

## КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ *dca*-ГЕНОВ В КАТАБОЛИЗМЕ *epsilon*-КАПРОЛАКТАМА У БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

© 2015 г. Т. З. Есикова<sup>\*,1</sup>, О. В. Волкова<sup>\*</sup>, С. А. Таран<sup>\*\*</sup>, А. М. Боронин<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Пущино

<sup>\*\*</sup>ООО МБЦ Генериум, Москва

Поступила в редакцию 19.02.2015 г.

DOI: 10.7868/S0026365615050079

Исследование молекулярных механизмов возникновения и распространения у микроорганизмов способности окислять чужеродные соединения, ранее не существовавшие в природе, имеет не только научную значимость с точки зрения эволюционной биологии, но и практическое значение для решения задач экологии, биотехнологии и метаболической инженерии.

Капролактam (*epsilon*-капролактam, лактам 6-аминогексановой кислоты, КАП) — один из наиболее востребованных на мировом рынке химических продуктов, ежегодное мировое производство которого исчисляется миллионами тонн. Более 90% произведенного КАП используется для получения полимерных материалов (поликапроамид, капрон, нейлон-6), которые находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства.

Капролактam является устойчивым поллютантом, оказывающим токсическое воздействие на живые организмы (Gross, 1984). Хотя описаны бактерии, способные использовать его в качестве единственного источника углерода и энергии (Вахи, 2013; Sanuth et al., 2013), бактериальный катаболизм КАП представляет собой малоизученный процесс, на начальных этапах которого участвуют неизвестные гены и ферменты. В результате изучения катаболизма ксенобиотика у штамма-деструктора *Pseudomonas dacunhae* был предложен биохимический путь его деградации: *epsilon*-капролактam (КАП) → 6-аминогексановая кислота (АГК) → → адипиновая кислота (АД) → → → → цикл Кребса (Наумова, 1988). Также было показано, что способность бактерий рода *Pseudomonas* использовать КАП и его интермедиаты (АГК и АД) в качестве единственных источников углерода и энергии контролируется CAP-плазмидами (Наумова, 1988; Есикова и соавт., 1990). Цель настоящей работы — идентификация и исследование молекулярно-генетической организации участков CAP-плазми-

ды pBS270, ответственных за синтез ферментов катаболизма *epsilon*-капролактam и его интермедиатов.

В работе использовали штаммы псевдомонад из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН. Объектом исследований служила плазида биodeградации капролактam pBS270 размером около 110 т.п.н. (Панов и соавт., 2013), обнаруженная в штамме-деструкторе *Pseudomonas* sp. BS838, выделенном из отходов химического производства (Есикова и соавт., 1990). Штаммы *P. putida* KT2442(pBS270) и *P. vignae* 1025(pBS270) были получены путем конъюгационного переноса pBS270 из *Pseudomonas* sp. BS838. Бактерии выращивали при 28°C в полноценной среде Luria-Bertani или минеральной среде Эванса (Evans et al., 1965), в которую в качестве единственных источников углерода добавляли КАП или АД в концентрации 0.1% (вес/объем). Выделение ДНК, клонирование фрагментов, ПЦР-анализ и секвенирование ДНК проводили стандартными методами (Sambrook et al., 1989).

Одним из подходов к изучению целевых генов в составе крупных плазмид является клонирование фрагментов плазмиды в подходящие векторы с последующим определением и анализом функциональных участков. Для клонирования фрагментов плазмиды pBS270 использовали вектор pFME5mini (2.6 т.п.н) — полученный нами ранее мини-репликон природной плазмиды pFME5, выделенной из штамма *P. fluorescens* FME5, который обеспечивал репликацию и поддержание генетических конструкций в клетках псевдомонад (Волкова, 2013). ДНК pBS270 и pFME5mini обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Vam*HI, смесь фрагментов плазмиды и вектора лигировали T4 ДНК-лигазой и трансформировали клетки штаммов *P. putida* KT2442 и *P. vignae* 1025, которые не обладали способностью к росту на КАП и его интермедиатах. Селекцию трансформантов проводили на минеральной среде с КАП в качестве субстрата. В результате были получены колонии псевдомонад, содержащие pFME5mini со

<sup>1</sup> Автор для корреспонденции (e-mail: das3534@rambler.ru).

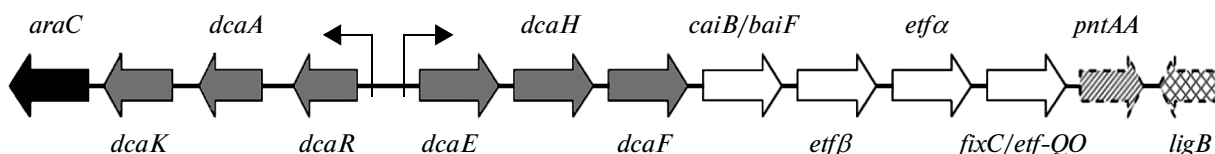


Рис. 1. Схема генетической организации *Bam*HI-фрагмента плазмиды pBS270 (15111 п.н.), содержащего кластер *dca*-генов.

“вставкой” размером около 15 т.п.н. Далее *Bam*HI-фрагмент pBS270 был реклонирован в *Escherichia-Pseudomonas* шаттл-вектор pUCP22, что позволило манипулировать с плазмидной ДНК в клетках *E. coli*, а функциональный анализ полученной конструкции, обозначенной pTE270-15, проводить в бактериях *Pseudomonas*. Для определения нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента использовали стратегию “праймер-опосредованной прогулки”.

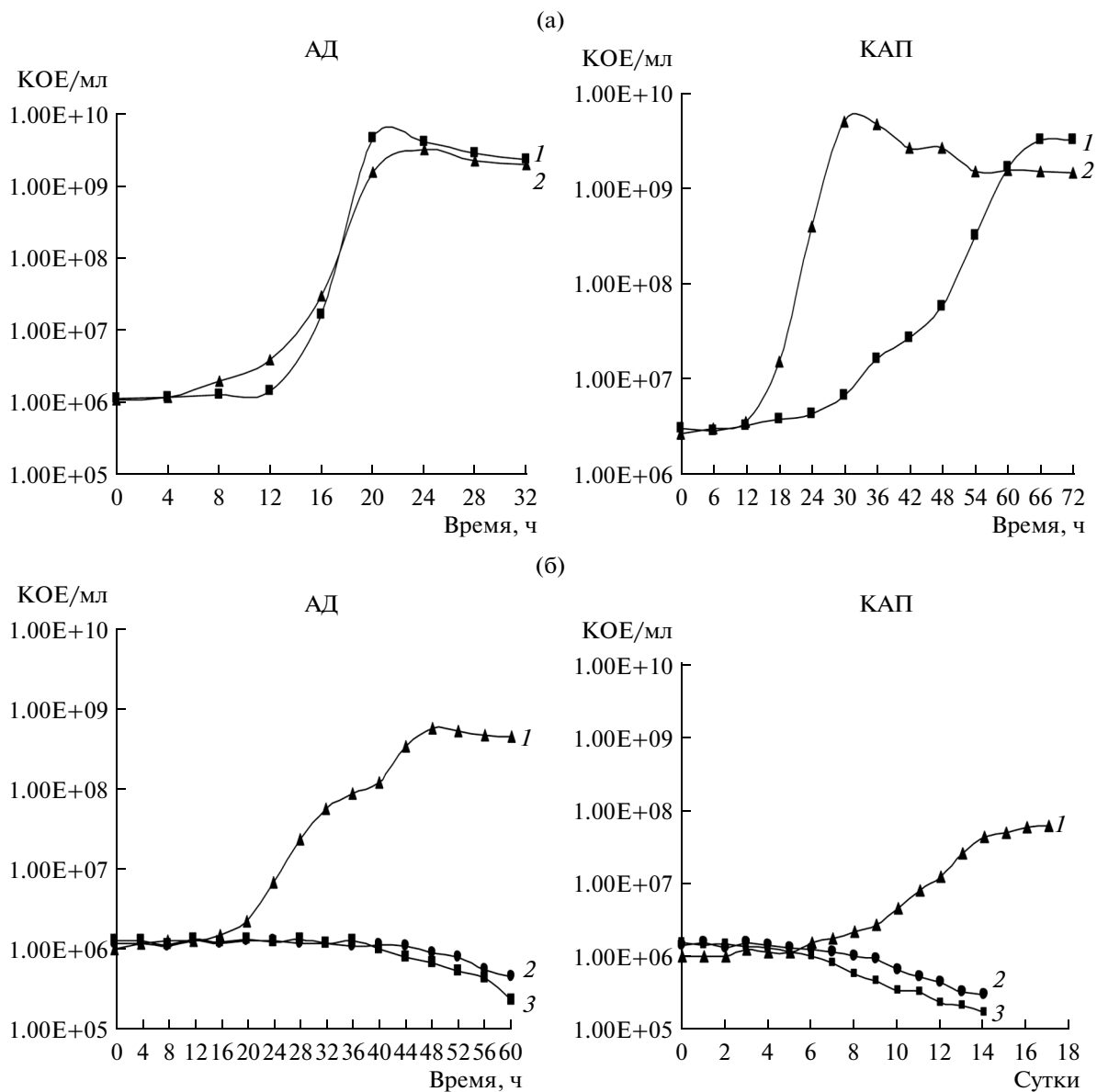
В составе фрагмента размером 15111 п.н. были обнаружены 13 открытых рамок считывания (ОРС), 2 из которых оказались неполными (рис. 1). Предполагаемые функции белковых продуктов каждой ОРС выявляли с использованием сервиса BLAST [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi] на основе гомологии с известными нуклеотидными и аминокислотными последовательностями. Проведенный анализ позволил идентифицировать в составе pTE270-15 кластер из 6 генов, порядок расположения которых оказался аналогичен структуре ранее охарактеризованного *dca*-оперона (от dicarboxylic acid) в геноме штамма *Acinetobacter* sp. ADP1 (Parke et al. 2001). Таким образом, в составе CAP-плазмиды pBS270 обнаружены гены *dcaKAREHF*, белковые продукты которых участвуют в окислении и транспорте высших дикарбоновых кислот, представителем которых является адипиновая кислота (см. схему катаболизма КАП). Ниже *dcaEHF* по ходу цепи ДНК расположены гены, продукты которых проявляли высокий уровень сходства с белками *CaiB/BaiF*, *Etfα* и *Etfβ* *Pseudomonas putida* SJ3 (94, 87 и 91% идентичных аминокислот соответственно) и белком *FixC* *Pseudomonas taiwanensis* SJ9 (94% идентичности). По имеющимся данным, эти ферменты и белковые продукты-акцепторы могут участвовать в переносе электронов в окислительно-восстановительных реакциях, сопряженных с метаболизмом дикарбоновых кислот или специфических субстратов (Watmough et al., 2010). Продукт ОРС, обнаруженной ниже *dcaK*, имел наибольшее сходство с транскрипционным регулятором *AraC* штамма *Ralstonia* sp. 5747 (53% идентичности).

Изучение динамики роста штаммов *P. putida* KT2442(pBS270) и *P. putida* KT2442(pTE270-15), показало, что обе плазмиды обеспечивали сходный рост клеток на минеральной среде с АД в качестве единственного источника углерода. Однако рост

штамма *P. putida* KT2442(pTE270-15) на среде с КАП характеризовался более длительным лаг-периодом по сравнению с *P. putida* KT2442(pBS270) (рис. 2а). Аналогичные результаты были получены и для соответствующих производных штамма *P. vignae* 1025 (данные не приводятся). Такое различие в динамике роста связано с тем, что природная плаزمида pBS270, как было показано ранее, содержит всю генетическую информацию, необходимую для полной утилизации ксенобиотика (Есикова и соавт., 1990). Поскольку pTE270-15 содержит только *dca*-оперон, то для биодеградации КАП в данном случае требуется совместное участие двух генетических систем, находящихся в транс-положении (*dca*-гены – на плазмиде, а гены, кодирующие синтез ферментов, осуществляющих первичные этапы катаболизма ксенобиотика – на хромосоме).

Известно, что способность окислять высшие дикарбоновые кислоты, в том числе и АД, не характерна для бактерий рода *Pseudomonas*. Описаны лишь единичные штаммы псевдомонад, в частности, *P. aeruginosa* PAO1, обладающие таким свойством (Parke et al., 2001; Stanier et al., 1966). Следует отметить, что в геноме штамма *P. aeruginosa* PAO1 аннотированы гены, гомологичные *dca*-генам *Acinetobacter* sp. ADP1 (Stover et al., 2000). Исходя из полученных результатов, мы предположили, что наличие в штаммах псевдомонад *dca*-генов, локализованных на плаزمиде или хромосоме, играет ключевую роль в появлении у них способности к катаболизму КАП. Изучение роста штамма *P. aeruginosa* PAO1 на минеральной среде с КАП подтвердило это предположение. Из данных, представленных на рис. 2б видно, что штамм *P. aeruginosa* PAO1, обладающий способностью утилизировать АД, после длительного культивирования демонстрировал рост на минеральной среде с КАП в качестве единственного источника углерода. Штаммы *P. putida* KT2442 и *P. vignae* 1025, изначально не утилизирующие АД, так и не приобрели способность к деградации капролактама.

Таким образом, в составе плазмиды биодеградации капролактама обнаружен кластер *dca*-генов, кодирующих ферменты окисления высших дикарбоновых кислот. Полученные результаты являются первыми сведениями об организации генов, вовлеченных в катаболизм КАП и локали-



**Рис. 2.** Динамика роста штаммов рода *Pseudomonas* в минеральной среде, содержащей адипиновую кислоту (АД) и  $\epsilon$ -caprolactam (КАП) в качестве единственных источников углерода и энергии: (а) плазмидосодержащих производных *P. putida* КТ2442: 1 – *P. putida* КТ2442(рТЕ270-15), 2 – *P. putida* КТ2442(рBS270); (б) бесплазмидных штаммов: 1 – *P. aeruginosa* PAO1, 2 – *P. putida* КТ2442, 3 – *P. vignae* 1025.

зованных на CAP-плазмиде. Показано, что наличие *dca*-генов, локализованных на плаزمиде или хромосоме, необходимо для осуществления бактериями рода *Pseudomonas* катаболизма неприродного соединения капролактама. Примечательно, что *dca*-оперон у штамма *Acinetobacter* sp. ADP1 входит в состав хромосомного геномного острова “island of catabolic diversity”, кодирующего деградацию различных ароматических соединений (Parke et al., 2001). Известно, что геномные острова, наряду с плазмидами и транспозонами,

могут играть большую роль в горизонтальном переносе катаболических генов в бактериальных популяциях (Juhás et al., 2009). Обнаружение *dca*-генов в составе рBS270 является еще одним примером, подтверждающим участие плазмид в возникновении и распространении новых катаболических путей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Волкова О.В., Кошелева И.А., Боронин А.М. Организация и особенности поддержания базового репликона

- IncP-7 плазмиды биодegradации нафталина pFME5 // Генетика. 2013. Т. 49. № 5. С. 558–568.
- Volkova O.V., Kosheleva I.A., Boronin A.M. Organization and maintenance features of IncP-7 naphthalene degradation plasmid pFME5 basic replicon // Russian Journal of Genetics. V. 49. № 5. P. 477–486.
- Есикова Т.З., Грищенко В.Г., Боронин А.М. Плазмиды биодegradации капролактама // Микробиология. 1990. Т. 59. № 4. С. 547–552.
- Esikova T.Z., Grishchenkov V.G., Boronin A.M. Plasmids controlling  $\epsilon$ -caprolactam biodegradation // Microbiology (Moscow). 1990. V. 59. № 4. P. 367–372.
- Наумова Р.П., Есикова Т.З., Ильинская О.Н., Грищенко В.Г., Боронин А.М. Метаболизм  $\epsilon$ -капролактама у псевдомонад в связи с его плазмидной обусловленностью // Микробиология. 1988. Т. 57. № 3. С. 426–430.
- Панов А.В., Волкова О.В., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Коселева И.А., Боронин А.М. *scrA* – новый ген салицилатгидроксилазы, локализованный на плаزمидах деградации салицилата/капролактама // Молекулярная биология. 2013. Т. 47. № 1. С. 116–123.
- Panov A.V., Volkova O.V., Puntus I.P., Esikova T.Z., Kosheleva I.A., Boronin A. M. *scrA*, a new salicylate hydroxylase gene localized in salicylate/caprolactam degradation plasmids // Molecular Biology (Moscow). V. 47. № 1. P. 105–111.
- Baxi N.N. Influence of  $\epsilon$ -caprolactam on growth and physiology of environmental bacteria // Ann. Microbiol. 2013. V. 63. P. 1471–1476.
- Gross P. Biologic activity of  $\epsilon$ -caprolactam // Crit. Rev. Toxicol. 1984. V. 13. № 3. P. 205–216.
- Evans W.C., Fernley H.N., Griffiths E. Oxidative metabolism of phenantrene and anthracene by soil pseudomonads: the ring-fission mechanism // J. Biochem. 1965. V. 95. P. 819–831.
- Juhas M., van der Meer J.R., Gaillard M., Harding R.M., Hood D.W., Crook D.W. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution // FEMS Microbiol. Rev. 2009. V. 33. P. 376–393.
- Parke D., Garcia M.F., Ornston L.N. Cloning and genetic characterization of *dca* genes required for  $\beta$ -oxidation of straight-chain dicarboxylic acids in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 10. P. 4817–4827.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Sanuth H.A., Yadav A., Fagade O.E., Shouche Y.  $\epsilon$ -Caprolactam utilization by *Proteus* sp. and *Bordetella* sp. isolated from solid waste dumpsites in Lagos state, Nigeria, first report // Indian J. Microbiol. 2013. V. 53. № 2. P. 221–226.
- Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M. The aerobic Pseudomonads: a taxonomic study // J. Gen. Microbiol. 1966. V. 43. P. 159–271.
- Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warriner P., Hickey M.J., Brinkman F.S.L. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen // Nature. 2000. V. 406. P. 959–964.
- Watmough H., Fremmen F.E., The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases // Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics. 2010. V. 1797. № 12. P. 1910–1916.