

КЛАССИФИКАЦИЯ IncP-7-ПЛАЗМИД, ОСНОВАННАЯ НА СТРУКТУРНОМ РАЗНООБРАЗИИ ИХ БАЗОВЫХ РЕПЛИКОНОВ

© 2013 г. О. В. Волкова^{1*}, А. В. Панов¹, И. А. Кошелева^{1,2}, А. М. Боронин^{1,2}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290

²Пушинский государственный естественнонаучный институт, Пущино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 30.06.2012 г.

Принята к печати 27.09.2012 г.

При помощи полимеразной цепной реакции, рестрикционного анализа и избирательного секвенирования впервые оценено структурное разнообразие базовых репликонов и гена *repB* в большой выборке IncP-7-плазмид. Обнаружено, что участок, содержащий ген *UvrD*-подобной хеликазы RepB, входит в состав всех известных P-7-репликонов, но часто служит местом внедрения различных IS-элементов. На основе выявленного нуклеотидного полиморфизма участка *repA-oriV-parWABC* разработана система классификации P-7-плазмид. Большинство плазмид биодеградации отнесено к подгруппе β , плазида резистентности к стрептомицину Rms148 (IncP-7-архетип) – к подгруппе α . В состав подгруппы γ вошли плазида биодеградации карбазола pCAR1 и NAH/SAL-плазмиды из линии pY, выделенные из почв полуострова Ямал. В условную подгруппу δ выделена CAP-плазида pBS270, содержащая, возможно, редуцированный P-7-репликон. Установлено, что тип организации IncP-7-базового репликона в большинстве случаев не связан с определенным фенотипическим признаком, детерминируемым плазмидой, т.е. в состав одной подгруппы могут входить плазмиды, определяющие различные фенотипы.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, плазмиды группы IncP-7, базовый репликон, рестрикция, нуклеотидная последовательность, полиморфизм *repA-oriV-parWABC*, классификация.

IncP-7 PLASMIDS' CLASSIFICATION BASED ON STRUCTURAL DIVERSITY OF THEIR BASIC REPLICONS, by O. V. Volkova^{1*}, A. V. Panov¹, 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: volkova_o_v@inbox.ru; ²Pushchino Educational Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia). The structural diversity of basic replicons and *repB* gene of the IncP-7 plasmids' collection was firstly assessed on the basis of PCR, restriction analysis and partial sequencing. It has been revealed that DNA fragment containing gene for UvrD-like helicase RepB is a part of all known P-7 replicons, but often serves as hot place for diverse IS-elements invasion. The first system of P-7 plasmids' classification has been worked out on the basis of determined *repA-oriV-parWABC* nucleotide divergency. Most degradation plasmids established to be belonging to large β -subgroup, streptomycin resistance plasmid Rms148 (IncP-7 archetype) – to α -subgroup, carbazole degradation plasmid pCAR1 and NAH/SAL-plasmids from pY-line (Yamal oil deposits) – to γ -subgroup and CAP-plasmid pBS270 with potentially reduced P-7 replicon – to δ -subgroup. It has been observed that the type of IncP-7 basic replicon molecular organization does not correlate with fixed phenotypic character in most cases, that is plasmids encoding different phenotypic markers could be members of the same P-7 subgroup.

Keywords: *Pseudomonas*, IncP-7 group plasmids, basic replicon, restriction, nucleotide sequence, *repA-oriV-parWABC* polymorphism, classification.

DOI: 10.7868/S002689841302016X

Распространенные повсеместно бактерии рода *Pseudomonas* известны как деструкторы различных органических соединений, в том числе ток-

сичных и канцерогенных поллютантов. Однако серьезную проблему представляет приобретение некоторыми условно патогенными представителя-

Принятые сокращения: NAH-плазида – плазида биодеградации нафталина; SAL-плазида – плазида биодеградации салицилата; TOL-плазида – плазида биодеградации толуола; CAP-плазида – плазида биодеградации ϵ -капролактама; ОРС – открытая рамка считывания.

* Эл. почта: volkova_o_v@inbox.ru

ми этого рода множественной устойчивости к антибиотикам [1]. Очень часто эти фенотипические признаки кодируются внехромосомными генетическими элементами – плазмидами биодеградаци и антибиотикорезистентности (D- и R-плазмиды соответственно) [2, 3]. Плазмиды классифицируют по “даруемым” хозяину фенотипическим признакам, по размеру, способности к конъюгационному переносу и т.п. Но наибольший интерес с молекулярно-генетической точки зрения представляет классификация плазмид по признаку несовместимости, поскольку она основана на различиях структуры и функционирования их базовых репликонов (областей, ответственных за репликацию и стабильное поддержание плазмид в ряду бактериальных поколений) и отражает эволюционный путь генетического элемента [4]. В системе классификации плазмид псевдомонад (IncP) насчитывается 14 групп несовместимости [3].

Большинство описанных плазмид биодеградаци ксенобиотиков и ароматических углеводов относится к группам P-1, P-7 и P-9. Структура P-1-репликонов и механизмы их поддержания в разных хозяевах неплохо изучены, в первую очередь, из-за большого числа R-плазмид в составе группы и благодаря небольшому размеру этих плазмид, что облегчает секвенирование [5]. На основе результатов филогенетического анализа плазмидного “остова” (консервативных областей, свободных от инсерционных последовательностей и контролирующей репликацию, стабильное поддержание и мобилизацию/конъюгационный перенос) выделили шесть подгрупп P-1-плазмид (α - ζ) [6]. Установлена корреляция между строением базовых репликонов плазмид P-9-группы несовместимости и структурой плазмид в целом, что послужило основой для выделения 9 подгрупп (α - ι) в составе группы IncP-9 [7, 8]. До настоящего времени не было оценено структурное разнообразие IncP-7-плазмид, не разработана их внутригрупповая классификация. Рестрикционный анализ нескольких плазмид биодеградаци P-7-группы не позволил разделить их на отдельные подгруппы [9], что может быть обусловлено большим количеством и разнообразием мобильных генетических элементов, внедренных в плазмидный “остов”, или же полиморфизмом самого “остова”. Известны полные нуклеотидные последовательности лишь четырех представителей этой группы (pCAR1, pND6-1, pWW53, pDK1), частичные – еще трех (pL6.5, pFME5, Rms148). Лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН обладает богатой коллекцией плазмид биодеградаци и резистентности нескольких IncP-групп. Из коллекции были отобраны 11 плазмид, отнесенных на основании микробиологического теста на несовместимость и/или ПЦР-анализа к группе IncP-7. При помощи подобранных пар праймеров, рестрикционного анализа и частичного секве-

нирования мы оценили структурное разнообразие базовых репликонов выбранных плазмид и с учетом последовательностей P-7-плазмид, представленных в GenBank, и результатов работы [10] впервые выделили подгруппы в составе группы IncP-7.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1. Часть плазмид была выделена ранее методом экзогенной изоляции с использованием аборигенных почвенных бактерий в качестве доноров плазмидной ДНК и лабораторного штамма *P. putida* KT2442 (предоставлен К. Смалла) в качестве реципиента. Бактерии выращивали в среде LB и в минерально-солевой среде Эванса [12] при 28°C. Нафталин, салицилат и капролактam вносили в среду в концентрации 1 г/л. Стрептомицин для поддержания плазмиды Rms148 добавляли в среду LB до достижения конечной концентрации 200 мкг/мл, тетрациклин (для селекции базовых репликонов плазмид в штаммах рода *Pseudomonas*) – 30 мкг/мл.

Плазмидную ДНК большого размера выделяли из псевдомонад методом щелочного лизиса [12], базовые репликоны – при помощи набора “ZR Plasmid MiniprepTM-Classic” (“Zymo Research”, США).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и визуализация ДНК. ПЦР проводили в циклере Mastercycler Gradient (“Eppendorf”, Германия). Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 2. Реакцию проводили в стандартных условиях с использованием Taq-ДНК-полимеразы. Электрофорез ДНК проводили в 0.8 и 1.5%-ном агарозных гелях в Трис-ацетатном буфере по стандартной методике [12]. В качестве маркеров молекулярных масс использовали “GeneRuler 1 kb DNA Ladder” (SM0311) и “GeneRuler 50 bp DNA Ladder” (SM0371) (“Fermentas”). ДНК визуализировали путем окрашивания геля в растворе бромистого этидия. ДНК выделяли из геля, используя “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit” (“Zymo Research”), по протоколу фирмы-изготовителя.

ДНК расщепляли эндонуклеазами рестрикции производства “Fermentas” (Литва) при 37°C (SmaI – при 30°C) в течение 2–6 ч в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

Минимальный репликон плазмиды pY1-3 конструировали согласно [10]. Область *repA-oriV* амплифицировали с праймерами 4210F и 6216R (табл. 2); селективным маркером для отбора клонов *P. aureofaciens* BS1393, содержащих автономно реплицирующиеся конструкции, служил ген устойчивости к тетрациклину. Минимальный репликон плазмиды pFME5 получен ранее таким

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм	Плаزمида (IncP-7)	Характеристика плазмиды	Источник	
<i>P. fluorescens</i> OS18	pOS18, 135 т.п.н.	Nah Sal Tra ⁺	Шламонакопитель ОАО “Нижнекамскнефтехим”, г. Нижнекамск [9]	
<i>P. fluorescens</i> FME4	pFME4, 77 т.п.н.	Nah Sal		
<i>P. fluorescens</i> FME5	pFME5, 80 т.п.н.	Nah Sal Tra ⁺		
<i>P. putida</i> AK5	pAK5, 115 т.п.н.	Nah Sal Gen		
	pEx4	Sal Cap Tra ⁺		Экзогенный изолят, эстакада г. Пушкино
	pY1-3	Nah Sal Gen Tra ⁺		Экзогенные изоляты, почвы нефтяных месторождений полуострова Ямал
	pY1-7	Sal Gen Tra ⁺		
	pY5-6	Sal Gen Tra ⁺	Штаммы <i>Pseudomonas</i> , почвы химзавода г. Кемерово [11]	
<i>P. fluorescens</i> S6f	pS6f	Sal Cap Tra ⁺	Почвы химзавода г. Щекино Тульской обл. Коллекция ЛБП	
<i>P. aureofaciens</i> BS1393*	Rms148, 180 т.п.н.	Sm ^R Tra ⁺	Плазмида получена от S. Mitsuhashi (Япония) [10]	
<i>P. aureofaciens</i> BS1393	мини-репликон Rms148, 2053 п.н.	<i>repA-oriV</i> Rms148, сшитые с геном Tc ^R		
<i>P. aureofaciens</i> BS1393	мини-репликон pFME5, 1918 п.н.	<i>repA-oriV</i> pFME5, сшитые с геном Tc ^R	Волкова О.В. (не опубликовано)	
<i>P. aureofaciens</i> BS1393	мини-репликон pY1-3, ~1980 п.н.	<i>repA-oriV</i> pY1-3, сшитые с геном Tc ^R	Данная работа	

* Вид реклассифицирован как *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*.

Примечание. Кодированные плазмидой признаки биодegradации: нафталина – Nah; салицилата – Sal; капролактама – Cap; гентизата – Gen. Кодированная плазмидой устойчивость к стрептомицину – Sm^R; тетрациклину – Tc^R. Tra⁺ – доказанная способность к конъюгационному переносу. ЛБП – лаборатория биологии плазмид ИБФМ РАН.

же способом, но с праймерами 4292F и 6216R (Волкова О.В. и др., в печати).

Стабильность поддержания минимальных репликонов Rms148 [10], pFME5 и pY1-3 в штамме *P. aureofaciens* BS1393 определяли путем последовательных пересевов в жидкой среде LB без тетрациклина. Отдельные колонии выращивали в 5 мл бульона до поздней логарифмической фазы, по 50 мкл суспензии ежедневно переносили в свежий бульон в течение 6 сут в трех повторях. Пробы отбирали ежедневно; после серии разведений культуру высевали на чашки с LB-агаром, по 100 сформировавшихся колоний переносили репликатором на LB-агар с тетрациклином. Стабильность плазмиды определяли как долю клонов, сохранивших устойчивость к тетрациклину, среди всех проверенных клонов (%).

ДНК секвенировали на автоматическом секвенаторе ДНК ABI Prism 373 3130XL Genetic Analyser (“Perkin-Elmer”) в научно-производственной компании “Синтол” (Москва). В качестве матриц

для секвенирования использовали очищенные продукты амплификации различных участков базового репликона IncP-7-плазмид, полученные с праймерами, перечисленными в табл. 2.

Нуклеотидные и вычисленные аминокислотные последовательности анализировали при помощи пакета программ DNASTar, pDRAW32 (“ACACLONE software”) и доступных on-line NCBI BLASTN и BLASTP.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфизм области *repAB-oriV*

Принадлежность плазмиды к той или иной группе несовместимости обычно определяют по результатам стандартного микробиологического теста на несовместимость, что трудоемко и часто неосуществимо из-за особенностей переноса плазмидной ДНК и наличия/отсутствия селективных маркеров у двух тестируемых репликонов. Благодаря быстрому пополнению баз данных нуклеотидных последо-

Таблица 2. ПЦР-праймеры, использованные в работе

Ген/область	Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	ПЦР-продукт, п.н.	Ссылка
<i>repA</i> (IncP-7)	RepAP7F	GCCCATGCCGAAAAAGGTGTC	412	[10]
	RepAP7R	GAATCGTTGATAGGCATCCGAC		
<i>parA</i> pND6-1-тип	ParANDF	TCACCTCAAGGGCTTATACG	355	Волкова О.В.
<i>parA</i> pCAR1-тип	ParACARF	ATTGTTTTGGATTGACTACCCG	518	Волкова О.В.
<i>parC</i> (IncP-7)	ParACARR	ATCCTCGAGGTACGCATCAGC	267	Волкова О.В.
	ParCP7F	TGGTGCAACCGCAGACACG		
<i>repA-oriV</i>	4210F	ATCGTCGTAACGCCTACAG	~1900	[10]
	6216R	GACGGATCCTAATCTGGTTGCTCTC*		
<i>repB</i> (IncP-7)	RepBF	TTCTGCAGCAAATCGCTTGAG*	2344	Данная работа
	RepBR	CTGGATCCATGTGTTCAGTTTCG*		
<i>parW</i> (IncP-7)	ParWF	ATCATCGACAAGATTGGTAC	299	Данная работа
	ParWR	TTGACTGTGAATTGGGTGTC		
<i>parB</i> pND6-1-тип	ParBNDF	AATCTCAGGGTTTCCGTTG	495	»
<i>parB</i> pCAR1-тип	ParBCARF	ACCCAATTTAAGAGTTTCGG	437	»
	ParBCARR	CTTCTTGGCCTTCGTTGTC		
<i>oriV</i> (IncP-7)	4292F	CGAAGCTTCAGTATTCATTGGGGTTC*	~1000	»
	5292R	CTGTAGTCGATACCCAGGAG		
фрагмент <i>oriV</i> (IncP-7)	4210F	ATCGTCGTAACGCCTACAG	~700	»
	ori630R	GAAAGACTATTTATTGGCG		

* Полужирным выделены внесенные для клонирования сайты узнавания рестриктаз BamHI, PstI, HindIII, которые в этой работе не использовали (подчеркнуты измененные нуклеотиды).

вательностей, в последнее время предпринимаются попытки подбора праймеров, специфичных к наиболее консервативным в пределах группы несовместимости участкам плазмидных “остовов” (обычно структурам минимального репликона). В представленной работе мы будем определять область, содержащую ген белка-инициатора репликации *rep* и сайт начала репликации *oriV*, т.е. минимальный фрагмент, необходимый для воспроизведения плазмиды, как “минимальный репликон”. Минимальный репликон вместе с генами сегрегации (*par*), “стабилизирующими” его в бактериальной популяции, будем считать “базовым репликоном”. Если для IncP-9-плазмид удалось подобрать общие для группы праймеры, позволяющие с помощью ПЦР детектировать ген *rep* и сайт *oriV* [13], то в случае группы P-1 это оказалось невозможным из-за высокой степени дивергенции нуклеотидных последовательностей минимальных репликонов [6].

Анализ нуклеотидных последовательностей частично или полностью секвенированных IncP-7-плазмид pND6-1, pWW53, pL6.5, pDK1 и pCAR1 (номера в GenBank AY208917, AB238971, AJ250853,

AB434906 и AB088420 соответственно) выявил консервативный характер их предполагаемого базового репликона, что позволило подобрать праймеры для обнаружения гена *repA* и конструирования минимальных репликонов плазмид этой группы [10]. Рестрикционный анализ ПЦР-фрагментов гена *repA* нескольких плазмид из коллекции лаборатории показал, что только у плазмиды Rms148 рестрикционная картина внутренней области гена *repA* (412 п.н.) отличалась от рестрикционной картины всех остальных плазмид. Определение нуклеотидной последовательности минимального репликона Rms148 и ее сопоставление с известными последовательностями *repA-oriV* P-7-плазмид позволило построить филогенетическое древо, отдельные ветви которого (предварительные подгруппы) сформировали плазмиды pCAR1, Rms148 и кластер pND6-1-подобных плазмид (pND6-1, pWW53, pL6.5, pDK1) [10]. В общей сложности проанализированы ампликоны *repA* 11 плазмид из коллекции лаборатории (табл. 1), выделенных в разное время из географически удаленных мест и определяющих различные фенотипы. Оказалось, что рестрикционные картины ПЦР-фрагментов

repA всех плазмид (за исключением Rms148) были одинаковыми и соответствовали виртуальным картинам рестрикции ампликонов *repA* pCAR1 и pND6-1 (электрофореграмма не приведена, поскольку не отличается от представленной в работе [10]). Таким образом, в отличие от секвенирования, рестрикционный анализ ПЦР-фрагментов гена *repA* не позволяет различить pCAR1- и pND6-1-подобные репликоны.

“Ниже” гена *repA* в четырех полностью секвенированных Р-7-плазмидах локализован ген *repB*, предположительно кодирующий ДНК-хеликазу суперсемейства I ДНК- и РНК-хеликаз. Вычисленные аминокислотные последовательности RepB этих четырех плазмид (693 аминокислотных остатка) идентичны на 99–100%, С-концевая область (44% от общего размера RepB IncP-7) полностью идентична хеликазе, кодируемой плазмидой pGRT1 (номер в GenBank AEK25429), и на 54–56% (69% длины RepB IncP-7) – хеликазам различных штаммов *P. aeruginosa* и *P. syringae*, однако значимой гомологии с функционально охарактеризованными белками не обнаружено. Во вторичной структуре белка RepB представлены классические АТФ-связывающий и С-концевой домены 3'-5'-UvrD-хеликаз. Функциональная активность UvrD-хеликаз в отличие от хеликазы Rep скорее связана с процессами репарации (эксцизионной – совместно с UvrABC, и метил-направляемой репарацией ошибок репликации – вместе с MutSLH), чем с нормальной репликацией [14, 15]. UvrD-хеликазы способны также осуществлять “перезапуск” репликации в области заблокированных по разным причинам репликативных вилок путем удаления молекул RecA, связанных с оцДНК, или белка Tus, связанного с сайтами терминации репликации *ter* [16, 17]. Следует отметить, что ген *tus* представлен не во всех IncP-7-плазмидах, а консервативные последовательности известных *ter*-сайтов [17] нам обнаружить не удалось. В области начала репликации всех Р-7-плазмид находится несколько сайтов потенциального метилирования GATC, которые в случае ошибочного включения нуклеотидов при репликации могут быть никированы MutH-подобной эндонуклеазой в составе комплекса MutSLH и служить стартовыми точками для расплетения ДНК хеликазой UvrD-типа (механизм метил-направляемой репарации на примере *E. coli* описан в работе [15]). Неизвестно, какие хеликазы выполняют эту функцию у IncP-7-плазмид (если она вообще существенна для репликонов этой группы) – плазмид-специфические (например, RepB) или гомологи, кодируемые хромосомой хозяина. На примере базового репликона плазмиды pCAR1 [18] показано, что для его стабильного поддержания в клетках *P. putida* DS1 необходима область *repA-oriV-parWAB*. Однако нельзя исключить возможность функционирования продукта

гена *repB* в других штаммах бактерий в специфических условиях или на каких-то этапах воспроизведения целых плазмид этой группы, размер которых обычно равен 50–200 т.п.н.

Несмотря на консервативный характер гена *repB* и его присутствие во всех четырех секвенированных Р-7-плазмидах, в плазмиде pDK1 ОРС гена *repB* нарушена внедрением крупной инсерционной последовательности, а в случае pWW53 IS-элемент встроен между потенциальным промотором гена *repB* и стартом его трансляции (рис. 1а, в). Мы решили проверить, входит ли этот ген в состав консервативного “остова” Р-7-плазмид, и как часто он встречается в интактном состоянии. Подобранные праймеры RepBF и RepBR (табл. 2), специфичные к нуклеотидным последовательностям в районе 100–160 п.н. “выше и ниже” ОРС *repB*, и используя в качестве матриц ДНК 11 плазмид группы IncP-7, мы амплифицировали 11 фрагментов, размер большей части которых соответствовал ожидаемому – 2344 п.н. (рис. 1б). Более того, рестрикционные картины, полученные после обработки всех ампликонов этого размера эндонуклеазами HaeIII и RsaI, не отличались от виртуальных картин рестрикции соответствующей области плазмид pCAR1 и pND6-1 (данные не приведены). ПЦР-фрагменты, полученные на матрицах Rms148, pAK5, pY1-3, pY1-7 и pY5-6, были длиннее на 100–400 п.н., однако их размер исключал внедрение полноценных IS-элементов или транспозонов в ген *repB* и прилегающей к нему участки. При помощи “грубого” секвенирования удалось установить, что у плазмид pAK5 и pY1-3 увеличение размера ампликона не связано с высокой дивергенцией нуклеотидных последовательностей гена *repB*. В pY1-3 обнаружена уникальная инсерционная последовательность размером ~400 п.н., локализованная через 14 п.н. после стоп-кодона *repB* без удвоения нуклеотидов матрицы. У pAK5 инсерционная последовательность размером ~300 п.н. встроена в ОРС *repB* за 180 п.н. до стоп-кодона (тоже без удвоения нуклеотидов матрицы). Небольшая часть вставки гомологична участкам нескольких плазмид группы IncQ/IncP-4, прилегающим к интегронам класса 3 или внутренним структурам интегронов/IS-элементов, а 3'-конец на 87% идентичен 5'-инвертированному повтору Tn4654. Обе инсерции представляют собой, по-видимому, остатки одного или нескольких IS-элементов/транспозонов, ранее некорректно покинувших место внедрения. Не исключено и присутствие дефектных интегронных в этой области. Таким образом, большинство IncP-7-плазмид несет интактные консервативные гены *repB*, у двух плазмид (pAK5 и pDK1) инсерции нарушают ОРС, у pWW53 и pY1-3 (вероятно, и у гомологичных ей pY1-7 и pY5-6) они локализованы в непосредственной близости от *repB*, т.е. исследуемая область представляет собой горя-

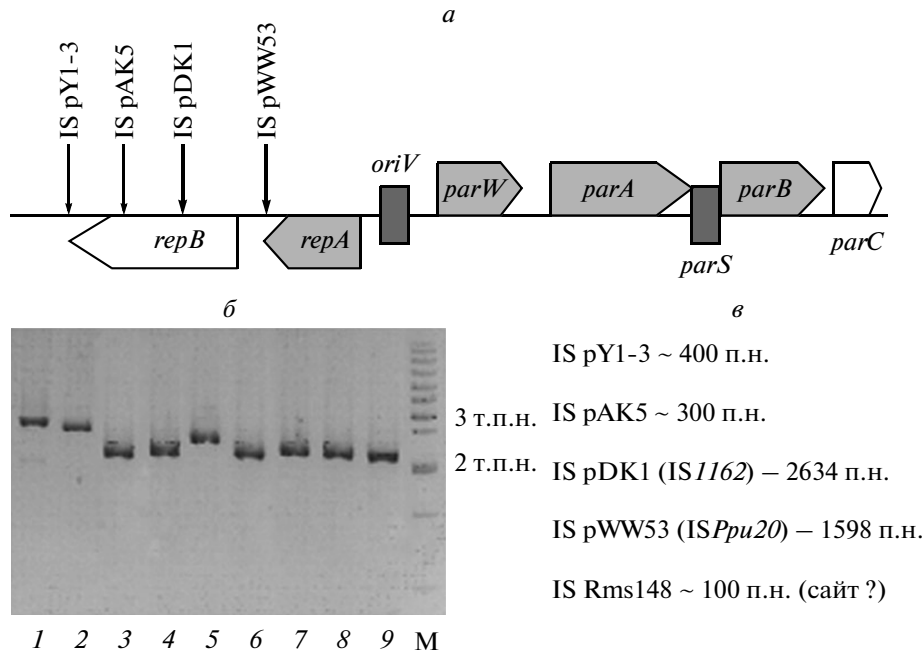


Рис. 1. Полиморфизм гена *repB* и примыкающей к нему области у плазмид группы IncP-7. *а* – Схема базового P-7-репликона с обозначенными местами инсерций в районе *repB* разных представителей группы. Участки и гены, необходимые для репликации и стабильного поддержания репликона, тонированы. *б* – Электрофореграмма продуктов амплификации гена *repB* P-7-плазмид из лабораторной коллекции (праймеры RepBF-RepBR, размер фрагмента без инсерций – 2344 п.н.): 1 – pY1-3*, 2 – pAK5, 3 – pFME4, 4 – pFME5, 5 – Rms148, 6 – pOS18, 7 – pS6f, 8 – pEx4, 9 – pBS270, М – маркер молекулярных масс (1 kb DNA ladder). *в* – Размер инсерционных последовательностей в районе гена *repB* плазмид P-7-группы. ПЦР-фрагменты *repB* плазмид pY1-7 и pY5-6 идентичны *repB* pY1-3.

чую точку для внедрения чужеродной ДНК. Нельзя исключить, что адаптация P-7-плазмид к узкому кругу хозяев (род *Pseudomonas*) могла привести к утрате потребности в хеликазе RepB для осуществления витальных плазмидных процессов, а функции этой хеликазы в случае необходимости выполняют клеточные гомологи. Присутствие и характер инсерций не коррелируют с принадлежностью плазмиды к той или иной предварительной подгруппе, они, скорее, отражают индивидуальную историю репликона.

Как отмечено ранее [10], область инициации репликации (*oriV*) плазмид трех подгрупп несколько отличается по размеру и менее консервативна, чем последовательность гена *repA*, что предполагает возможность выделения подгрупп плазмид на основе рестрикционного анализа продуктов амплификации этой области. При помощи программы pDRAW32 рассмотрены виртуальные варианты рестрикции мелкощепящими эндонуклеазами 4292F-5292R-фрагментов P-7-плазмид с известными последовательностями *oriV*. Обработка 4292F-5292R-ампликона плазмиды Rms148 (1055 п.н.) эндонуклеазой HaeIII приводит к образованию фрагментов следующего размера: 302 + 261 + 240 + 95 + 79 + 52 + 14 + 12 п.н.; плазмид pND6-1-типа (999 п.н.): 220 + 205 + 117 + 116 + 114 + 112 + 52 + 38 + 14 + 11 п.н.; плазмиды

pCAR1 (980 п.н.): 539 + 246 + 117 + 52 + 14 + 12 п.н. В результате ПЦР с праймерами 4292F и 5292R на матрицах плазмид из коллекции лаборатории получены фрагменты *oriV* (~ 1000 п.н.) всех репликонов, кроме CAP-плазмиды pBS270. Обработка ампликонов эндонуклеазой рестрикции HaeIII привела к появлению рестрикционных профилей трех типов (рис. 2а). По типу I (Rms148) гидролизовался ампликон только Rms148; по типу II (pND6-1) – ампликоны pFME4, pFME5, pAK5, pOS18, pEx4, pS6f; по типу III (pCAR1) – ампликоны pY1-3, pY1-7, pY5-6 (линия pY).

Анализ известных нуклеотидных последовательностей P-7-плазмид выявил прилегающий к *par*-локусу варибельный участок *oriV*. При помощи амплификации и секвенирования этого участка можно уточнить степень гомологии *oriV* плазмид pY1-3, pY1-7, pY5-6 с pCAR1, поскольку до настоящего времени pCAR1 считалась уникальным, филогенетически удаленным от других P-7-плазмид представителем группы. Определение нуклеотидной последовательности 700 п.н.-ампликонов, полученных с использованием праймеров 4210F и ori630R на матрицах плазмид линии pY (п-ов Ямал), не выявило отличий от аналогичного фрагмента pCAR1 (Япония). В случае плазмиды pBS270 невозможность амплификации 4292F-5292R-фрагмента

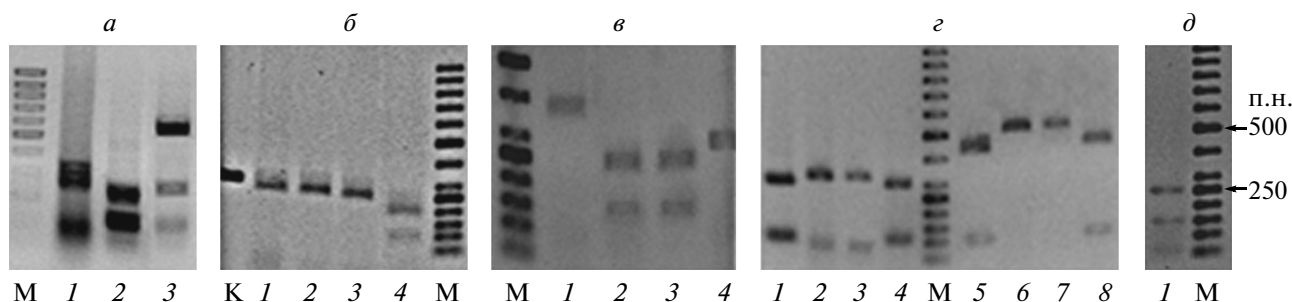


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов рестрикции амплифицированных фрагментов области *oriV* (а) и генов *par*-локуса (б–д) плазмид IncP-7- группы (наиболее репрезентативные примеры). а – ПЦР-фрагменты (4292F-5292R) *oriV* Р-7-репликонов трех типов, обработанные эндонуклеазой HaeIII: 1 – Rms148 (тип I), 2 – pFME5 (тип II), 3 – pY1-3 (тип III). б – ПЦР-фрагменты гена *parW*, обработанные эндонуклеазой RsaI (К – интактный фрагмент pEx4): 1 – pEx4, 2 – pS6f, 3 – Rms148, 4 – pY1-3. в – ПЦР-фрагменты гена *parA* pND6-1-типа, обработанные эндонуклеазой RsaI (1–3), и pCAR1-типа, обработанные HpaII (4): 1 – Rms148, 2 – pEx4, 3 – pS6f, 4 – pY1-3. з – ПЦР-фрагменты гена *parB* pND6-1-типа, обработанные эндонуклеазами HaeIII (1–4) и HpaII (5–8): 1 и 5 – pFME5, 2 и 6 – Rms148, 3 и 7 – pS6f, 4 и 8 – pAK5. д – ПЦР-фрагмент гена *parB* pCAR1-типа, обработанный эндонуклеазой HpaII: 1 – pY1-3. Здесь и на рис. 3 – М – маркер молекулярных масс (DNA ladder 50 bp).

обусловлена или отсутствием сайта связывания дистального по отношению к гену *repA* праймера (4292F), или низкой степенью гомологии последовательностей праймера и pBS270, что менее вероятно. Установлено, что на матрице pBS270 амплифицируется лишь фрагмент размером 1400 п.н., включающий ген *repA* и прилегающую к нему часть *oriV* (примерно до предполагаемого промотора *par*-локуса). Нуклеотидная последовательность этого фрагмента отличается заменой нескольких нуклеотидов от аналогичной области репликонов pND6-1-типа. В состав фрагмента 1400 п.н. не входят все необходимые для инициации репликации элементы [18], однако он содержит семь итеронов – детерминант плазмидной несовместимости. Таким образом, рестрикционный анализ области *oriV* позволяет разделить плазмиды группы IncP-7 на три типа, которые совпадают с подгруппами, предложенными в работе [10]. Исключение, связанное с возможным отсутствием части базового репликона Р-7-группы, представляется CAP-плазмиды pBS270, выделяемая пока в отдельную подгруппу.

Полиморфизм генов *par*-локуса

Поскольку определенные участки *par*-локуса (в частности, “центромера” *parS*) вносят вклад в проявление несовместимости [4], входя в состав консервативного плазмидного “остова”, а гены сегрегационного аппарата *parWABC* обнаружены у всех известных представителей Р-7-группы, было интересно оценить возможность уточнения внутригрупповой классификации на основе полиморфизма этих генов. Мы подобрали праймеры, специфичные к внутренним областям генов *parW* и *parB*. Так как ген *parB* плазмиды pCAR1 всего на 73% идентичен *parB* плазмид pND6-1-подгруппы,

были подобраны праймеры, дифференцирующие эти два типа генов (табл. 2). Две пары праймеров для амплификации разных вариантов гена *parA* (идентичность pCAR1- и pND6-1-типов – 83%), а также единая для всей группы пара олигонуклеотидов, специфичных к гену *parC*, выбраны нами ранее. Результаты амплификации с этими праймерами (кроме ампликонов *parC*) представлены на рис. 3. ПЦР-фрагменты генов *parW* и *parC* получены на всех плазмидных матрицах, кроме pBS270. Следует отметить, что амплифицировать ген *parW* Rms148 удавалось не всегда, что может свидетельствовать о недостаточной специфичности праймеров ParWF и/или ParWR к последовательности этого гена в составе Rms148. Как *parA*, так и *parB* в плаزمиды линии Y амплифицировались только с праймерами, специфичными к соответствующим участкам pCAR1. Интересно, что с помощью праймеров, специфичных к *parA* и *parB* pND6-1-типа, удалось амплифицировать фрагменты этих генов не только на матрицах pFME4, pFME5, pAK5, pOS18, pEx4, pS6f, но и Rms148. Ни один элемент *par*-локуса в плазмиде pBS270 не выявлен.

По аналогии с *oriV* при помощи программы pDRAW32 разработана максимально дифференцирующая тактика рестрикции ПЦР-фрагментов генов *parWAB*. Фрагмент гена *parW* (299 п.н.) плазмид pND6-1-типа гидролизует эндонуклеазой RsaI следующим образом: 258 + 23 + 18 п.н.; pCAR1-типа: 183 + 75 + 23 + 18 п.н. На рис. 2б приведены примеры рестрикции *parW*-ампликонов нескольких плазмид. Типу pND6-1 соответствовали рестрикционные профили плазмид pFME4, pFME5, pAK5, pOS18, pEx4, pS6f и Rms148, а типу pCAR1 – pY1-3, pY1-7, pY5-6. Однако определенная нами нуклеотидная последовательность гена *parW* Rms148 отличается

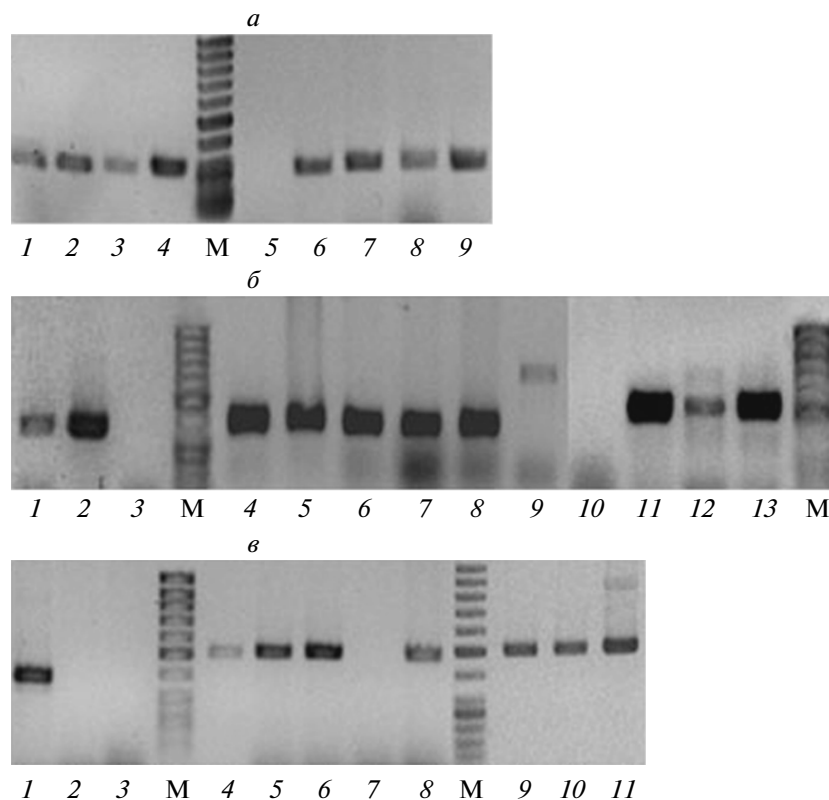


Рис. 3. Электрофореграммы амплифицированных фрагментов генов *par*-локуса плазмид IncP-7-группы. *a* – ПЦР-фрагменты гена *parW* (299 п.н.): 1 – pFME4, 2 – pY1-3, 3 – Rms148, 4 – pFME5, 5 – pBS270, 6 – pOS18, 7 – pAK5, 8 – pS6f, 9 – pEx4. *б* – ПЦР-фрагменты гена *parA* pND6-1-типа (355 п.н., 1–9) и pCAR1-типа (518 п.н., 10–13): 1 – pFME4, 2 – Rms148, 3 – pBS270, 4 – pFME5, 5 – pOS18, 6 – pAK5, 7 – pS6f, 8 – pEx4, 9 – pY1-3, 10 – pBS270, 11 – pY1-3, 12 – pY1-7, 13 – pY5-6. *в* – ПЦР-фрагменты гена *parB* pCAR1-типа (437 п.н., 1–3) и pND6-1-типа (495 п.н., 4–11): 1 – pY1-3, 2 – pBS270, 3 – Rms148, 4 – pFME4, 5 – Rms148, 6 – pFME5, 7 – pBS270, 8 – pOS18, 9 – pAK5, 10 – pS6f, 11 – pEx4.

от последовательностей *parW* pND6-1-типа: в ней отсутствует один сайт узнавания рестриктазы *RsaI* (258 + 41 п.н.), что нельзя заметить на электрофореграмме. Нуклеотидные последовательности гена *parW* Rms148 и плазмид pND6-1-типа идентичны на 87%, Rms148 и pCAR1 – на 82%, а pCAR1 и плазмид pND6-1-типа – на 91%. Таким образом, рестрикционный анализ ParWF-ParWR-фрагмента не позволяет дифференцировать Rms148 и pND6-1-подобные репликоны, хотя нуклеотидные последовательности их *parW* существенно различаются.

Ампликоны гена *parA* pND6-1-типа (355 п.н.) гидролизовались *RsaI* с образованием двух фрагментов (233 + 122 п.н.), ампликон же *parA* Rms148 остался интактным (рис. 2в). Установлено, что нуклеотидная последовательность первой трети *parA* Rms148 на 90–91% идентична соответствующей области плазмид pND6-1-типа и примерно на 71% – pCAR1. Ампликоны *parA* плазмид линии pY (518 п.н.) расщеплялись ферментом *HpaII* на два фрагмента, соответствующих по размеру виртуальным фрагментам рестрикции аналогичного участка pCAR1: 255 + 263 п.н.

Амплифицированные фрагменты гена *parB* pND6-1-типа (495 п.н.) обрабатывали двумя эндонуклеазами (независимо) – *HaeIII* и *HpaII* (рис. 2з). Рестрикционные профили, полученные с помощью *HpaII*, точнее отражают полиморфизм *parB* даже в пределах pND6-1-кластера. Выявлено, что ампликоны всех плазмид этого кластера, кроме pS6f, гидролизуются *HpaII* с образованием фрагментов размером 419 и 76 п.н. Ампликон *parB* плазмиды pS6f этим ферментом не расщеплялся, подобно ампликону на основе Rms148. Аналогичные различия наблюдали и при обработке ПЦР-фрагментов *parB* *HaeIII*. Ампликоны гена *parB* плазмид линии pY (437 п.н.) гидролизовались эндонуклеазой *HpaII* на три фрагмента (рис. 2д), соответствующих по размеру виртуальным фрагментам аналогичного участка pCAR1: 238 + 114 + 85 п.н.

Интересно, что *par*-локусы Rms148 и репликонов pND6-1-кластера филогенетически ближе друг другу, чем *par*-локусы Rms148 и pCAR1 или pND6-1 и pCAR1. Однако ген *parW* pCAR1 в большей степени (91% идентичности), чем *parW* Rms148 (87% идентичности), подобен соответствующему гену pND6-1-типа. С одной стороны,

это может свидетельствовать о независимом приобретении минимальными Р-7-репликонами уже немного дивергировавших от общего “предкового” варианта модулей *parW* и *parAB*, а с другой, о различной “нуклеотидной адаптации” (амелиорации) этих модулей к генетическому окружению бактерии-хозяина. Ведь основная функция продуктов генов *parAB* – специфическое взаимодействие с определенными участками копий своей плазмидной ДНК для обеспечения их активной сегрегации, в то время как продукт гена *parW*, судя по предсказанной вторичной структуре, – мембранный сегрегационный белок, который, вероятно, должен теснее взаимодействовать с бактериальными клеточными структурами, чем комплекс *ParAB*. Исходными хозяевами плазмиды резистентности к стрептомицину Rms148 являются клинические штаммы *P. aeruginosa* [19], а плазмид биodeградации Р-7-группы – почвенные и водные штаммы псевдомонад, филогенетически удаленные от *P. aeruginosa*, поэтому нуклеотидная дивергенция *parW* могла бы коррелировать с различиями в круге исторических хозяев Р-7-плазмид, тем более что участок *parW*, кодирующий трансмембранный домен (12–29 N-концевых аминокислотных остатков), один из самых вариабельных. Примечательно в этом отношении и различие трансляционных стоп-кодонах у трех типов *parW* (UAA – у подгруппы pND6-1, UGA – у pCAR1, UAG – у Rms148), в то время как стоп-кодонах у остальных генов *par*-локусов всех типов – UGA.

В целом, результаты ПЦР-анализа *par*-локуса, дополненного рестрикцией и секвенированием (в сомнительных случаях), подтверждают основанное на полиморфизме минимального репликона разделение плазмид группы IncP-7 на четыре подгруппы (pBS270 выделена в отдельную подгруппу из-за отрицательных результатов ПЦР с праймерами, специфичными к *par*-генам и прилегающей к ним части *oriV*).

Минимальные репликоны pCAR1-типа быстрее элиминируются из популяции псевдомонад, чем минимальные репликоны других типов

Анализ минимальных репликонов (*repA-oriV*, лигированных с селективным маркером) плазмид pCAR1 и Rms148 [10, 18] показал, что для их репликации в клетках псевдомонад не требуются дополнительные гены и участки плазмиды, однако для стабильного поддержания необходима экспрессия генов *par*-локуса [18]. Ранее был получен минимальный репликон плазмиды биodeградации нафталина pFME5, и показано, что из популяции *P. aureofaciens* BS1393 он полностью элиминируется на несколько суток позже, чем минимальный репликон pCAR1 из *P. putida* DS1 (Волкова О.В. и др., в печати). Однако в работах по изучению плазмид pFME5 и pCAR1 использо-

вали разных хозяев, разные селективные маркеры и нельзя было утверждать, что такое различие связано со структурой и свойствами самих репликонов. Обнаружение pCAR1-подобных плазмид (линия pY) позволило стандартизировать условия эксперимента. Мы оценили стабильность поддержания в *P. aureofaciens* BS1393 областей *repA-oriV* плазмид Rms148 и pY1-3 в течение 6 сут в неселективных условиях и сравнили с соответствующей диаграммой минимального репликона pFME5 (рис. 4). Как и следовало ожидать, из-за отсутствия *par*-локуса все репликоны постепенно утрачивались из популяции бактерий, однако элиминация *repA-oriV* pY1-3 протекала интенсивнее. Не выявлено значимых различий в скорости утраты минимальных репликонов Rms148 и pFME5. Возможно, структура области инициации репликации, характерная для плазмид pCAR1-типа, не в состоянии обеспечить эффективное взаимодействие с какими-то хозяйскими факторами, способными хотя бы частично компенсировать отсутствие собственного *par*-локуса. Интересно, что у всех плазмид линии pY, как и у pCAR1, в участке *oriV*, прилегающем к гену *parW* и включающем первую AT-богатую область, обнаружена делеция фрагмента из 18 п.н. (по сравнению с репликонами других типов). Нельзя исключить и различий в копийности полученных минимальных репликонов.

IncP-7-репликоны образуют четыре подгруппы, не отражающие принцип одна подгруппа – один кодируемый фенотип

Результаты ПЦР и рестрикционного анализа, а в некоторых случаях и секвенирования элементов базового репликона, позволили разделить плазмиды группы несовместимости Р-7 на четыре кластера (подгруппы): Rms148, репликоны pND6-1-типа, репликоны pCAR1-типа, pBS270. В системе классификации IncP подгруппы принято обозначать буквами греческого алфавита, поэтому приведенные выше кластеры следует называть подгруппами α , β , γ , δ соответственно. Подгруппа α представлена единственной в группе плазмидой антибиотико-резистентности Rms148 (Р-7-архетип). В подгруппу β включено большинство Р-7-плазмид биodeградации: pND6-1, pWW53, pL6.5, pDK1, pOS18, pAK5, pFME4, pFME5, pEx4, pS6f. Это самая крупная подгруппа, но нуклеотидные последовательности базовых репликонов ее представителей высококонсервативны, за исключением разницы в числе палиндромов сайта *parS* [20] и полиморфизма гена *parB* (рестрикционный профиль ампликона *parB* плазмиды pS6f напоминает профиль Rms148). К подгруппе γ отнесены плазмиды pCAR1, pY1-3, pY1-7, pY5-6. По каким-то причинам в неселективных условиях минимальные репликоны (*repA-oriV*) этого типа утрачиваются из

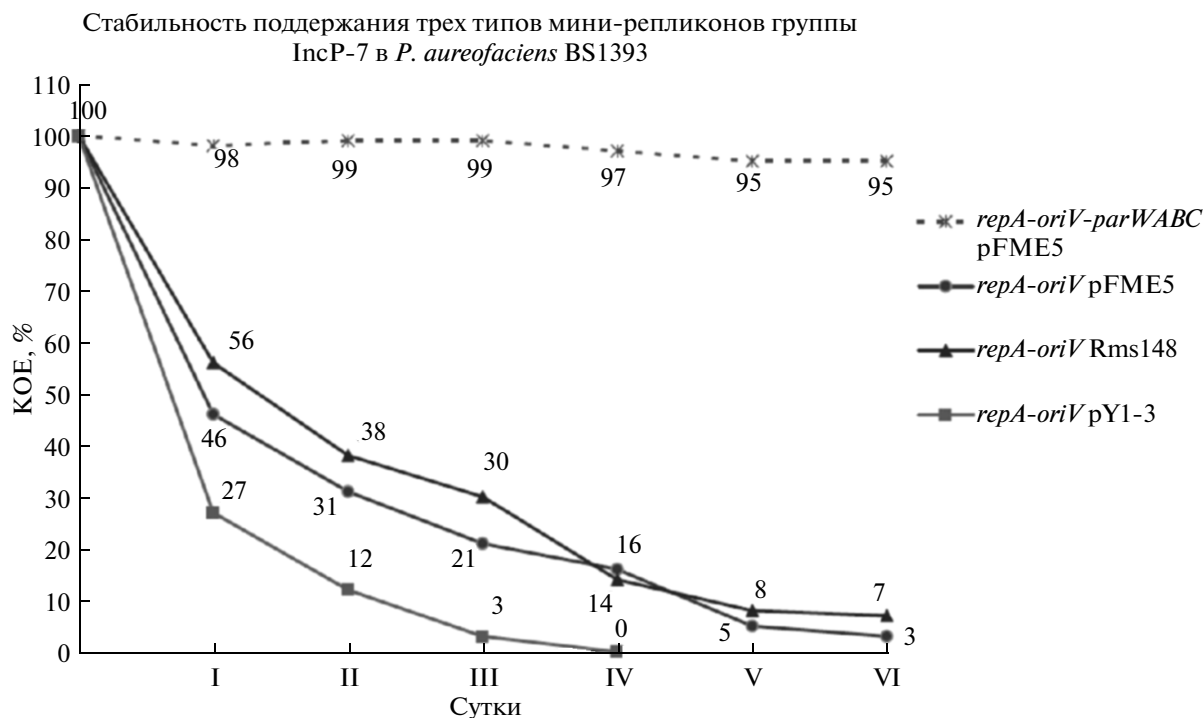


Рис. 4. Стабильность поддержания минимальных репликонов (областей *repA-oriV*) плазмид pFME5, Rms148, pY1-3 – представителей разных филогенетических кластеров группы IncP-7. Вариант *repA-oriV-parWABC* pFME5mini приведен для сравнения, как содержащий стабилизирующий локус (*par*).

популяции псевдомонад интенсивнее репликонов подгрупп α и β . В условную подгруппу δ выделена плазида биodeградации капролактама/салицилата pBS270. Вероятно, она содержит редуцированный P-7-репликон, вряд ли способный обеспечивать автономное поддержание этой плазмиды, но проявляющий несовместимость с другими плазмидами группы IncP-7 [11]. Не исключено и рекомбинационное включение в минимальный P-7-репликон pBS270 системы сегрегации (с промоторно-операторной областью) другого типа. Так или иначе, pBS270 стабильно наследуется в клетках псевдомонад. Недавно в составе этой плазмиды мы обнаружили область инициации репликации, негомологичную минимальным репликонам IncP-7-группы (не опубликовано). Связана ли с этой областью какая-либо система сегрегации – пока не известно. Более того, слабое проявление несовместимости pBS270 с плазмидами группы IncP-9 [11] может указывать и на присутствие (возможно, частичное) третьего репликона в составе pBS270, гомологичного P-9-плазмидам (не определяется ПЦР со стандартными праймерами на *rep-ori* IncP-9).

В целом, базовые репликоны известных P-7-плазмид, несмотря на обширную географию мест выделения, консервативны. Дивергенция нуклеотидных последовательностей гена *repA* между подгруппами составляет всего 7–8%

(у P-9-группы – 8–26%), области *oriV* – 24–27% (у P-9-группы – 7–36%). Это не удивительно, если принять во внимание узкий круг хозяев плазмид IncP-7-группы, ограниченный представителями рода *Pseudomonas* и, в крайнем случае, близкородственными ему бактериями. Однако полиморфизм целых плазмид этой группы очень высок [9], что может быть связано с большим числом инсерционных последовательностей и их остатков, локализованных в различных участках плазмидного “остова” (в том числе, в районе гена *repB*), а также с высокой частотой событий рекомбинации между P-7-репликонами и репликонами других типов (пример – pBS270).

Для группы IncP-7 характерно отсутствие корреляции между структурой базовых репликонов плазмид, входящих в одну подгруппу, и фенотипическими признаками, кодируемыми этими плазмидами. В случае группы IncP-9 в одну подгруппу попадают, например, плазмиды биodeградации капролактама, в другую – нафталина, в третью – плазмиды антибиотикорезистентности (единственное исключение – β -подгруппа, включающая TOL- и NAH-плазмиды) [8]. Для большинства плазмид P-7-группы такой корреляции не обнаружено: признаки биodeградации нафталина и салицилата кодируются плазмидами как β -(pND6-1, pOS18, pAK5, pFME4, pFME5), так и γ -подгрупп (pY1-3, pY1-7, pY5-6); к β -подгруп-

пе относятся также TOL-(pWW53, pL6.5, pDK1) и CAP/SAL-плазмиды (pEx4, pS6f), а к γ -подгруппе – плазида биodeградации карбазола/дioxина – pCAR1. Трудно судить об исключительности подгруппы α в этом отношении, так как не обнаружены аналоги базового репликаона Rms148, а другие R-плазмиды группы IncP-7 для изучения недоступны.

Таким образом, при помощи ПЦР, рестрикции и избирательного секвенирования впервые изучено структурное разнообразие базовых репликаонов и гена *repB* в большой выборке IncP-7-плазмид. Оценка полиморфизма базовых репликаонов плазмид из коллекции лаборатории и репликаонов из базы данных GenBank позволила предложить первую внутригрупповую систему классификации P-7-плазмид, составные части которой (четыре подгруппы) выделены с учетом дивергенции нуклеотидных последовательностей как области *repA-oriV*, так и *par*-локуса. В отличие от плазмид группы несовместимости P-9, тип организации IncP-7-базового репликаона в большинстве случаев не связан с определенным фенотипическим признаком, детерминируемым плазмидой. Подобранные в работе праймеры можно использовать для обнаружения и классификации новых плазмид группы IncP-7.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-90041-Бел_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Strateva T., Yordanov D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1133–1148.
2. Top E.M., Moenne-Loccoz Y., Pembroke T., Thomas C.M. 2000. Phenotypic traits conferred by plasmids. In: *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*. Ed. Thomas C.M. Amsterdam: Harwood Acad. Publ., 246–285.
3. Boronin A.M. 1992. Diversity of *Pseudomonas* plasmids: To what extent? *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 461–467.
4. Novick R.P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381–395.
5. Adamczyk M., Jagura-Burdzy G. 2003. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochimica Polonica.* **50**, 425–453.
6. Norberg P., Bergstrom M., Jethava V., Dubhashi D., Hermansson M. 2011. The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. *Nat. Commun.* **2**, 268. Epub. (www.nature.com/ncomms/journal/v2/n4/full/ncomms1267.html)
7. Izmailkova 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.
8. Sevastyanovich Y.R., Krasowiak R., Bingle L.E.H., Haines A.S., Sokolov S.L., Kosheleva I.A., Leuchuk A.A., Titok M.A., Smalla K., Thomas C.M. 2008. Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas*. *Microbiology.* **154**, 2929–2941.
9. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. 2005. Плазмиды биodeградации нафталина и салицилата P-7 группы несовместимости в штаммах флуоресцирующих псевдомонад. *Микробиология.* **74**, 1–7.
10. 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.* **46**, 605–611.
11. Есикова Т.З., Грищенко В.Г., Боронин А.М. 1990. Плазмиды биodeградации ϵ -капролактама. *Микробиология.* **4**, 547–552.
12. Sambrook J., Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
13. Greated A., Thomas C.M. 1999. A pair of PCR primers for IncP-9 plasmids. *Microbiology (UK).* **145**, 3003–3004.
14. Kumari A., Minko I.G., Smith R.L., Lloyd R.S., McCullough A.K. 2010. Modulation of UvrD helicase activity by covalent DNA-protein cross-links. *J. Biol. Chem.* **285**, 21313–21322.
15. Yamaguchi M., Dao V., Modrich P. 1998. MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **273**, 9197–9201.
16. Veaute X., Delmas S., Selva M., Jeusset J., Le Cam E., Matic I., Fabre F., Petit M.-A. 2005. UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **24**, 180–189.
17. Neylon C., Kralicek A.V., Hill T.M., Dixon N.E. 2005. Replication termination in *Escherichia coli*: structure and antihelicase activity of the Tus-Ter complex. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 501–526.
18. Shintani M., Yano H., Habe H., Omori T., Yamane H., Tsuda M., Nojiri H. 2006. Characterization of the replication, maintenance, and transfer features of the IncP-7 plasmid pCAR1, which carries genes involved in carbazole and dioxin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3206–3216.
19. Sagai H., Hasuda K., Iyobe S., Bryan L.E., Holloway B.W., Mitsuhashi S. 1976. Classification of R plasmids by incompatibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**, 573–578.
20. Yano H., Miyakoshi M., Ohshima K., Tabata M., Nagata Y., Hattori M., Tsuda M. 2010. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J. Bacteriol.* **192**, 4337–4347.