, *Pseudomonas*, плазмид, гены *nahU* и *scpA*.

scpA THE NEW SALICYLATE HYDROXYLASE GENE LOCALIZED ON SALICYLATE/CAPROLACTAM DEGRADATION PLASMIDS, by A. V. Panov^{1*}, O. V. Volkova¹, I. F. Puntus¹, T. Z. Esikova¹, I. A. Kosheleva^{1,2}, A. M. Boronin^{1,2} (¹Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; *e-mail: panov_a_v@inbox.ru; ²Pushchino State Educational Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia). Both caprolactam and salicylate biodegradation by *Pseudomonas* salicylate/caprolactam degraders is controlled by large conjugative plasmids (SAL/CAP). Some of these plasmids determined to be the members of IncP-7 group. The new salicylate 1-hydroxylase gene (*scpA*) on SAL/CAP-plasmids has been detected and partially sequenced. Gene *scpA* was equally related to closest homologs *nahG* (NAH7), *salA* (*P. reinekei* MT1) and *nahU* (pND6-1), but identity of *scpA* to these genes did not exceed 72–74%. Synthesis of salicylate 1-hydroxylase ScpA was not induced by salicylate. This enzyme had wide substrate specificity and exhibited highest specific activity with 4-methylsalicylate and nonsubstituted salicylate. Besides pseudomonad's salicylate degradative conjugative plasmids without “classical” *nah2*-operon and harboring only salicylate 1-hydroxylase gene *nahU* have been firstly described.

Keywords: salicylate 1-hydroxylase, caprolactam, *Pseudomonas*, plasmid, *nahU* and *scpA* genes.

DOI: 10.7868/S002689841301014X

Салицилаты (салициловая кислота и ее производные) – широко распространенные в природе ароматические углеводороды, типичные метаболиты растений, участвующие в индукции системной устойчивости к фитопатогенам [1]. Кроме того, салицилат является ключевым интермедиатом

в путях биодegradации нафталина, фенантрена, антрацена и других токсичных и канцерогенных соединений, загрязняющих окружающую среду [2]. Накопление салицилатов (особенно галогенированных) в среде в большинстве случаев подавляет рост микроорганизмов, однако существуют бактерии, использующие эти ароматические соединения в качестве единственного источника

* Эл. почта: panov_a_v@inbox.ru

углерода и энергии. Бактерии рода *Pseudomonas* могут утилизировать салицилат двумя способами. Во-первых, превращая его с помощью салицилат-1-гидроксилазы в катехол, который расщепляют в дальнейшем по *орто*- или *мета*-пути. Во-вторых, окисляя салицилат салицилат-5-гидроксилазой до гентизиновой кислоты. У псевдомонад гены катаболизма ароматических углеводородов, в том числе салицилата, часто располагаются на крупных конъюгативных плаزمидах [3], а также входят в состав различных транспозонов [4]. К настоящему времени описаны гены салицилатгидроксилаз, локализованные на плаزمидах биodeградации нафталина и салицилата флуоресцирующих псевдомонад (*nahG*, *nahU*, *nagG*) [5–7]. Известны также хромосомные гены салицилат-1-гидроксилазы – как “молчащие” (псевдоген *nahG1* у ряда штаммов *P. putida*) [8], так и вовлеченные в биохимические пути, обеспечивающие хозяину серьезные конкурентные преимущества.

В последние годы коллекция лаборатории биологии плазмид (ЛБП ИБФМ РАН) пополнилась штаммами псевдомонад, способными к биodeградации салицилата и капролактама – ксенобиотика, широко используемого для производства капрона (нейлона-6). Сочетание таких метаболических активностей ранее наблюдали только у *P. putida* МСМ В-408, причем этот штамм содержал стабильную плазмиду размером 32 т.п.н. [9]. Кроме того, описано несколько штаммов [10], деградирующих салицилат с использованием “неклассической” (*NahU*) салицилатгидроксилазы, которые также росли на капролактаме (но не на нафталине) и содержали плазмиды большого размера. Однако четкой связи между биodeградацией салицилата и капролактама и обнаруженными плазмидами в этих двух работах не выявили. Из бактерий, обитающих в сточных водах нескольких предприятий по производству капролактама, выделили и охарактеризовали группу плазмид биodeградации капролактама – *SAR*-плазмид [11]. Тем не менее, не описано ни одного бесплазмидного штамма псевдомонад, использующего капролактam в качестве единственного источника углерода, азота и энергии. Биodeградация же салицилата может определяться как плазмидными, так и хромосомными генами, причем нуклеотидные последовательности генов салицилатгидроксилаз, а также их ближайшее генетическое окружение могут существенно различаться.

В представленной работе мы установили, что способность к биodeградации как капролактама, так и салицилата у *SAL/SAR*-штаммов псевдомонад из лабораторной коллекции и новых почвенных образцов определяется крупными конъюгативными плазмидами, а также идентифицировали и охарактеризовали новый ген салицилат-1-гидроксилазы, входящий в состав *SAL/SAR*-плазмид.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве реципиента плазмид биodeградации использовали бесплазмидный штамм *P. putida* КТ2442 (*gfp*, *Km^r*, *Rif^r*) (К. Смалла, Германия). Бактерии выращивали в среде LB и в минерально-солевой среде Эванса при 28°C [12]. Салицилат натрия и капролактam вносили в среду в концентрации 1 г/л, нафталин добавляли на крышку перевернутой чашки Петри, БТЭК (смесь бензола, толуола, этилбензола и ксилолов в равных объемах) наливали в силиконовые трубки, которые также помещали на крышки перевернутых чашек Петри после посева. Канамицин для селекции трансконъюгантов вносили в среды до достижения конечной концентрации 100 мкг/мл среды. Плазмиды, за исключением *pBS270* [13] и *pS6f* (выделена из штамма *P. fluorescens* S6f, почва ОАО “Щекиноазот”, Тульская область), в разное время выделяли из различных образцов почв (условно чистых и загрязненных автотранспортом) г. Пушкино Московской области методом экзогенной изоляции на среде Эванса с салицилатом натрия.

Метод экзогенной изоляции конъюгативных плазмид. Почву (2 г) ресуспендировали в 10 мл среды LB и помещали в термостат (28°C) на 12 ч. Реципиентный штамм *P. putida* КТ2442 растили в 4 мл среды LB в тех же условиях, затем 200 мкл культуры смешивали с 1 мл раствора почвы и центрифугировали в течение 5 с при 6000 g. На чашку Петри с агаризованной средой LB помещали фильтр “Millipore” с размером пор 0.22–0.4 мкм, на который наносили 100 мкл супернатанта. Чашку, не переворачивая, инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре 28°C. Далее делали смыв с фильтра физиологическим раствором (10 мл), и 100 мкл суспензии высевали на среду Эванса с канамицином и салицилатом натрия. Чашки инкубировали при температуре 28°C и отбирали колонии, светящиеся зеленым цветом, под УФ-лампой. После расчистки клоны переносили репликатором на чашки со средой Эванса, содержащей салицилат, капролактam, нафталин или БТЭК в качестве единственных источников углерода и энергии.

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса согласно [12], также использовали набор “ZR Plasmid Miniprep – *Classic*” (“ZymoResearch”, США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в циклере Mastercycler Gradient (“Eppendorf”, Германия) в стандартных условиях с использованием Taq-ДНК-полимеразы. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, приведены в табл. 1. Электрофорез ДНК осуществляли в 1.5%-ном агарозном геле в Трис-ацетатном буфере по стандартной методике [12]. ДНК визуализировали, окрашивая гель в раство-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность, (5' → 3')	T отжига праймера, °C	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Ссылка
<i>repA</i> (IncP-7)	RepAP7F1	GCCCATGCCGAAAAAGGTGTC	53	412	[14]
	RepAP7R1	GAATCGTTGATAGGCATCCGAC			
<i>repAB</i> (IncP-9)	repF	CCAGCGCGGTACWTGGG	54	398	[15]
	repR	GTCGGCAICTGCTTGAGCTT			
<i>nahAc</i>	Ac149f	CCCYGGCGACTATGT	43	865	[16]
	Ac1014r	CTCRGGCATGTCTTTTTTC			
<i>nahH</i>	23DOF	ATGGATDTDATGGGDTTCAAGGT	50	721	[17]
	23DOR	ACDGTCADGAADCGDTCGTTGAG			
<i>nahR</i>	nahR_1f	ATGGAACTGCGTGACCTGG	52	585	[18]
	nahR_585r	GCCGTAGGAACAGAAGCG			
<i>nahG</i>	shc1_up	CGGCKTTHGGTGARGTCGGTGC	54	893	[18]
	shc1_lo	GGCGAGGAARTAGGCGTCTCAAG			
<i>nahU</i>	nahGU_244f	GACATCTGGTTCGAATGGCG	58	654	[10]
	nahU_898r	CAAGATCATGCAGCGCCC			
<i>nagG</i>	458f	CCTGACCAAGCTSAAGGT	56	766	[7]
	1224r	CGTYTCGGTSACCATGTG			
<i>salA</i>	salAF	CAAAGTCGAAGACCGCACC	58	522	Данная работа
	salAR	ACGCCACCACGTTGATAATG			
<i>catA</i>	C120_UP	GCGHACVATCGAAGGNCCRYTGTA	58	462	[7]
	C120_LOW2	TCRCGSGTNGCAWANGCAAAGTC			

ре бромистого этидия, и выделяли при помощи “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit” (“ZymoResearch”) по протоколу фирмы-изготовителя.

ДНК секвенировали на автоматическом секвенаторе ДНК ABI Prism 373 3130XL Genetic Analyser (“Perkin-Elmer”) в научно-производственной компании “Синтол” (Москва). Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью пакета программ DNASTar, pDRAW (AcaClone Software, <http://www.acaclone.com>) и BLAST N (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Для построения дерева использовали программу TREECON [19].

В рестрикционном анализе использовали эндонуклеазы рестрикции производства “Fermentas” (Литва). ДНК обрабатывали ферментами при 37°C в течение 2–6 ч в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Для индукции салицилат-1-гидроксилазы бактериальные клетки выращивали до середины логарифмической фазы в 250 мл среды Эванса с добавлением сукцината (1 г/л) в качестве источника углерода и энергии. Затем вносили индуктор салицилатгидроксилазы – раствор салицилата натрия (0.1 г/л) и подращивали клетки в течение 2 ч. Клетки отделяли центрифугированием, дважды отмывали в фосфатном буфере [12] и разрушали

на ультразвуковом дезинтеграторе “MSE150-Watt” (Англия) при частоте 22 кГц в течение 1 мин (2 × 30 с) при 4°C.

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [20].

Удельную активность салицилат-1-гидроксилазы [КФ 1.14.13.1] определяли на UV-160A спектрофотометре “Shimadzu” (Япония) по уменьшению экстинкции NADH реакционной смеси ($\lambda = 340$ нм, $\varepsilon = 6.220$ мМ⁻¹ см⁻¹), содержащей 100 мкМ NADH, 100 мкМ салицилат, бесклеточный экстракт и 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.5, учитывая эндогенное потребление NADH бесклеточным экстрактом при 30°C [21].

Активность катехол-2,3-диоксигеназы определяли по скорости образования α -оксимуконного полуальдегида в реакционной смеси ($\lambda = 375$ нм, $\varepsilon = 33.4$ мМ⁻¹ см⁻¹), содержащей 0.5 мМ катехола, бесклеточный экстракт и 0.05 М Трис-НСI-буфер (pH 7.5) [22].

Активность катехол-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования *цис-цис*-муконата в реакционной смеси ($\lambda = 260$ нм, $\varepsilon = 16.9$ мМ⁻¹ см⁻¹), содержащей 5 мМ Na-EDTA, 1 мМ катехола, бесклеточный экстракт, 0.05 М фосфатный буфер (pH 7.0) [23].

Удельную активность ферментов выражали в микромолях потребленного субстрата (кофактора) или образующегося продукта (кофактора) в 1 мин на 1 мг общего бактериального белка. Значения удельных активностей ферментов рассчитывали, используя компьютерную программу “Enzyme” (ИБФМ, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Плазмиды биodeградации салицилата

Для экзогенной изоляции конъюгативных плазмид биodeградации салицилата из образцов лесной почвы, отобранной близ г. Пушкино, использовали бесплазмидный штамм *P. putida* KT2442, служащий эффективным реципиентом чужеродной ДНК за счет дефектной системы рестрикции-модификации и встроенного в хромосому гена *gfp* [24]. Экспрессия гена *gfp*, кодирующего зеленый флуоресцентный белок, позволяет легко отличать колонии KT2442, растущие на твердых средах. В результате получили 12 трансконъюгантов, способных к росту на салицилате. Семь из них в качестве единственного источника углерода и энергии использовали также нафталин, два штамма KT2442 (pScp1) и KT2442 (pScp2) – ϵ -капролактама, а три – KT2442 (pS1), KT2442 (pS2) и KT2442 (pS3) – росли исключительно на салицилате. Из всех трансконъюгантов были выделены плазмиды, три из которых (pS1, pS2 и pS3) имели одинаковый размер (более 50 т.п.н.). Анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) с использованием эндонуклеаз рестрикции EcoRI и BamHI показал, что эти плазмиды сходны, если не идентичны. ПЦР с праймерами на группы несовместимости IncP-7 и IncP-9 не выявила принадлежности pS1, pS2 и pS3 к этим группам, распространенным среди кatabолических плазмид. Семь NAN/SAL-плазмид незначительно различались по размеру (70–100 т.п.н.) и принадлежали к группе несовместимости P-9. Плазмиды биodeградации салицилата/капролактама существенно различались по размеру (pScp1 – менее 40 т.п.н., pScp2 – более 70 т.п.н.) и не относились к IncP-7/IncP-9-группам. Факт приобретения бесплазмидным реципиентом вместе с единственной плазмидной ДНК способности к биodeградации салицилата и капролактама указывает на плазмидную локализацию генетических детерминант этих признаков.

Не удивительно, что большая часть плазмид, экзогенно изолированных по признаку деградации салицилата, оказалась плазмидами биodeградации нафталина. Это наиболее распространенный и изученный тип плазмид биodeградации полициклических ароматических углеводов (ПАУ). Плазмиды этого типа обычно содержат “классический” ген салицилатгидроксилазы

nahG в составе “нижнего” (*nah2*) оперона биodeградации нафталина и контролируют окисление салицилата до катехола, который далее утилизируется по *meta*-пути. Более интересными выглядели плазмиды pS1, pS2 и pS3, контролирующие катаболизм салицилата (но не нафталина), а также pScp1 и pScp2, обеспечивающие биodeградацию как салицилата, так и капролактама. Кроме того, мы использовали выделенные ранее из почвы пять плазмид (также поддерживаемых в лабораторном штамме KT2442), определяющих утилизацию салицилата/капролактама: pBS270, pS6f, pEx4, pNP6, pNP7. Известно, что большинство плазмид биodeградации нафталина/салицилата относится к IncP-9-группе (реже к IncP-7), а плазмиды биodeградации капролактама принадлежат, как правило, к IncP-9 или IncP-2 [11]. С помощью ПЦР установлено, что три из SAL/CAP-плазмид (pBS270, pS6f, pEx4) входят в P-7-группу несовместимости, а четыре (pScp1, pScp2, pNP6, pNP7) классифицировать не удалось.

Следует отметить, что капролактама – это токсичное соединение, которое вызывает дерматиты и хромосомные aberrации у млекопитающих [25]. Всего несколько десятилетий назад бактерии-деструкторы этого соединения выделяли лишь из почв, контактирующих со сточными водами производств капролактама и полимеров на его основе [11]. В последние же годы, как и в нашей работе, бактерии-деструкторы капролактама, хотя и немногочисленные, находят даже в почвах с неспецифическим загрязнением. Возможно, распространению и селекции признака утилизации капролактама у бактерий из почв, удаленных от стоков химических производств, способствовало загрязнение окружающей среды продуктами полимеризации капролактама (каркасы авто- и авиапокрышек, рыболовные сети, одежда и т.п.) с последующей их абиотической и биотической эрозией. Известно, например, что лигнолитические грибы способны агрессивно и быстро расщеплять нейлон-6 и нейлон-66 до олигомеров [26]. Вероятно, в современных условиях совмещение очень нужного для почвенных и особенно ризосферных псевдомонад пути биodeградации салицилата с детерминантами утилизации капролактама в составе одного мобильного генетического элемента обеспечивает определенное конкурентное преимущество обладателям салицилатно-капролактамовых плазмид. Кроме того, нельзя исключить и существование точек “пересечения” путей катаболизма салицилата и капролактама (гены биodeградации капролактама до сих пор не идентифицированы) или их общей регуляции у штаммов, несущих SAL/CAP-плазмиды.

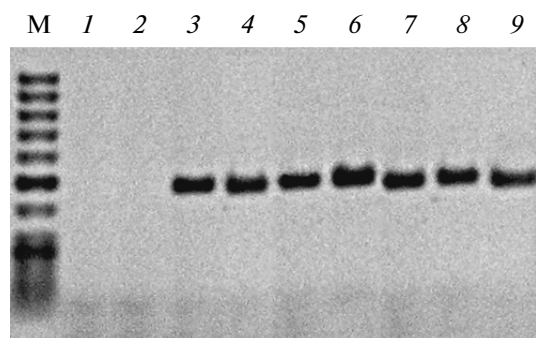


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами, специфичными к гену *scpA*. *M* – маркер, 50 bp DNA ladder (“Fermentas”, Литва), *1* – pNO2 (отрицательный контроль, содержит ген *nahG*), *2* – pS3 (отрицательный контроль, содержит ген *nahU*), *3* – pScp1, *4* – pScp2, *5* – pBS270, *6* – pS6f, *7* – pEx4, *8* – pNP6, *9* – pNP7.

Идентификация гена салицилатгидроксилазы, локализованного на плаزمидах биодеградациии салицилата/капролактама

Генетический контроль деградации салицилата у трансконъюгантов и пяти штаммов из коллекции лаборатории изучали при помощи ПЦР с праймерами, специфичными к “классическим” генам из плазмидных оперонов биодеградациии нафталина и салицилата: *nahAc*, *nahG*, *nahH* и *nahR*. Эти гены кодируют большую субъединицу нафталин-1,2-диоксигеназы, салицилат-1-гидроксилазу, катехол-2,3-диоксигеназу и регуляторный белок LysR-типа соответственно (табл. 1). Амплификацию всех этих генов наблюдали лишь при использовании в качестве матриц семи НАН/SAL-плазмид. Все остальные плазмиды (SAL и SAL/CAP) кодировали “неклассический” путь биодеградациии салицилата, поскольку ПЦР-анализ не выявил ни одного из генов оперона *nah2*.

Ранее в нашей лаборатории у группы штаммов-деструкторов салицилата, также ПЦР-негативных по *nahG*, *nahH* и *nahR*, идентифицировали гены салицилатгидроксилазы [10]. Были подобраны праймеры, специфичные к уникальной последовательности гена салицилат-1-гидроксилазы *nahU* плазмиды биодеградациии нафталина pND6-1 (IncP-7) (GenBank Acc. no. AY208917.2), расположенного далеко за пределами оперона *nah2* [6]. В отличие от pND6-1, несущей и стандартный ген *nahG*, у группы изученных штаммов амплифицировали только *nahU*. Однако локализация этого гена во всех штаммах осталась невыясненной.

Продукты амплификациии с праймерами, специфичными к гену *nahU*, получены для трех плазмид деградациии салицилата, анализируемых в нашей работе, – pS1, pS2 и pS3. Амплифицирован-

ные фрагменты размером 654 п.н. были выделены из агарозного геля и подвергнуты гидролизу эндонуклеазой RsaI. Рестрикционная картина всех трех ампликонов соответствовала картине рестрикции *nahU* pND6-1. Таким образом, нами впервые описаны плазмиды биодеградациии салицилата, которые не содержат оперон *nah2* и несут только “неклассический” ген салицилат-1-гидроксилазы *nahU*.

Ни на одной из SAL/CAP-плазмид ген *nahU* не обнаружен. Последний, достаточно редкий для плазмид псевдомонад [7] вариант, – ген большой субъединицы салицилат-5-гидроксилазы (*nagG*), превращающей салицилат не в катехол, а в гентизат, также не удалось амплифицировать.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей генов салицилатгидроксилаз, депонированных в GenBank за последние 2–3 года, найден филогенетически удаленный от всех известных вариантов ген *salA* штамма *P. reinekei* MT1 (AY944685.2), который утилизирует хлорированные салицилаты по модифицированному орто-пути, предотвращая образование антибиотика протоанемонина [27, 28]. На основе нуклеотидной последовательности *salA* мы разработали праймеры salAF и salAR с целью поиска соответствующего гена у SAL/CAP-плазмид. Амплификациия с новыми праймерами оказалась недостаточно специфичной, однако при помощи программы pDRAW было установлено, что праймер salAF можно при определенных условиях заменить праймером nahGU_244f, разработанным для гена *nahU*. Продукты амплификациии (фрагменты размером около 500 п.н.) получены во всех случаях, где матрицами служили SAL/CAP-плазмиды. В то же время, амплифицировать гены *nahU* и *nahG* (контрольные варианты) с использованием этой пары праймеров не удалось (рис. 1). Амплифицированные фрагменты плазмид pScp1, pScp2 и pBS270 были выделены из геля и секвенированы в двух направлениях. Обнаруженный ген салицилатгидроксилазы получил название *scpA* (от salicylate/caprolactam plasmid).

Филогенетический анализ гена *scpA*

Определена нуклеотидная последовательность 440 п.н. гена салицилат-1-гидроксилазы, локализованного на трех SAL/CAP-плазмидах – pScp1, pScp2, pBS270, и депонирована в GenBank под номером JQ926744. Оказалось, что внутренние части гена *scpA* у всех плазмид абсолютно идентичны. Идентичной была и рестрикционная картина амплифицированных фрагментов всех SAL/CAP-плазмид, обработанных эндонуклеазой RsaI. Интересно, что все проанализированные плазмиды выделены в разное время из микрофлоры образцов почв, взятых из удаленных друг от друга участков, а pBS270 и вовсе “почет-

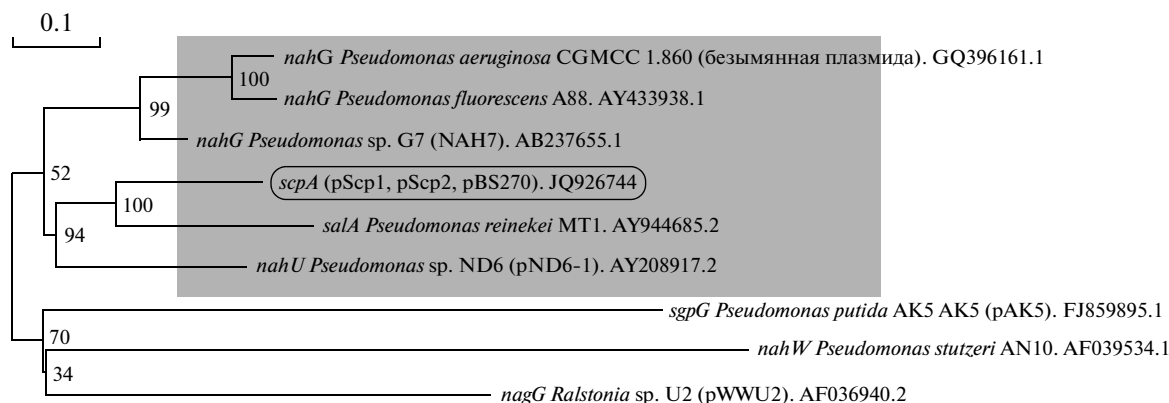


Рис. 2. Дендрограмма, иллюстрирующая эволюционное родство между нуклеотидными последовательностями гена салицилат-1-гидроксилазы *scpA* плазмид pScp1, pScp2, pBS270 и генов других штаммов и плазмид. График построен в программе TREECON [19]. После точек указаны номера депонированных в GenBank нуклеотидных последовательностей. Темным фоном выделена группа гомологичных салицилат-1-гидроксилаз.

ный член” первой в мире группы CAP-плазмид, выделенных сотрудниками нашей лаборатории более 20 лет назад из почв, загрязненных отходами предприятий по производству капролактама, расположенных в Кемерово и на других территориях СССР. Таким образом, ген *scpA*, по крайней мере его внутренняя часть, выглядит консервативным у целой группы SAL/CAP-плазмид, независимо от места и времени выделения этих внехромосомных элементов.

При сравнении нуклеотидной последовательности внутренней части *scpA* и других генов салицилатгидроксилаз в программе BLAST N получили следующие результаты: *scpA* идентичен *salA* (*P. reinekei* MT1) на 73%, *nahU* (pND6-1) – на 72% и “классическому” *nahG* (NAH7) – на 74%. Вычисленная аминокислотная последовательность фрагмента ScpA не более чем на 77% идентична соответствующему фрагменту известных салицилатгидроксилаз. Дендрограмма, иллюстрирующая эволюционное родство нуклеотидной последовательности *scpA* плазмид pScp1, pScp2, pBS270 и известных генов салицилатгидроксилаз других штаммов и плазмид, показана на рис. 2. Ген *scpA* формирует отдельную ветвь в группе генов салицилат-1-гидроксилаз, примерно одинаково удаленную от ветвей *nahG*, *salA* и *nahU*.

Активность салицилатгидроксилазы ScpA, кодируемой SAL/CAP-плазмидами

Важной характеристикой фермента служит его активность по отношению к различным субстратам, а также потребность в индукции экспрессии его гена. Известно, что салицилат активизирует транскрипцию *nah*-оперонов [29], в состав которых входит ген “классической” салицилат-1-гидроксилазы NahG. Добавление в культуральную среду небольших количеств салицилата в середи-

не экспоненциальной фазы роста NAH/SAL-де-структоров способствует накоплению значительных количеств NahG, что необходимо для измерения удельной активности этого фермента.

Для определения удельной активности салицилат-1-гидроксилазы ScpA были выбраны штаммы *P. putida* KT2442 (pScp1) и KT2442 (pBS270). В качестве субстратов использовали салицилат, 3-, 4- и 5-хлорсалицилаты и 3-, 4- и 5-метилсалицилаты. Результаты измерений представлены в табл. 2. Установлено, что активность ScpA в отношении замещенных салицилатов зависит от типа и положения заместителя. Максимальную активность фермент проявлял к салицилатам с заместителем в положении 4, несколько меньшую – к 5-замещенным и минимальную – к 3-замещенным производным. В целом, актив-

Таблица 2. Удельная активность салицилат-1-гидроксилазы ScpA штамма *P. putida* KT2442, содержащего плазмиду pScp1 или pBS270

Субстрат	Удельная активность ScpA, нмоль/(мин мг) белка*	
	pScp1	pBS270
Салицилат (без индукции)	142	177
Салицилат	128 (100)	151 (100)
3-хлорсалицилат	40 (31)	81 (54)
4-хлорсалицилат	96 (75)	118 (78)
5-хлорсалицилат	62 (48)	88 (58)
3-метилсалицилат	70 (55)	83 (55)
4-метилсалицилат	165 (128)	214 (142)
5-метилсалицилат	117 (91)	135 (90)

* Значения получены при использовании экстрактов индуцированных салицилатом клеток. В скобках указан процент от удельной активности по отношению к салицилату при индукции.

ность фермента была ниже по отношению к хлорсалицилатам, чем к метилсалицилатам.

Удельную активность салицилатгидроксилаз NahU и NahG штамма-деструктора нафталина *Pseudomonas* sp. ND6 (pND6-1) измеряли с использованием в качестве субстрата 3- и 5-метилсалицилатов, 5-хлорсалицилата, 3-, 5-динитросалицилатов, сульфосалицилата и аспирина [6]. Фермент NahG проявлял более высокую активность по отношению к 3- и 5-метил-, 5-хлорсалицилату, чем к незамещенному салицилату (активность по отношению к которому принимают за 100%): 128, 123, 115%; в то время как в случае NahU значения были гораздо скромнее: 45, 80 и 22% соответственно.

В штамме *P. stutzeri* AN10 идентифицированы два гена, *nahG* и *nahW*, которые кодируют две негомологичные салицилатгидроксилазы. Оказалось, что NahG и NahW более активны по отношению к 4-метилсалицилату (224 и 175% от активности на салицилате соответственно), чем к другим замещенным производным [30].

Салицилатгидроксилаза SalA штамма *P. reinekei* MT1, способного утилизировать 4- и 5-хлорсалицилаты, также обладала широкой субстратной специфичностью по отношению к различным монозамещенным салицилатам: 4- и 5-метилсалицилаты трансформировались с большей скоростью, чем салицилат, в отличие от 4- и 5-хлорсалицилатов, которые утилизировались менее эффективно [27].

Профиль удельных активностей фермента ScpA, кодируемого SAL/CAP-плазмидами, в большей степени сходен с профилем NahU. К сожалению, сравнивать абсолютные значения удельных активностей ферментов из разных штаммов не представляется возможным, так как на результат влияют даже небольшие различия в фазе роста культур бактерий. Предполагается, что синтез салицилат-1-гидроксилазы ScpA не требует индукции, поскольку удельные активности ScpA в клетках KT2442 (pScp1) и KT2442 (pBS270), выращенных на сукцинате как с индукцией, так и без индукции салицилатом (табл. 2), были сопоставимыми.

Так как продуктом реакции, катализируемой салицилат-1-гидроксилазами, является катехол, измеряли удельные активности и катехол-1,2-диоксигеназы, и катехол-2,3-диоксигеназы штамма *P. putida* KT2442, несущего плазмиды pScp1 или pBS270. Удельная активность катехол-2,3-диоксигеназы не определялась, что подтверждает правильность полученных нами отрицательных результатов амплификации гена *nahH*. Удельная активность катехол-1,2-диоксигеназы штамма *P. putida* KT2442, содержащего плазмиды pScp1 или pBS270, была высокой — 553 нмоль/(мин мг) белка и 187 нмоль/(мин мг) белка соответственно. Для

всех SAL/CAP-плазмид получен ПЦР-продукт распространенного варианта гена катехол-1,2-диоксигеназы (*catA*). Однако в препаратах плазмид, выделяемых из псевдомонад, всегда присутствует примесь хромосомной ДНК хозяина, а хромосома KT2442 содержит два гена катехол-1,2-диоксигеназы, один из которых — *catA*. ПЦР с геномной ДНК природного хозяина плазмиды pS6f — штамма *P. fluorescens* S6f (pS6f), не выявила генов *nahH* (катехол-2,3-диоксигеназа) и *catA* (катехол-1,2-диоксигеназа). Из этого следует, что в состав хромосомы штамма S6f или плазмиды pS6f входит ген катехолдиоксигеназы, негомологичный *catA* и *nahH*, поэтому существует вероятность, что трансформация катехола в штаммах KT2442, содержащих SAL/CAP-плазмиды, контролируется не только хромосомными генами.

Подводя итоги нашей работы, можно отметить следующее. Выделенные методом экзогенной изоляции SAL-плазмиды pS1, pS2 и pS3 не несут гены “классического” *nah2*-оперона, но содержат ген салицилат-1-гидроксилазы *nahU* типа pND6-1. Впервые установлено, что способность к биодegradации как капролактама, так и салицилата у штаммов-деструкторов этих соединений из лабораторной коллекции и новых почвенных образцов определяется крупными конъюгативными плазмидами, часть из которых относится к P-7-группе несовместимости. В SAL/CAP-плазмидах обнаружен и частично секвенирован новый ген салицилат-1-гидроксилазы — *scpA*, идентичный известным последовательностям не более чем на 72–74%. Синтез ScpA не индуцируется салицилатом, фермент имеет широкую субстратную специфичность и наибольшую удельную активность проявляет по отношению к 4-метилсалицилату и незамещенному салицилату. Окисление катехола штаммами KT2442 (pScp1) и KT2442 (pBS270) происходит по *орто*-пути, что нечасто встречается у плазмидосодержащих деструкторов салицилата.

Работа выполнена в рамках проекта Министерства образования и науки РФ (РНП 2.1.1/10938) и при поддержке грантов МНТЦ (4033) и Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-97562 p_центр_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raskin I. 1990. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2**, 439–463.
2. Habe H., Omori T. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 225–243.
3. Herrick J.B., Stuart-Keil K.G., Ghiorse W.C., Madsen E.L. 1997. Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Appl. Environm. Microbiol.* **63**, 2330–2337.

4. Tan H.-M. 1999. Bacterial catabolic transposons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 1–12.
5. Tsuda M., Iino T. 1990. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon. *Mol. Gen. Genet.* **223**, 33–39.
6. Zhao H., Chen D., Li Y., Cai B. 2005. Overexpression, purification and characterization of a new salicylate hydroxylase from naphthalene-degrading *Pseudomonas* sp. strain ND6. *Microbiol. Res.* **3**, 307–313.
7. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. 2005. Плазмиды биодеградации нафталина и салицилата Р-7 группы несовместимости в штаммах флуоресцирующих псевдомонад. *Микробиология.* **3**, 342–348.
8. Кошелева И.А., Измалкова Т.Ю., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Боронин А.М. 2003. Структурная и функциональная вариабельность генетических систем катаболизма полициклических ароматических углеводов у штаммов *Pseudomonas putida*. *Генетика.* **9**, 1185–1192.
9. Kulkarni R.S., Kanekar P.P. 1998. Effects of some curing agents on phenotypic stability in *Pseudomonas putida* degrading ϵ -caprolactam. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 255–257.
10. Сазонова О.И., Измалкова Т.Ю., Кошелева И.А., Боронин А.М. 2008. Дegrадация салицилата штаммами *Pseudomonas putida* без участия “классического” nah2-оперона. *Микробиология.* **6**, 1–7.
11. Есикова Т.З., Грищенко В.Г., Кулаков Л.А., Моренкова М.А., Боронин А.М. 1990. Группы несовместимости плазмид биодеградации ϵ -капролактама бактерий рода *Pseudomonas*. *Молекуляр. генетика, микробиол. вирусол.* **4**, 25–28.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press.
13. Есикова Т.З., Грищенко В.Г., Боронин А.М. 1990. Плазмиды биодеградации ϵ -капролактама. *Микробиология.* **4**, 547–552.
14. Волкова О.В., Кошелева И.А., Боронин А.М. 2012. Структура области инициации репликации плазмиды Rms148 (IncP-7), детерминирующей резистентность бактерий рода *Pseudomonas* к стрептомицину. *Молекуляр. биология.* **4**, 605–611.
15. Greated A., Thomas C.M. 1999. A pair of PCR primers for IncP-9 plasmids. *Microbiology (UK).* **145**, 3003–3004.
16. Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat J., Garcia-Valdes E., Rosselo-Mora R., Bosch R. 2002. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 957–962.
17. Wilkstrom P., Wilklund A., Anderson A.C., Forman M. 1996. DNA recovery and PCR quantification of catechol-2,3-dioxygenase genes from different soil types. *J. Biotechnol.* **52**, 107–120.
18. Izmalkova T.Yu., Mavrodi D.V., Sokolov S.L., Kosheleva I.A., Smalla K., Thomas C.M., Boronin A.M. 2006. Molecular classification of IncP-9 naphthalene degradation plasmids. *Plasmid.* **56**, 1–10.
19. Van de Peer Y., De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569–570.
20. Bredford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Ann. Biochem.* **72**, 248–254.
21. Kiyohara H., Nagao K. 1978. The catabolism of phenantrene and naphthalene by bacteria. *Gen. Microbiol.* **105**, 69–75.
22. Feist C.F., Hegeman G.D. 1978. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways. *J. Bacteriol.* **2**, 869–877.
23. Ornston L.N. 1966. The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. 3. Enzymes of the catechol pathway. *J. Biol. Chem.* **16**, 37953799.
24. Regenhardt D., Heuer H., Heim S., Fernandez D.U., Strompl C., Moore E.R.B., Timmis K.N. 2002. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**, 912–915.
25. Kulkarni R.S., Kanekar P.P. 1998. Bioremediation of ϵ -caprolactam from nylon-6 waste water by use of *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-407. *Curr. Microbiol.* **37**, 191–194.
26. Premraj R., Mukesh D. 2005. Biodegradation of polymers. *Indian J. Biotech.* **4**, 186193.
27. Camara B., Bielecki P., Kaminski F., dos Santos V.M., Plumeier I., Nikodem P., Pieper D.H. 2007. A gene cluster involved in degradation of substituted salicylates via *ortho* cleavage in *Pseudomonas* sp. strain MT1 encodes enzymes specifically adapted for transformation of 4-methylcatechol and 3-methylmuconate. *J. Bacteriol.* **189**, 1664–1674.
28. Blasco R., Wittich R.-M., Mallavarapu M., Timmis K.M., Pieper D.H. 1995. From xenobiotic to antibiotic, formation of protoanemonin from 4-chlorocatechol by enzymes of the 3-oxoadipate pathway. *J. Biol. Chem.* **49**, 29229–29235.
29. Barnsley E.A. 1975. The induction of the enzymes of naphthalene metabolism in pseudomonads by salicylate and 2-aminobenzoate. *Gen. Microbiol.* **1**, 193–196.
30. Bosch R., Moore E.R.B., Garcia-Valdes E., Pieper D.H. 1999. NahW, a novel, inducible salicylate hydroxylase involved in mineralization of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* AN10. *J. Bacteriol.* **181**, 2315–2322.