

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 576.851.132

СТРУКТУРА ОБЛАСТИ ИНИЦИАЦИИ РЕПЛИКАЦИИ ПЛАЗМИДЫ Rms148 (IncP-7), ДЕТЕРМИНИРУЮЩЕЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *Pseudomonas* К СТРЕПТОМИЦИНУ

© 2012 г. О. В. Волкова^{1,2*}, И. А. Кошелева^{1,2}, А. М. Боронин^{1,2}

¹Пушкинский государственный университет, Пушкино, Московская обл., 142290

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук, Пушкино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 26.10.2011 г.

Принята к печати 22.11.2011 г.

Плазмиды псевдомонад группы несовместимости P-7 вносят существенный вклад в биodeградативный потенциал окружающей среды, но могут быть и носителями генов антибиотикорезистентности. Плазмида резистентности Rms148 более 30 лет служит архетипом группы IncP-7 в классических тестах на несовместимость, однако до сих пор не описана структура ее базового репликона, не изучены и филогенетические взаимоотношения известных IncP-7-плазмид внутри группы. С помощью разработанных нами праймеров для амплификации основных компонентов области инициации репликации P-7-плазмид проведен анализ полиморфизма гена *repA* нескольких плазмид данной группы. Сконструирован минимальный репликон плазмиды Rms148 и определена его нуклеотидная последовательность, которая оказалась на 81–83% идентичной области *repA-oriV* известных IncP-7-репликонов и формирует отдельную ветвь на филогенетическом древе участков инициации репликации плазмид этой группы. Кроме того, нуклеотидная последовательность гена *repA* выглядит более консервативной по сравнению с *oriV* плазмид данной группы. Вычисленная аминокислотная последовательность и предсказанные вторичная и третичная структуры белка RepA Rms148 позволяют предположить, что инициация репликации у представителей P-7-группы несовместимости происходит в соответствии с моделью, описанной для неклассифицированной криптической плазмиды pPS10.

Ключевые слова: плазмида Rms148, *Pseudomonas*, IncP-7-группа, область инициации репликации, *repA*, нуклеотидная последовательность, филогенетический анализ.

THE STRUCTURE OF REPLICATION INITIATION REGION OF *Pseudomonas* IncP-7 STREPTOMYCIN RESISTANCE PLASMID Rms148, by O. V. Volkova^{1, 2*}, I. A. Kosheleva^{1, 2}, A. M. Boronin^{1, 2} (¹Pushchino State University, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; *e-mail: volkova_o_v@inbox.ru; ²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia). Pseudomonads' IncP-7 plasmids make significant contribution to the environmental biodegradative potential and sometimes harbour antibiotic resistance genes. More than 30 years plasmid Rms148 is used as archetypal P-7 plasmid in microbiological incompatibility tests. However, the structure of its basic replicon was not described up to now, as well as phylogenetic relationships between all known plasmids within the IncP-7 group were not studied. In the frames of this work we have constructed two primer pairs to amplify main components of P-7 replication initiation region, and subsequent screening of *repA* intragenic polymorphism was made using laboratory collection of IncP-7 plasmids. Minimal replicon of Rms148 was constructed and its nucleotide sequence was determined to be identical to *repA-oriV* of known P-7 plasmids on 81–83% and forming separate branch on appropriate phylogenetic tree. Additionally, *repA* seems to be more conservative between group members compared with putative *oriV* region. Deduced amino acid sequence and predicted secondary and tertiary structures of Rms148 RepA protein allow us to make assumption about similar to unclassified cryptic plasmid pPS10 model of replication initiation for IncP-7 group members.

Keywords: plasmid Rms148, *Pseudomonas*, IncP-7 group, replication initiation region, *repA*, nucleotide sequence, phylogenetic analysis.

В настоящее время плазмиды принято классифицировать по признаку несовместимости. Явление

несовместимости связано со структурой и особенностями функционирования базового репликона — области, ответственной за репликацию и стабильное поддержание плазмиды [1]. В

* Эл. почта: volkova_o_v@inbox.ru

системе классификации плазмид псевдомонад (IncP) насчитывается 14 групп несовместимости (помимо целого блока неклассифицированных внехромосомных элементов) [2]. Для биотехнологических целей интерес представляют несколько групп, в том числе P-1, P-7 и P-9, включающие плазмиды биодеградации различных поллютантов (от нафталина и толуола до диоксина). Структура репликонов групп несовместимости P-1 и P-9 [3, 4], контроль их репликации и поддержания, круг хозяев относительно неплохо изучены. Установлено существование корреляции между строением базовых репликонов плазмид P-9-группы несовместимости и структурой плазмид в целом [5], что легло в основу внутригрупповой классификации этих плазмид [4]. Рестрикционный анализ плазмид биодеградации группы P-7 не позволяет выделить отдельные подгруппы в пределах группы [6], что может быть связано с высоким полиморфизмом мобильных генетических элементов и сайтов их внедрения в плазмидный “остов” или же самого “остова”, включающего области, ответственные за репликацию, стабильное поддержание и мобилизацию/конъюгационный перенос плазмид. Плазмиды данной группы часто выделяют из загрязненных нефтепродуктами образцов почв и воды, и они вносят существенный вклад в биодеградативный потенциал окружающей среды. Несмотря на это, наблюдается дефицит информации о разнообразии, круге природных и потенциальных хозяев этих плазмид, полиморфизме структуры и принципах функционирования их базовых репликонов. Кроме того, описаны и принадлежащие к IncP-7-группе плазмиды резистентности к антибиотикам (R-плазмиды) [7, 8], представляющие несомненный интерес для клинической микробиологии.

Плаزمида Rms148 (182 т.п.н.), кодирующая стрептомицинофосфотрансферазу, была выделена из клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* в одной из клиник Франкфурта и уже более 30 лет служит архетипом IncP-7-группы в классических тестах на несовместимость плазмид в лабораториях разных стран [8]. Однако до сих пор отсутствует общедоступная информация о структуре ее базового репликона. Кроме того, для разработки классификации плазмид внутри P-7-группы несовместимости необходимо сравнение области инициации репликации Rms148 и представителей группы с установленными нуклеотидными последовательностями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Определяли наличие плазмид IncP-7-группы в штаммах различных ви-

дов псевдомонад из коллекции Лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН. В качестве хозяина мини-репликона Rms148 использовали штамм *P. aureofaciens* BS1393. Бактерии выращивали в среде LB [9] при 28°C. Тетрациклин (для селекции мини-репликона Rms148) и стрептомицин (для поддержания целой Rms148) вносили в среду LB до достижения конечной концентрации 30 и 200 мкг/мл соответственно.

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса согласно [9] с некоторыми модификациями. Для выделения мини-репликона из *P. aureofaciens* BS1393 использовали набор “ZR Plasmid Miniprep™-Classic” (“Zymo Research”, США).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и визуализация ДНК. ПЦР проводили в циклере Mastercycler Gradient (“Eppendorf”, Германия). Использовали две пары олигонуклеотидных праймеров: RepAP7F1 (5'-GCCCATGCCGAAAAGGTGTC) и RepAP7R1 (5'-GAATCGTTGATAGGCATCCGAC) для детекции гена *repA* (IncP-7); и 4210F (5'-ATCGTCGTAACGCCTACAG) и 6216R (5'-GACGgAtcCTAATCTGGTTGCTCTC), содержащий внесенный сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции BamHI, который в данной работе не использовали – для получения мини-репликона Rms148. Реакцию проводили в стандартных условиях с использованием Taq-ДНК-полимеразы при температуре отжига праймеров 53°C. Электрофорез проводили в 0.8 и 1.5%-м агарозных гелях в Трис-ацетатном буфере по стандартной методике [9]. Визуализацию ДНК проводили путем окрашивания геля в растворе бромистого этидия.

ДНК выделяли из геля, используя “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit” (“Zymo Research”, США), по протоколу фирмы-изготовителя.

Рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов гена *repA* проводили с использованием фермента HaeIII при 37°C в течение 2 ч в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (“Fermentas”, Литва).

Конструирование минимального репликона Rms148. Амплифицированный с использованием праймеров 4210F и 6216R фрагмент ДНК Rms148 размером около 2 т.п.н. (содержащий область, контролирующую репликацию плазмид IncP-7-группы) выделяли из агарозного геля, обрабатывали фрагментом Кленова (“СибЭнзим”, Россия) для получения “тупых” концов и лигировали с кассетой, детерминирующей устойчивость к тетрациклину, вырезанной из вектора p34S-Tc эндонуклеазой рестрикции SmaI (“Fermentas”, Литва). Лигирование проводили с использованием ДНК-лигазы фага T4 согласно протоколу фирмы-производителя (“Fermentas”). После 10–12 ч ин-

кубации при 18°C 5–8 мкл смеси вносили в свежую охлажденную суспензию клеток штамма *P. aureofaciens* BS1393 и проводили электропорацию (напряжение 1.7 кВ, расстояние между электродами 0.1 см) в электропораторе MicroPulser (“Bio-Rad”). Затем клетки подращивали в среде LB в течение 1–1.5 ч при 28°C, высевали на агаризованные среды с тетрациклином и проверяли, содержат ли колонии, сформировавшиеся через 1–2 сут, соответствующую плазмидную ДНК.

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

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности анализировали с помощью программ DNASTar, BLAST, Jpred3, PredictProtein, VPROM (Softberry). Для построения филогенетического дерева использовали программы CLUSTAL и TREECON [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфизм гена *repA* у плазмид Р-7-группы несовместимости

Поскольку плазмиды псевдомонад обычно реплицируются по тета-типу, для их репликации и проявления несовместимости необходим белок-инициатор репликации (для IncP-7-группы принято обозначение RepA), кодируемый самой плазмидой [11]. На основе нуклеотидной последовательности гена Rep-белка обычно можно сделать вывод о принадлежности плазмиды к той или иной группе несовместимости, а полиморфизм этого гена в некоторых случаях позволяет построить внутригрупповую систему классификации. С праймерами на внутреннюю область гена *repA*, разработанными нами на основе известных нуклеотидных последовательностей Р-7-плазмид, проведена ПЦР, в которой матрицами служили Rms148 и плазмиды биodeградации (D-плазмиды), несовместимые с Rms148 в стандартном микробиологическом тесте. В подавляющем большинстве случаев получены ПЦР-фрагменты ожидаемого размера 412 п.н. Полиморфизм гена *repA* оценили с помощью рестрикционного анализа соответствующих амплифицированных фрагментов плазмид pFME4, pFME5, pBS270, pAK5, pS6f и Rms148.

Оказалось, что только Rms148 (единственная в эксперименте R-плаزمиды) имеет уникальную, т.е. отличную от остальных, рестрикционную картину внутренней области гена *repA* (рис. 1). Причем рестрикционные профили всех плазмид, кроме Rms148, соответствовали виртуальным рестрикционным картинам гена *repA* частично или

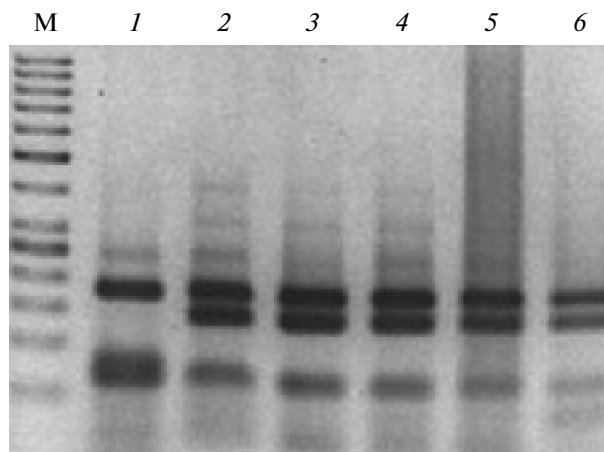


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции ПЦР-фрагментов гена *repA* (412 п.н.) плазмид IncP-7-группы эндонуклеазой HaeIII. М – маркер молекулярных масс (50 bp DNA ladder), 1 – Rms148 (Sm^R), 2 – pFME4 (NAH), 3 – pAK5 (NAH), 4 – pFME5 (NAH), 5 – pBS270 (CAP, SAL), 6 – pS6f (CAP, SAL). Sm^R – устойчивость к стрептомицину, NAH – биodeградация нафталина, CAP – биodeградация капролактама, SAL – биodeградация салицилата.

полностью секвенированных Р-7-плазмид: pND6-1, pWW53, pL6.5, pDK1 и pCAR1 (нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами AY208917, AB238971, AJ250853, AB434906 и AB088420 соответственно). Обнаруженные отличия структуры гена белка-инициатора репликации Rms148 и тот факт, что Rms148 является пока единственной доступной нам плазмидой антибиотикорезистентности группы IncP-7, послужили поводом для определения полной нуклеотидной последовательности гена *repA* и области начала репликации (*oriV*) данной плазмиды.

Структура минимального репликона Rms148

Для выделения и дальнейшего изучения областей, ответственных за репликацию, необходимо получение минимальных репликонов плазмид. Имея минимальный репликон, можно утверждать, что выбранный участок молекулы достаточен для воспроизведения плазмиды в конкретном хозяине. Существует несколько стратегий конструирования мини-репликонов. Наиболее широко применяется частичный гидролиз плазмидной ДНК мелкощепящей эндонуклеазой Sau3AI с последующим лигированием смеси фрагментов с кассетами антибиотикорезистентности, что требуется для дальнейшей селекции бактериальных клонов, содержащих плазмиды. В результате трансформации бактериальных клеток полученными конструкциями отбираются фрагменты

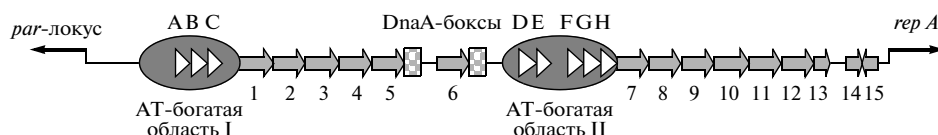


Рис. 2. Структура области инициации репликации (*oriV*) Rms148. А–Н – прямые 12-членные повторы в левой (I) и правой (II) AT-богатых областях; 1–15 – итероны и итерон-подобные последовательности.

плазмиды, способные к самостоятельной репликации. Характерная особенность метода заключается в относительной непредсказуемости размера, а следовательно, и состава отобранных фрагментов, что может усложнить изучение целевой области. Поэтому был выбран самый радикальный способ ограничения репликона – амплификация участка *repA-oriV* без прилегающих к нему *par*-генов (генов правильной сегрегации, необходимых для стабильного поддержания репликона в неселективных условиях). Под *oriV* в данном случае подразумевалась область между геном *repA* и предыдущей *orf*. Полученный фрагмент Rms148 размером около 2 т.п.н. (без учета тетрациклиновой кассеты) обладал способностью к самостоятельной репликации в клетках штамма *P. aureofaciens* BS1393 даже после многократных пассажей в селективных условиях.

Определение нуклеотидной последовательности мини-репликона Rms148 (депонирована в GenBank под номером JN698877) выявило следующие основные компоненты области инициации репликации (рис. 2):

1) тринадцать 18-членных тандемных повторов (потенциальных итеронов, с которыми связывается RepA для инициации репликации) с уникальным консенсусом CGACTACA(G/A)ATT(C/A)CGGCT, а также дополнительные редуцированные прямой и инвертированный повторы (иначе – один инвертированный повтор, частично гомологичный итеронам), перекрывающиеся с предполагаемыми –35 и –10 боксами промотора гена *repA*;

2) два предполагаемых участка взаимодействия с хозяйским иницирующим белком DnaA: TTATCCACA (идентичен DnaA-боксам в *oriC E. coli* и *oriV* секвенированных IncP-7-плазмид) и TGGTTCGCT (варьирует даже в пределах IncP-7-группы, но в случае Rms148 наблюдается максимальное (четыре нуклеотида) отклонение от консенсуса TT(A/T)TNCACA, что поднимает вопрос о функциональности данного участка);

3) две AT-богатые области, разделенные DnaA-боксами и содержащие 12-нуклеотидные прямые повторы с консенсусом TTTTNTGTTTTT, три из которых находятся в первой (дистальной по отношению к гену *repA*) области и пять – во второй (проксимальной);

4) ген *repA* (867 п.н.), кодирующий белок из 288 аминокислотных остатков, принадлежащий к Rep-3-суперсемейству α -белков.

Вполне вероятно, что не все описанные компоненты *oriV* обязательны для инициации репликации, поэтому данный участок следует считать расширенным *oriV*. Известна всего одна работа, в которой изучали функционирование базового репликона плазмид Р-7-группы несовместимости, вернее, всего одной плазмиды pCAR1 [12]. Показано, что в клетках *P. putida* DS1 при действии белка RepA *in trans* минимальный *oriV* укладывался в отрезок размером 345 п.н., включающий первую AT-богатую область, итероны 1–6, оба DnaA-боксы и два 12-членных повтора из второй AT-богатой области. К сожалению, это утверждение пока нельзя экстраполировать на остальные Р-7-плазмиды в связи с определенной филогенетической удаленностью pCAR1, а главное, нельзя исключить изменения потребности в компонентах *oriV* при репликации в различных хозяевах, пусть даже одного рода [3].

При анализе нуклеотидной последовательности *oriV* Rms148 обнаружен “лишний”, по сравнению с другими известными Р-7-плазмидами, итерон (CGACTACAATTCCGGCT) (итерон 9 на рис. 2). Таким образом, Rms148 пока единственная плаزمида IncP-7-группы, содержащая нетипичное число итеронов. Участие данного итерона в кооперативном взаимодействии с инициатором репликации, а также его влияние на проявление несовместимости и копияность плазмиды – предмет экспериментальных изысканий. На примере итерон-содержащей, но высококопийной плазмиды R1162 (IncP-4) было показано, что с увеличением числа итеронов происходило титрование Rep-белка (в данном случае его количество являлось лимитирующим фактором), в связи с чем иницировалось меньшее число раундов репликации, падала копияность и возрастала экспрессия несовместимости [13].

Филогенетический анализ области *repA-oriV* Rms148

Сравнение нуклеотидной последовательности *repA-oriV* Rms148 с другими Р-7-плазмидами выявило достаточно консервативный характер этой

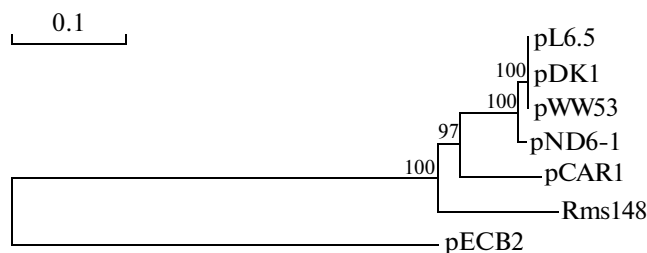


Рис. 3. Дендрограмма, иллюстрирующая эволюционные взаимоотношения между нуклеотидными последовательностями области *repA-oriV* плазмид группы IncP-7. Последовательность pECB2 использована для укоренения. Дерево построено в программе TREECON с помощью метода ближайших соседей (Neighbour-Joining) и бутстрэп-анализа.

области в пределах группы, в отличие, например, от IncP-9 [5]. Тем не менее, Rms148 и pCAR1 формируют отдельные ветви на филогенетическом дереве, построенном с помощью метода ближайшего соседа (Neighbour-Joining) (рис. 3). Из-за минимальных отличий *repA-oriV* pND6-1, pWW53, pL6.5 и pDK1 можно предварительно объединить в подгруппу pND6-1. Нуклеотидная последовательность анализируемой области Rms148 идентична *repA-oriV* плазмид pND6-1 подгруппы на 83%, а pCAR1 всего на 81%.

Следует отметить, что в группе P-7, в отличие от P-9, более консервативной выглядит последовательность гена *repA*, чем *oriV*. Если идентичность *repA* Rms148 генам инициатора репликации плазмид подгруппы pND6-1 составляет 93%, а pCAR1 – 92%, то *oriV* – лишь 75–76 и 73% соответственно. Причем отличается даже размер расширенного *oriV* плазмид, принадлежащих к разным ветвям филогенетического дерева: у Rms148 – 1080 п.н., у подгруппы pND6-1 – 1024–1025 п.н., у pCAR1 – 1005 п.н.

Интересно, что фрагмент *oriV* Rms148 размером 95 п.н., включающий итероны 2–5 и первый DnaA-бокс, на 75% идентичен итерон-содержащей части *oriV* pECB2 (неклассифицированная криптическая плаزمид из *P. alcaligenes*). В ней 4 раза повторяется последовательность с консенсусом GAGGTACAGATTCCGG(C/G)T, в которой лишь 5'-концевая область отличается от итеронов группы IncP-7. Данный факт (как и описанная ниже гомология белков RepA Rms148 и pECB2) может свидетельствовать в пользу возможного родства этих плазмид. Нельзя исключить, что плазмиды, гомологичные криптической и малой (4480 п.н.) pECB2, были далекими предками плазмид группы IncP-7.

Предсказание структуры белка-инициатора репликации RepA Rms148

Вычисленная аминокислотная последовательность белка RepA Rms148 на 99% идентична RepA

подгруппы pND6-1 и на 98% – pCAR1. Кроме того, этот белок гомологичен инициаторам репликации многих итерон-содержащих плазмид, включая F-фактор *E. coli*, pSC101, R6K, но максимальное сходство за пределами IncP-7 наблюдается с инициатором репликации pECB2 (46% идентичности) и pPS10 (41% идентичности) при 77% перекрытии аминокислотных последовательностей.

Предсказанные с помощью компьютерных программ вторичная и третичная структуры RepA Rms148 имеют характерную для белков данной группы доменную организацию: по одной “крылатой спирали” (WH1-2-домены) на N- и C-концах (аминокислотные остатки 4–142 и 145–231), первая из которых обычно отвечает за межбелковые взаимодействия, а вторая содержит мотив типа спираль-поворот-спираль (НТН), взаимодействующий со специфическими участками ДНК (оператором, итеронами) [14]. На примере криптической плазмиды pPS10 показано, что главную роль в димеризации RepA и во взаимодействии с хозяйскими факторами играет гидрофобный N-концевой мотив, так называемая лейциновая застезка (LZ, 26 аминокислотных остатков). Предполагаемый LZ-мотив RepA Rms148 на 58% идентичен соответствующим мотивам pPS10 и pECB2, в то время как основной НТН-домен (в WH2) Rms148 на 52% идентичен pECB2 и лишь на 39% – pPS10, что не удивительно, если принять во внимание разницу в нуклеотидных последовательностях *oriV* данных плазмид.

По сравнению с неплохо изученными функционально Rep-белками pPS10 и F-фактора аминокислотная последовательность RepA IncP-7 имеет удлиненную на 20–40 остатков C-концевую область. Анализ вторичной структуры RepA Rms148 позволяет предположить, что указанная область содержит дополнительную α -спиральную структуру. В целом же структурное сходство Rep-белков, кодируемых P-7-плазмидами, с RepA pPS10 наводит на мысль о сходном механизме их функционирования, по крайней мере, в соответствии с моделью: мономер, связываясь с

итеронами, инициирует репликацию, димер же взаимодействует с промоторно-операторной областью собственного гена (в районе инвертированного повтора), осуществляя авторепрессию.

Анализ структуры гена *repA* и последствий его мутирования может пролить свет и на причины ограничения круга хозяев плазмид Р-7-группы несовместимости. До сих пор никому не удавалось в лабораторных условиях перенести плазмиды этой группы в бактерии, не относящиеся к роду *Pseudomonas*, тем не менее процент G + C в Р-7-репликонах слишком низкий (53–54%) для эволюции только в пределах этого рода (>60% G + C), хотя существуют и другие объяснения этого феномена [15]. Действительно, потенциальный промотор *repA* далек от канонического для, например, энтеробактерий, что может быть причиной дефицита белка-инициатора репликации в указанных хозяевах. В случае рMT2 (IncP-9) повышенное количество Rep-белка, экспрессируемого с дополнительного вектора, компенсировало неэффективность *rep*-промотора, в результате чего становилась возможной репликация рMT2 в клетках *E. coli* [16]. В отличие от плазмид Р-9-группы, при избытке RepA (вносимого *in trans*) mini-pCAR1 не реплицируется в клетках *E. coli* [12]. Можно предположить, что факторами, ограничивающими круг хозяев плазмид IncP-7-группы, являются не только особенности промотора, но и неэффективное взаимодействие RepA с инициирующими хозяйскими факторами (DnaA, шаперонами). Стоит учесть, что существует определенная гомология между LZ-мотивами Rep-белков Rms148 и рPS10, а всего лишь одна транзигция С→Т, приводящая к замене А31V в данной области RepA рPS10, разрешает эффективную репликацию плазмиды в *E. coli* [14]. Экспериментальное обнаружение факторов, ограничивающих поддержание Р-7-репликонов в тех или иных условиях или генетическом окружении, позволит точнее оценить круг хозяев этих плазмид, особенности их эволюции, потенциал распространения кодируемых ими детерминант биodeградации и антибиотикорезистентности.

В заключение следует отметить, что не все плазмиды группы IncP-7 конъюгативны, более того, даже конъюгативные экземпляры не всегда удается перенести в пределах рода *Pseudomonas* [17]. В связи с тем, что не все плазмиды биodeградации могли поддерживаться в штаммах *P. aeruginosa* (реципиент R-плазмид на этапе становления системы классификации IncP), в нашей лаборатории даже была разработана отдельная система классификации D-плазмид в *P. putida* [18]. Однако показана высокая частота конъюгационного переноса (10^{-1}) Rms148 между штаммами *P. aeru-*

ginosa [19], а также в наши лабораторные штаммы *Pseudomonas* других видов, в том числе ризосферные. Поэтому определение круга потенциальных хозяев и механизмов поддержания R-плазмид, обладающих Р-7-репликоном, безусловно, представляет интерес и с клинической точки зрения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (РНП 2.1.1/10938).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Novick R.P. 1987. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381–395.
2. Boronin A.M. 1992. Diversity of *Pseudomonas* plasmids: To what extent? *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 461–468.
3. Adamczyk M., Jagura-Burdzy G. 2003. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochimica Polonica.* **50**, 425–453.
4. 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.
5. 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.
6. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. 2005. Плазмиды биodeградации нафталина и салицилата Р-7 группы несовместимости в штаммах флуоресцирующих псевдомонад. *Микробиология.* **74**, 1–7.
7. Анисимова Л.А., Боронин А.М. 1981. Характеристика плазмид резистентности *Pseudomonas aeruginosa*. *Антибиотики.* **6**, 450–456.
8. Sagai H., Hasuda K., Iyobe S., Bryan L.E., Holloway B.W., Mitsunashi S. 1976. Classification of R plasmids by incompatibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **10**, 573–578.
9. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press.
10. 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.
11. Del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarria M.J., Espinosa M., Diaz-Orejas R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 434–464.
12. 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.
13. Kim Y.-J. 1996. Molecular mechanism of R1162 plasmid Incompatibility exerted by direct repeat in the replicative origin. *J. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 63–67.
 14. Maestro B., Sanz J.M., Diaz-Orejas R., Fernandez-Tresguerres E. 2003. Modulation of pPS10 host range by plasmid-encoded RepA initiator protein. *J. Bacteriol.* **185**, 1367–1375.
 15. Thomas C.M., Haines A.S., Kosheleva I.A., Boronin A.M. 2008. *Pseudomonas* plasmids. In: *Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory*. Ed. Rehm B.H.A. Wiley-VCH.
 16. Sevastyanovich Y.R., Titok M.A., Krasowiak R., Bingle L.E.H., Thomas C.M. 2005. Ability of IncP-9 plasmid pM3 to replicate in *Escherichia coli* is dependent on both *rep* and *par* functions. *Mol. Microbiol.* **57**, 819–833.
 17. 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.
 18. Боронин А.М., Кочетков В.В., Скрыбин Г.К. 1980. Группы несовместимости плазмид биodeградации нафталина бактерий рода *Pseudomonas*. *Генетика*. **16**, 792–803.
 19. Sagai H., Kremery V., Hasuda K., Iyobe S., Knothe H., Mitsuhashi S. 1975. R factor mediated resistance to aminoglycoside antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Microbiol.* **19**, 427–432.