

## НОВЫЙ ГЕН ИНИЦИАТОРА РЕПЛИКАЦИИ TrfA-ТИПА ОБНАРУЖЕН В СОСТАВЕ ПЛАЗМИДЫ БИОДЕГРАДАЦИИ КАПРОЛАКТАМА/САЛИЦИЛАТА pBS270

© 2013 г. О. В. Волкова<sup>1\*</sup>, А. В. Панов<sup>1</sup>, И. А. Кошелева<sup>1, 2</sup>, Т. З. Есикова<sup>1</sup>, А. М. Боронин<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина  
Российской академии наук, Пущино, Московская область, 142290

<sup>2</sup>Пушинский государственный естественнонаучный институт, Пущино, Московская область, 142290

Поступила в редакцию 16.10.2012 г.

Принята к печати 29.10.2012 г.

Получен мини-репликон плазмиды биodeградации капролактама/салицилата pBS270 (105 т.п.н.), выделенной из бактерий рода *Pseudomonas* и несущей детерминанты несовместимости группы P-7. Определена нуклеотидная последовательность pBS270mini. В составе репликона обнаружен новый ген инициатора репликации TrfA-типа, уровень гомологии которого с известными белками семейства позволяет классифицировать репликон как IncP-1-подобный. Выявлена химерная природа pBS270mini.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas*, плаزمида pBS270, мини-репликон, нуклеотидная последовательность, ген *trfA*, группы несовместимости.

THE NEW GENE ENCODING TrfA-TYPE REPLICATION INITIATOR HAS BEEN FOUND ON CAPROLACTAM/SALICYLATE DEGRADATION PLASMID pBS270, by O. V. Volkova<sup>1\*</sup>, A. V. Panov<sup>1</sup>, I. A. Kosheleva<sup>1, 2</sup>, T. Z. Esikova<sup>1</sup>, A. M. Boronin<sup>1, 2</sup> (<sup>1</sup>Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; \*e-mail: volkova\_o\_v@inbox.ru; <sup>2</sup>Pushchino Educational Institute of Natural Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia). The mini-replicon of pseudomonads' caprolactam/salicylate degradation plasmid pBS270 (105 kb, contains incompatibility determinants of P-7 group) has been obtained and its nucleotide sequence has been determined. The new gene encoding TrfA-like replication initiator has been found on this replicon. Poor homology of this replication initiator with known proteins of TrfA-family allows us to classify obtained replicon as IncP-1-like. The pBS270mini reveals chimeric nature.

**Keywords:** *Pseudomonas*, plasmid pBS270, mini-replicon, nucleotide sequence, *trfA* gene, IncP groups.

DOI: 10.7868/S0026898413020171

Способность бактерий рода *Pseudomonas* утилизировать различные органические субстраты, в том числе углеводороды нефти и ксенобиотики, часто определяется D-плазмидами (плазмидами биodeградации). В отличие от ряда плазмид биodeградации нафталина и толуола структура внехромосомных элементов, кодирующих ферменты катаболизма капролактама, не охарактеризована. Не изучены и области, ответственные за репликацию (*rep-ori*) и стабильное поддержание (*par*), а, следовательно, и за проявление несовместимости, большинства известных CAP-плазмид. Сотрудни-

ками лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН при помощи микробиологического теста на несовместимость установлено, что выделенные из псевдомонад CAP-плазмиды (75–450 т.п.н., конъюгативные) относятся к группам IncP-2, IncP-7 и IncP-9 [1].

Принадлежность трех CAP-плазмид к группе P-9, в которой эти репликоны сформировали отдельную подгруппу –  $\gamma$ , подтверждена молекулярно-генетическими методами [2].

CAP-плазмида pBS270 (хозяин – штамм *Pseudomonas* sp. BS838, выделенный из почв, за-

Принятые сокращения: CAP/SAL-плазмиды – плазмиды биodeградации  $\epsilon$ -капролактама и салицилата; OPC – открытая рамка считывания; ГО – геномный остров.

\* Эл. почта: volkova\_o\_v@inbox.ru

грязненных стоками предприятия по производству капролактама, г. Кемерово) проявляет слабо выраженную несовместимость с репликонами групп IncP-9 и IncP-7 [1] и, как установлено недавно, несет гены биodeградации не только капролактама, но и салицилата. При помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) детерминанты несовместимости P-9-репликона в составе pBS270 выявить не удалось. Был обнаружен IncP-7-минимальный репликон, представленный геном инициатора репликации *repA* и частью области начала репликации *oriV*. Однако не удалось амплифицировать участок *oriV*, прилегающий к *par*-локусу и необходимый, согласно [3], для инициации репликации, а также элементы самого IncP-7-*par*-локуса (Волкова О.В. и др., принята к печати), хотя плаزمида pBS270 в псевдомонадах наследуется стабильно. Поэтому вопрос о функциональной активности P-7-репликона остался открытым.

Цель данной работы состояла в выявлении функционирующего мини-репликона плазмиды pBS270 и его структурном анализе.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объекты исследования.** В работе использовали: *Pseudomonas putida* KT2442 (pBS270) – для выделения плазмиды pBS270; *P. putida* BS394, *P. aureofaciens* BS1393, *P. fluorescens* 38a, *P. aeruginosa* ВКМ В588, *Comamonas acidovorans* В-1251, *Escherichia coli* K-12 DH5 $\alpha$  – бесплазмидные реципиенты для оценки круга хозяев и стабильности поддержания pBS270mini. Бактерии выращивали в среде LB [4] при 28°C (*E. coli* – при 37°C). Для селекции мини-репликона в штаммах родов *Pseudomonas* и *Comamonas* добавляли тетрациклин (Тс) до достижения конечной концентрации 30 мкг/мл, в *E. coli* – 10 мкг/мл.

**Плазмиду pBS270 выделяли** методом щелочно-го лизиса [4], ее мини-репликон – при помощи набора “ZR Plasmid Miniprep<sup>TM</sup>-Classic” (“Zymo Research”, США).

**ПЦР и визуализацию ДНК, рестрикцию, лигирование, клонирование** мини-репликона в вектор pUC19 для секвенирования осуществляли стандартными методами [4], используя ферменты производства “Fermentas” (Литва). ДНК выделяли из геля при помощи “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit” (“Zymo Research”).

**ДНК секвенировали** на автоматическом секвенаторе ДНК ABI Prism 373 3130XL Genetic Analyser (“Perkin-Elmer”) в компании “Синтол” (Москва). Нуклеотидные и вычисленные аминокислотные последовательности анализирова-

ли при помощи пакета программ DNASTar, pDRAW32 (“ACACLONE software”) и доступных on-line NCBI BLASTN и BLASTP. Филогенетическое дерево строили, используя программы CLUSTAL X и TREECON [5].

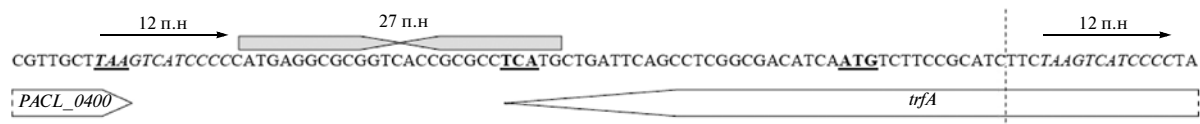
**Ограничение области pBS270, способной к автономной репликации** (мини-репликон), проводили при помощи эндонуклеаз рестрикции BamHI, HindIII, SalI и PstI. Смесь фрагментов лигировали с селективным маркером – кассетой устойчивости к Тс из вектора p34S-Тс. Клетки *Comamonas* трансформировали так же, как и *Pseudomonas* [6], *E. coli* трансформировали стандартным способом [4].

**Стабильность поддержания pBS270mini** определяли путем последовательных пересевов в жидкой среде LB без Тс в течение 6 сут, пробы отбирали ежедневно. После серии разведений культуру высевали на чашки с LB-агаром, по 100 сформированных колоний переносили на LB-агар с Тс. Стабильность плазмиды определяли как процентное соотношение числа клонов, сохранивших устойчивость к тетрациклину, к общему числу проверенных клонов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Попытки ограничения мини-репликона pBS270 с использованием различных эндонуклеаз приводили к получению в *P. putida* BS394 конструкций, не содержащих маркеров IncP-7-репликона (гена *repA* и разных участков *oriV*). Для изучения был отобран наименьший фрагмент (4.3 т.п.н.), ограниченный эндонуклеазой PstI и способный к автономной репликации во всех использованных штаммах *Pseudomonas*. Трансформация штаммов *E. coli* и *C. acidovorans* мини-репликоном, названным pBS270mini, не привела к формированию колоний, что указывает на узкий круг хозяев этого репликона или же на отсутствие в его составе областей, необходимых для репликации в таксономических группах, отличных от рода *Pseudomonas*. Следует отметить, что pBS270mini поддерживался в псевдомонадах нестабильно, полностью элиминируясь из бактериальной популяции в течение 4–6 сут (в зависимости от штамма), что свидетельствует об отсутствии или ненадлежащем функционировании плазмидных систем стабилизации в составе pBS270mini.

Полная нуклеотидная последовательность pBS270mini (4290 п.н.) депонирована нами в GenBank под номером JX840344. Анализ последовательности с использованием программы pDRAW32 выявил три ОРС, две из которых были неполными. Вычисленная аминокислотная последовательность ОРС1 (138 С-концевых остатков) оказалась



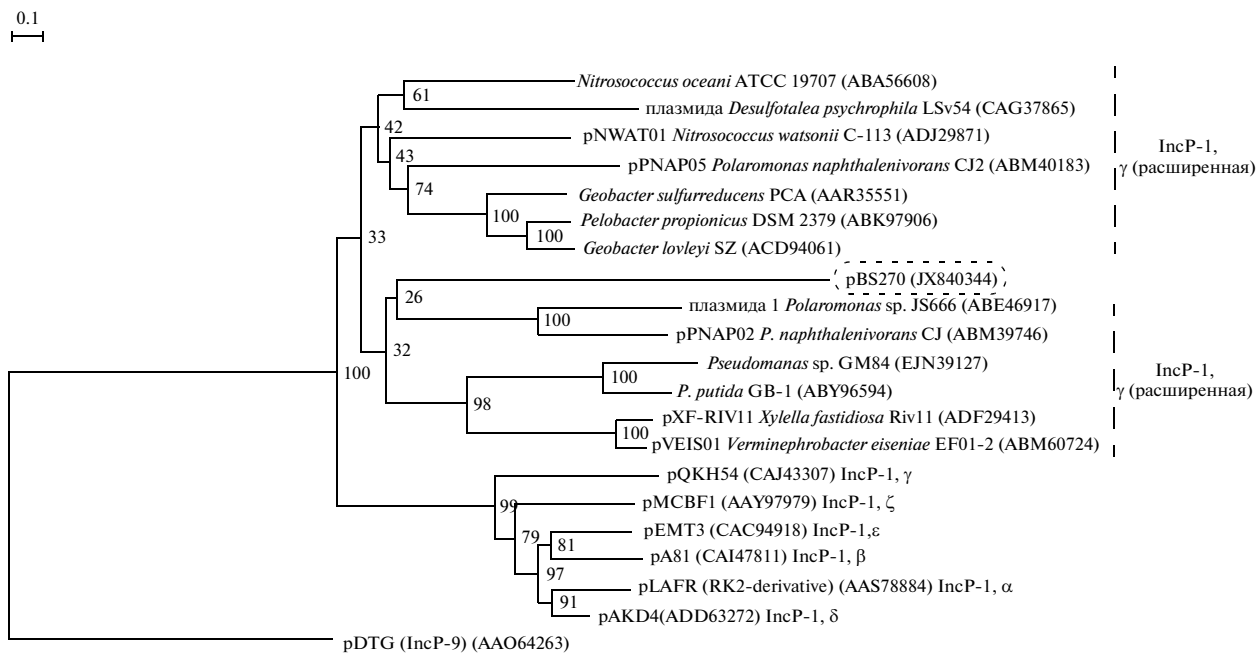
**Рис. 1.** Химерная область в составе репликона rBS270mini. Слева от пунктирной линии – последовательность, гомологичная геномным островам *P. aeruginosa*; справа – уникальная последовательность rBS270. Выделены жирным и подчеркнуты: TAA – стоп-кодон OPC1, гомологичной PACL\_0400 геномных островов; ATG – иницирующий кодон PACL\_0399 (*terD*) геномных островов (у rBS270mini OPC неполноценна из-за химерной природы); TCA – триплет, комплементарный стоп-кодону гена *trfA* (OPC2). Выделены курсивом и отмечены верхней стрелкой прямые повторы, на 100% идентичные в двух локусах различной природы; встречными тонированными стрелками обозначен совершенный палиндром, отличающийся 1–2 н. от палиндромов геномных островов.

на 93% идентичной продукту гена *PACL\_0400* геномного острова (ГО) *P. aeruginosa* PACS171b (GenBank асс.но ACD39188), а также продуктам генов, гомологичных *PACL\_0400*, из ГО других патогенных штаммов/изолятов *P. aeruginosa* (SIG1, C79, 37308). Существенно меньшей была идентичность продукта OPC1 гипотетическому белку, кодируемому хромосомой *P. putida* ND6 (содержит IncP-7-плазмиду биodeградации нафталина pND6-1), – 51%. “Ниже” *PACL\_0400* у всех ГО находится ген (*PACL\_0399* у PACS171b), кодирующий TerD-подобный белок (стрессовый белок/белок устойчивости к теллуру). В составе rBS270mini обнаружен только короткий 5'-концевой фрагмент этого гена, после чего нуклеотидная последовательность мини-репликона утрачивает гомологию с ГО (рис. 1). В непосредственной близости к этой области обнаружены совершенный палиндром и прямые повторы, которые могут быть связаны с рекомбинационными событиями или служить регуляторными элементами.

OPC2 представляет особый интерес, во-первых, потому что она, вероятно, имеет химерную природу (3'-концевая часть локализована в пределах фрагмента rBS270mini, гомологичного ГО *P. aeruginosa*, рис. 1); во-вторых, она кодирует белок TrfA-типа (363 аминокислотных остатка), родственной инициаторам репликации плазмид группы IncP-1. Участие продукта именно этого гена в инициации репликации rBS270mini подтвердили при помощи опосредованной MfeI делеции 161 п.н. в центральной части OPC2 (*trfA*). TrfA-белок rBS270mini при 28–80%-ном перекрывании аминокислотных последовательностей всего на 24–33% идентичен известным белкам семейства TrfA. Ближайшие “соседи” TrfA rBS270mini на филогенетическом древе – белки плазмид (а также продукты генов, “заякоренных” в некоторых протеобактериальных хромосомах), отнесенных [7] к расширенной  $\gamma$ -подгруппе IncP-1 (рис. 2).

Однако существенная дивергенция между плазмидами этой подгруппы и “классическими” представителями IncP-1 выявляется не только при сравнении их инициаторов репликации (представленное древо), но и при анализе структуры и особенностей репликации плазмид rXF-RIV11 и rVEIS01, относящихся к расширенной  $\gamma$ -подгруппе [8, 9]. Прежде всего, у этих плазмид отсутствуют полноценные системы активной сегрегации, характерные для P-1-плазмид, а стабильное наследование обеспечивается только за счет *pemI/pemK*-модулей (система токсинов/антитоксинов). Кроме того, круг хозяев у этих плазмид (особенно, у rVEIS01) уже, чем у большинства представителей “классических” подгрупп P-1. Более того, для инициации репликации мини-rXF-RIV11 в некоторых хозяевах требовалась еще и полноценная OPC, расположенная “выше” гена *trfA* и кодирующая резольвазу (сериновую рекомбиназу). Интересно, что OPC3 (неполная) плазмиды rBS270mini также кодирует рекомбиназу, но тирозиновую. Вычисленная аминокислотная последовательность OPC3 (209 С-концевых остатков) оказалась на 58–62% идентичной сайт-специфическим рекомбиназам XerD-типа (семейство фаговых интеграз) нескольких штаммов псевдомонад, в том числе *P. putida* ND6 (GenBank асс.но. AFK72703), а также интегразе, кодируемой мега-плазмидой rQBR103 (IncP-3) *P. fluorescens* SBW25 (CAM96137). Не исключено, что присутствие целой OPC3 в составе rBS270mini могло бы повлиять на круг хозяев репликона или на показатели его стабильности.

Точный *ori* репликации rBS270mini пока не установлен, но вероятнее всего он локализован между *trfA* и OPC3 (“выше” *trfA*, что нетипично для плазмид IncP-1), поскольку в этой области обнаружены потенциальные регуляторные элементы – четыре пары инвертированных повторов (22, 20, 18 и 17 п.н.) и небольшой совершенный палиндром (14 п.н.). Инвертированные повторы и палиндро-



**Рис. 2.** Дендрограмма, иллюстрирующая эволюционные взаимоотношения между аминокислотными последовательностями белков TrfA-семейства, кодируемых “классическими” плазмидами группы IncP-1 (подгруппы α, β, γ, δ, ε, ζ), представителями расширенной подгруппы γ и CAP/SAL-плазмидой pBS270. Указано только название штамма, если TrfA-белок кодируется хромосомой (или не установлена плазмидная локализация гена). Последовательность Rep-белка pDTG1 (IncP-9) использована для укоренения. В скобках указаны номера, под которыми последовательности депонированы в GenBank. Дерево построено в программе TREECON с помощью метода ближайших соседей (Neighbour-Joining) и бутстрэп-анализа.

мы найдены и в *oriV* pXF-RIV11, однако они негомологичны элементам в составе pBS270mini. Прямые повторы (сайты связывания TrfA), гомологичные итеронам IncP-1-плазмид, у pBS270mini выявить не удалось, за исключением неповторяющейся последовательности TTACCGTGGCAAT-ΔGGTT, где подчеркнутые нуклеотиды совпадают с консенсусом итеронов pXF-RIV11.

Поскольку представители расширенной подгруппы γ филогенетически удалены от “классических” IncP-1-плазмид, а TrfA pBS270mini проявляет низкую гомологию с инициаторами репликации даже этой полиморфной подгруппы (эволюционная дистанция отражена и на филогенетическом древе), а также учитывая отсутствие гомологии *oriV* и абсолютную совместимость плазмид pBS270 и RP4 (IncP-1, α) [1], корректнее будет классифицировать обнаруженный в составе плазмиды pBS270 *trfA*-содержащий репликон только как IncP-1-подобный. Системы, обеспечивающие стабильное поддержание pBS270, пока не установлены, ясно только, что это не ParWABC группы IncP-7. Выявление этих систем позволило бы уточнить положение плазмиды pBS270 в системе классификации IncP. Тем не менее, анализ областей инициации репликации в составе CAP/SAL-плазмиды

pBS270 позволил не только обнаружить новый ген инициатора репликации TrfA-семейства, но и выявить сложный эволюционный путь плазмиды, насыщенный событиями горизонтального генетического переноса между различными генетическими элементами (как минимум, плазмидой IncP-7-группы, носителем IncP-1-подобного репликона (плазмида/хромосома) и ГО *P. aeruginosa*.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (12-04-90041-Бел\_a).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Есикова Т.З., Грищенко В.Г., Кулаков Л.А., Моренкова М.А., Боронин А.М. 1990. Группы несовместимости плазмид биodeградации ε-капролактама бактерий рода *Pseudomonas*. *Молекул. генетика, микробиол. вирусол.* **4**, 25–28.
2. 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.
3. 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.
4. Sambrook J., Russel D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
  5. 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. Appl. Biosci.* **10**, 569–570.
  6. 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.
  7. Stenger D.C., Lee M.W. 2011. Phylogeny of replication initiator protein TrfA reveals a highly divergent clade of incompatibility group P1 plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2522–2526.
  8. Stenger D.C., Lee M.W., Rogers E.E., Chen J. 2010. Plasmids of *Xylella fastidiosa* mulberry-infecting strains share extensive sequence identity and gene complement with pVEIS01 from the earthworm symbiont *Verminephrobacter eiseniae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **74**, 238–245.
  9. Lee M.W., Rogers E.E., Stenger D.C. 2010. Functional characterization of replication and stability factors of an incompatibility group P-1 plasmid from *Xylella fastidiosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7734–7740.

---

Сдано в набор 3.12.2012 г.	Подписано к печати 15.02.2013 г.	Формат бумаги 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>		
Цифровая печать	Усл. печ. л. 22.0 + 3 цв. вкл.	Усл. кр.-отт. 2.9 тыс.	Уч.-изд. л. 22.0	Бум. л. 11.0
	Тираж 129 экз.	Зак. 1035		

---

Учредители: Российская академия наук, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

---

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90  
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”  
Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6

---