

УДК 576.851.132

## ОРГАНИЗАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ ПОДДЕРЖАНИЯ БАЗОВОГО РЕПЛИКОНА IncP-7-ПЛАЗМИДЫ БИОДЕГРАДАЦИИ НАФТАЛИНА pFME5

© 2013 г. О. В. Волкова<sup>1</sup>, И. А. Кошелева<sup>1,2</sup>, А. М. Боронин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пушкино 142290

<sup>2</sup>Пушинский государственный естественнонаучный институт, Пушкино 142290

e-mail: volkova\_o\_v@inbox.ru

Поступила в редакцию 26.06.2012.

Сконструирован базовый репликон плазмиды биodeградации нафталина pFME5 (IncP-7), определена его полная нуклеотидная последовательность. Показано, что pFME5mini идентичен репликонам, выделенным нами ранее в pND6-1-подгруппу, и может как реплицироваться, так и стабильно поддерживаться только в клетках бактерий рода *Pseudomonas*. Мутационный анализ pFME5mini выявил, что для стабильного поддержания репликона необходима экспрессия генов *parWAB*, что может быть общим свойством всех P-7-плазмид. Однако дефектные по *par*-локусу варианты pFME5mini дольше сохранялись в популяции бактерий *Pseudomonas* в неселективных условиях, чем соответствующие мутанты базового репликона плазмиды биodeградации карбазола pCAR1. Подобранные нами праймеры, специфичные к генам *repA* и *parC*, могут использоваться для детекции IncP-7-плазмид, а к двум вариантам гена *parA* – для внутригрупповой классификации.

DOI: 10.7868/S0016675813050123

Последние десятилетия наблюдается устойчивый интерес научной общественности к внехромосомным генетическим элементам, распространяющимся в бактериальных популяциях детерминантами устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам и генам биodeградации поллютантов. К числу таких элементов относятся и плазмиды биodeградации (D-плазмиды) бактерий рода *Pseudomonas*, обеспечивающие конкурентное преимущество своим хозяевам в загрязненных нефтепродуктами почвах и стоках химических производств [1]. Плазмиды принято классифицировать по признаку несовместимости. Несовместимость определяется механизмом функционирования базового репликона – области, ответственной за репликацию и стабильное поддержание плазмиды в ряду бактериальных поколений [2]. В системе классификации плазмид псевдомонад (IncP) насчитывается 14 групп несовместимости [1]. Особый интерес представляют группы P-1, P-7 и P-9, включающие плазмиды биodeградации ксенобиотиков и компонентов нефти (галогенированных соединений, капролактама, ароматических углеводов и др.). Принадлежность плазмиды к той или иной группе несовместимости определяет круг бактериальных хозяев, способность к длительному сосуществованию с другими плазмидами в одном хозяине, а следовательно, судьбу генов биodeградации/резистентности в конкретных микросомах. В отличие от P-1 и P-9 групп [3, 4], до настоящего времени не были детально изучены механизмы поддержания и струк-

турное разнообразие плазмид IncP-7-группы. Особенностью плазмид этой группы является то, что их часто обнаруживают в загрязненных образцах почвы и воды, тогда как представителей группы IncP-9 – повсеместно, в том числе в “чистых” пробах [4, 5]. Не исключено, что эта особенность может быть связана с механизмами репликации и поддержания P-7-репликонов, а следовательно, и с кругом их хозяев. Известны полные нуклеотидные последовательности лишь четырех IncP-7-плазмид, несущих гены биodeградации карбазола/диоксиана (pCAR1), толуола (pWW53, pDK1) и нафталина (pND6-1); еще одна плаزمида биodeградации толуола (pL6.5) секвенирована частично. Кроме того, нами определена нуклеотидная последовательность области инициации репликации плазмиды резистентности к стрептомицину Rms148 (архетип группы IncP-7) [6]. Однако участие конкретных областей и генов в поддержании P-7-репликонов изучалось только на примере pCAR1. Этой информации недостаточно для установления общих механизмов репликации и сегрегации, а также разработки внутригрупповой классификации P-7-плазмид. В данной работе мы получили базовый репликон плазмиды биodeградации нафталина pFME5 – pFME5mini, оценили его способность к поддержанию в гомо- и гетерологичных хозяевах, определили нуклеотидную последовательность pFME5mini и провели делеционный анализ для оценки вклада различных участков pFME5mini в стабильное поддержание репликона.

**Таблица 1.** Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

| Штамм/плазида  | Характеристика  | Ссылка/источник       |
|--|---|-----------------------|
| <b>Штаммы</b>  |   |                       |
| <i>Comamonas acidovorans</i> B-1251  | Типовой штамм   | ВКМ                   |
| <i>E. coli</i> K-12 DH5 $\alpha$   | F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>endA1</i><br><i>recA1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>r</i> <sub>K</sub> <sup>-</sup> <i>m</i> <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>deoR</i> <i>thi-1</i> <i>supE44</i> $\lambda$<br><i>gyrA96</i> <i>relA1</i> | Takara Bio, Япония    |
| <i>Pseudomonas putida</i> BS394  | Cys <sup>-</sup> , Sm <sup>R</sup>  | Коллекция лаборатории |
| <i>P. aureofaciens</i> BS1393 (реклассифицирован как <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> ) | Продуцент феназиновых антибиотиков  | То же                 |
| <i>P. chlororaphis</i> PCL1391 ( <i>P. chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> )                     | Продуцент феназин-1-карбоксамиды  | [7]                   |
| <i>P. fluorescens</i> 38a  | Продуцент пиолотеорина  | Коллекция лаборатории |
| <i>P. aeruginosa</i> ВКМ B588  |   | То же                 |
| <i>P. fluorescens</i> FME5   | Деструктор нафталина и салицилата, содержащий плазмиду pFME5  | [8]                   |
| <b>Плазмиды</b>  |   |                       |
| pFME5  | Nah <sup>+</sup> Sal <sup>+</sup> 2MeN <sup>+</sup> Tra <sup>+</sup> IncP-7, 80 тпн   | [8]                   |
| pFME5mini  | 7 тпн <i>Hind</i> III-фрагмент pFME5, содержащий <i>repA-oriV-parWABC</i> , сшитый с геном устойчивости к тетрациклину  | Данная работа         |
| pFME5mini $\Delta$ <i>parC</i>   | 5.9 тпн <i>Hind</i> III- <i>Pci</i> I-фрагмент pFME5mini с интактными <i>repA-oriV-parWAB</i>   | То же                 |
| pFME5mini $\Delta$ <i>parBC</i>  | 5.2 тпн <i>Eco</i> RI-фрагмент pFME5mini, содержащий интактные <i>repA-oriV-parWA</i>   | »                     |
| pFME5mini $\Delta$ <i>parABC</i>   | 2.6 тпн фрагмент pFME5mini, содержащий интактные <i>repA-oriV-parW</i>  | »                     |
| pFME5mini $\Delta$ <i>parWABC</i>  | 1.9 тпн фрагмент pFME5mini, содержащий интактные <i>repA-oriV</i>   | »                     |
| pFME5mini $\Delta$ <i>parA</i>   | pFME5mini с дефектным геном <i>parA</i>   | »                     |
| pFME5mini $\Delta$ <i>parW</i>   | pFME5mini с дефектным геном <i>parW</i>   | »                     |
| pUC19  | Ap <sup>R</sup> <i>lacZ</i> , репликон pMB9   | [9]                   |

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследования.** Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1. Бактерии выращивали в среде LB и в минерально-солевой среде Эванса [9] при 28°C. Нафталин (для поддержания плазмиды pFME5) вносили в среду Эванса в количестве 0.1 г/л. При культивировании на агаризованной среде нафталин добавляли на крышку перевернутой чашки Петри. Тетрациклин для селекции базового репликона pFME5 в штаммах рода *Pseudomonas* и *Comamonas* вносили в среду LB до достижения конечной концентрации 30 мкг/мл, для селекции в *E. coli* – 10 мкг/мл. Ампициллин для селекции конструкций на основе pUC19 в *E. coli* K-12 DH5 $\alpha$  вносили в среду LB до достижения конечной концентрации 50 мкг/мл.

Плазмидную ДНК большого размера выделяли методом щелочного лизиса [9], pFME5mini из псевдомонад и конструкции на основе pUC19 из *E. coli* – с помощью набора для выделения плазмидной ДНК “ZR Plasmid Miniprep<sup>TM</sup>-Classic” (“Zymo Research”, США).

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и визуализация ДНК.** ПЦР осуществляли 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%-ном и 1.5%-ном 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

Таблица 2. ПЦР-праймеры, использованные в работе

| Ген/область                       | Праймеры | Нуклеотидная последовательность (5' → 3') | Размер ПЦР-продукта, пн | Ссылка        |
|-----------------------------------|----------|---|-------------------------|---------------|
| <i>repA</i><br>(IncP-7)           | RepAP7F  | GCCCATGCCGAAAAAGGTGTC                     | 412                     | [6]           |
|                                   | RepAP7R  | GAATCGTTGATAGGCATCCGAC                    |                         |               |
| <i>parA</i><br>pND6-1-тип         | ParANDF  | TCACCTCAAGGGCTTATACG                      | 355                     | Данная работа |
|                                   | ParANDR  | ATCGGATCAAAGCATCTCACC                     |                         |               |
| <i>parA</i><br>pCAR1-тип          | ParACARF | ATTGTTTTGGATTGACTACCCG                    | 518                     | То же         |
|                                   | ParACARR | ATCCTCGAGGTACGCATCAGC                     |                         |               |
| <i>parC</i><br>(IncP-7)           | ParCP7F  | TGGTGCAACCGCAGACACG                       | 267                     | »             |
|                                   | ParCP7R  | GTGTTTGGTTGAATTGCTCATAGA                  |                         |               |
| <i>repA-oriV</i><br>(IncP-7)      | 4292F    | CGAAAGCTTCAGTATTCATTGGGTTTC*              | 1900                    | »             |
|                                   | 6216R    | GACGGATCCCTAATCTGGTTGCTCTC*               |                         |               |
| <i>repA-oriV-parW</i><br>(IncP-7) | 3622F    | GAGGATCCCTGCATTTGCTGAATAC*                | 2600                    | »             |
|                                   | 6216R    | GACGGATCCCTAATCTGGTTGCTCTC*               |                         |               |

\* Полу жирным курсивом выделены внесенные сайты узнавания рестриктаз *Hind*III и *Bam*HI, подчеркнуты измененные нуклеотиды.

DNA Recovery Kit” (“Zymo Research”, США), по протоколу фирмы-изготовителя.

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

**Конструирование базового репликона плазмиды pFME5.** Для получения базового репликона плазмиду pFME5 гидролизовали с помощью эндонуклеазы *Hind*III. Для селекции участков, способных к самостоятельной репликации, смесь фрагментов лигировали с кассетой, детерминирующей устойчивость к тетрациклину, полученной из вектора p34S-Tc эндонуклеазой *Hind*III. Лигирование проводили с использованием ДНК-лигазы фага T4 согласно протоколу производителя (“Fermentas”, Литва). После 10–12 ч инкубации при 18°C 5–8 мкл смеси вносили в свежую охлажденную суспензию клеток штамма *P. putida* BS394 и проводили электропорацию (напряжение – 1.7 кВ, расстояние между электродами – 0.1 см) в электропораторе MicroPulser (“Bio-Rad”, США). Затем клетки подращивали в L-бульоне в течение 1–1.5 ч при 28°C и высевали на агаризованные среды, содержащие тетрациклин. Сформировавшиеся через 1–2 сут колонии проверяли на наличие плазмидной ДНК.

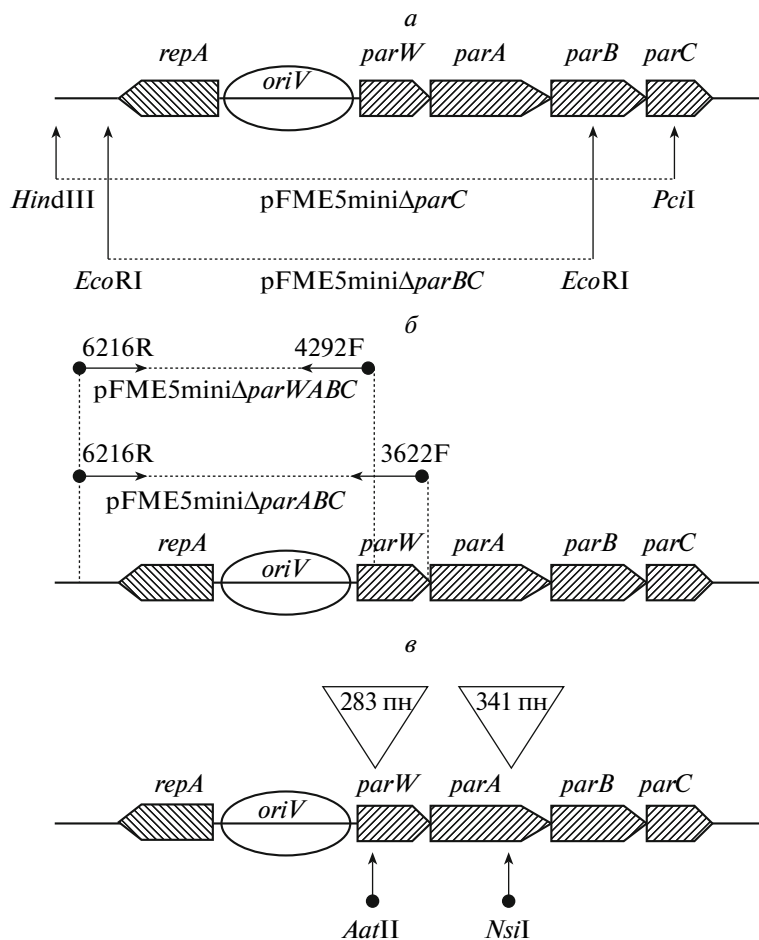
Трансформацию других штаммов рода *Pseudomonas* и *Comamonas* полученным репликоном осуществляли с помощью электропорации при описанных выше условиях. Трансформацию *E. coli* K-12 DH5α проводили стандартно [9].

**Конструирование дефектных по *par*-генам вариантов pFME5mini** представлено на рис. 1. Варианты pFME5miniΔ*parC* и pFME5miniΔ*parBC* по-

лучены рестрикцией, исключающей формирование полноценных продуктов соответствующих *par*-генов (рис. 1,а). pFME5miniΔ*parWABC* и pFME5miniΔ*parABC* (рис. 1,б) получены амплификацией с праймерами, представленными в табл. 2: 4292F и 6216R – для первого варианта, 3622F и 6216R – для второго. Все описанные репликоны (кроме pFME5miniΔ*parABC*) после обработки “липких” концов фрагментом Клёнова (“СибЭнзим”, Россия) были лигированы с кассетой устойчивости к тетрациклину, вырезанной из вектора p34S-Tc эндонуклеазой *Sma*I; в случае pFME5miniΔ*parABC* для лигирования использовали внесенные в праймеры места узнавания *Bam*HI.

Варианты pFME5miniΔ*parW* и pFME5miniΔ*parA* получены с помощью инсерций, смещающих открытую рамку считывания (ОРС), в сайты узнавания эндонуклеаз *Aat*II и *Nsi*I соответственно (рис. 1,в). Инсерционную ДНК получали с помощью ПЦР с праймерами, содержащими внесенные места узнавания *Aat*II или *Nsi*I, на матрице, не имеющей отношения к *par*-локусу pFME5.

**Стабильность поддержания базового репликона pFME5** и его мутантных вариантов 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 10 сут в двух повторах (для интактного pFME5mini) или 6 сут в трех повторах (для *par*-дефектных вариантов pFME5mini). Пробы отбирали на 1, 3, 6, 10-е сут в первом случае и ежедневно – во втором. После соответствующих разведений культуру высевали на чашки с LB, затем



**Рис. 1.** Конструирование мутантных по *par*-генам вариантов рFME5mini. *a* – варианты, полученные с помощью эндонуклеаз рестрикции; *б* – варианты, полученные путем амплификации фрагментов базового репликона. Над стрелками указаны названия праймеров для ПЦР; *в* – варианты, полученные путем смещающих “рамку считывания” инсерций фрагментов ДНК в сайты узнавания рестриктаз, расположенные внутри генов *parW* (сайт *AatII* – для получения рFME5miniΔ*parW*) или *parA* (сайт *NsiI* – для получения рFME5miniΔ*parA*). В треугольниках указаны размеры инсерций.

по 100 колоний переносили репликатором на LB-агар с тетрациклином. Стабильность плазмиды определяли как процентное соотношение числа клонов, сохранивших устойчивость к тетрациклину, к общему числу проверенных клонов.

*Мутагенез плазмидной ДНК гидроксиламином* проводили согласно работе [10].

Для секвенирования клонировали 3.5-тпн *EcoRI-KpnI*-, 1.7-тпн *KpnI-EcoRI*- и 1.6-тпн *EcoRI-HindIII*-фрагменты рFME5mini в вектор рUC19 стандартным способом [9], а также амплифицировали области базового репликона с помощью различных комбинаций праймеров, разрабатываемых по мере определения нуклеотидной последовательности. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems в Межинститутском Центре коллективного пользова-

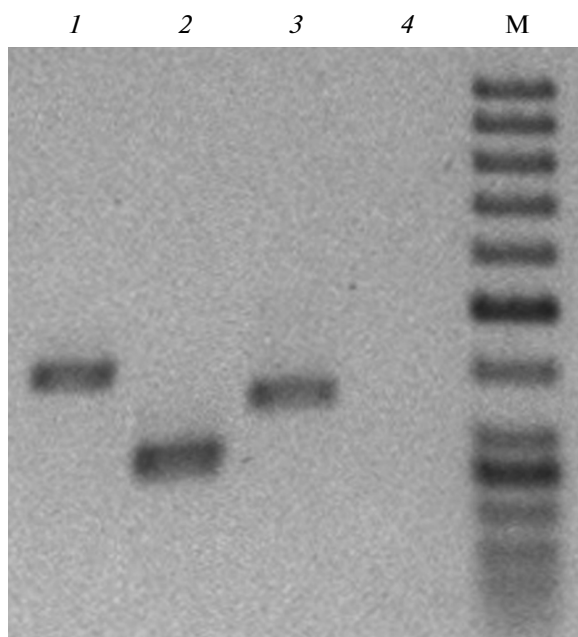
ния “ГЕНОМ” ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru>), организованном при поддержке РФФИ.

*Анализ нуклеотидных и вычисленных аминокислотных последовательностей* проводили с помощью пакета программ DNASTar и доступных online BLAST, Jpred3, PredictProtein, SOSUI, BPROM (Softberry).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Структура базового репликона рFME5*

Плазмида биodeградации нафталина и салицилата рFME5 (80 тпн) была обнаружена в штамме *Pseudomonas fluorescens* FME5, выделенном из шламонакопителя ОАО “Нижнекамскнефтехим”, и отнесена к Р-7-группе несовместимости [8]. Эта плазмида была выбрана в качестве модели для изучения структуры и свойств базовых репликонов IncP-7-группы, поскольку стабильно поддер-



**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации генов, локализованных в области инициации репликации и сегрегации pFME5mini. 1 – *repA* (412 пн), 2 – *parC* (267 пн), 3 – *parA* pND6-1-типа (355 пн), 4 – *parA* pCAR1-типа (518 пн, не амплифицируется), М – маркер молекулярных масс (50 bp DNA ladder).

живалась в природном хозяине и легко выделялась методом щелочного лизиса. Известна нуклеотидная последовательность только одной плазмиды биодegradации нафталина группы IncP-7 – pND6-1, природный хозяин которой – *Pseudomonas* sp. ND6-1 – выделен из промышленных сточных вод в Китае. Интересно, что плаزمида pND6-1 (как и TOL-плазмиды pWW53) в процессе эволюции утратила область, связанную с конъюгационным переносом [11], а pFME5 с высокой частотой переносится в штамм *P. aureofaciens* BS1393 (данные не представлены), т.е. является конъюгативной. Из-за наличия большого количества дополнительного генетического материала, связанного с конъюгационным переносом и биодegradацией, целесообразно конструирование базовых репликонов крупных плазмид, в состав которых входили бы только участки ДНК, обеспечивающие автономную репликацию и стабильное поддержание, т.е. правильную сегрегацию копий низкокопийной плазмиды в процессе деления клеток хозяина. Часто понятие “базовый репликон” используют как синоним “минимального репликона”. В данной работе мы будем определять область, необходимую для инициации репликации, т.е. необходимый минимум для воспроизведения плазмиды, как “минимальный репликон”, а область, содержащую минимальный репликон и гены сегрегации, “стабилизирующие” его в бактериальной популяции, как “базовый репликон”.

Анализ нуклеотидных последовательностей плазмид pND6-1, pWW53, pL6.5 и pCAR1 (депонированы в GenBank под номерами AY208917, AB238971, AJ250853 и AB088420 соответственно) выявил, что оптимальным способом конструирования базового репликона pFME5 может быть ограничение целевой области с помощью рестриктазы *HindIII*, хотя размер этой области варьирует у разных представителей P-7-группы. Действительно, после лигирования *HindIII*-фрагментов pFME5 с кассетой устойчивости к тетрациклину нами был получен укороченный вариант плазмиды – pFME5mini, способный к репликации в клетках *P. putida* BS394. Устойчивость к тетрациклину служила маркером для селекции бактериальных клонов, содержащих автономно поддерживаемые конструкции. Из клеток *P. putida* BS394 (pFME5mini) была выделена плазмидная ДНК, размер которой после вырезания тетрациклиновой кассеты эндонуклеазой *HindIII* составил около 7 тпн. Поскольку нельзя исключить, что крупная плазмиды является смешанным репликоном, содержащим области инициации репликации, характерные для нескольких групп несовместимости, было необходимо подтвердить, что полученный базовый репликон несет генетические детерминанты именно IncP-7-группы. ПЦР с парой праймеров (табл. 2), специфичной к гену *repA*, кодирующему консервативный в пределах P-7-группы инициатор плазмидной репликации, оказалась положительной. Требовалось также установить, содержит ли pFME5mini полный набор генов, потенциально ответственных за стабильное поддержание репликона, – *par*-локус (partitioning – разделение). Для этого на основе известных нуклеотидных последовательностей P-7-плазмид мы подобрали три пары праймеров, специфичных к генам *parC* (последний ген *par*-локуса), *parA* pND6-1-типа и *parA* pCAR1-типа (табл. 2). Низкий уровень гомологии нуклеотидной последовательности гена *parA* плазмиды pCAR1 с аналогичными генами остальных P-7-плазмид не позволил подобрать праймеры, универсальные для всей группы. ПЦР-анализ с синтезированными праймерами показал, что pFME5mini помимо гена *repA*, обеспечивающего репликацию, содержит и гены *par*-локуса (как минимум *parA* и *parC*) (рис. 2). Примечательно, что у pFME5mini обнаружен ген *parA* pND6-1-типа, как у плазмид pND6-1, pWW53, pL6.5 и pDK1. Ранее, основываясь на сравнении областей инициации репликации (*repA-oriV*), мы выделили три подгруппы в составе IncP-7-группы: pND6-1 (включает плазмиды pND6-1, pWW53, pL6.5 и pDK1), pCAR1 и Rms148 [6]. Видимо, подобное разделение справедливо и с учетом особенностей *par*-локуса разных подгрупп, а специфичные к гену *parA* праймеры могут быть использованы для внутригрупповой классификации IncP-7-плазмид.

*Особенности поддержания рFME5mini  
в гомо- и гетерологичных хозяевах*

Чтобы оценить, насколько стабильно и в каких бактериальных хозяевах поддерживается плазида рFME5mini, мы трансформировали ею штаммы различных видов рода *Pseudomonas* ( $\gamma$ -протеобактерии, Pseudomonadaceae), а также *E. coli* DH5 $\alpha$  ( $\gamma$ -протеобактерии, Enterobacteriaceae) и *Comamonas acidovorans* B-1251 ( $\beta$ -протеобактерии). Оказалось, что базовый репликон рFME5 был способен реплицироваться во всех представителях рода *Pseudomonas*, перечисленных в табл. 1 (гомологичные хозяева). Трансформировать потенциальных гетерологичных хозяев (*E. coli* DH5 $\alpha$  и *C. acidovorans* B-1251) не удалось, что соотносится с результатами других исследований [11, 12], определяющих круг хозяев IncP-7-плазмид как узкий, ограниченный только родом *Pseudomonas*. Единственное известное исключение – перенос в водной среде плазмиды рCAR1 в род *Stenotrophomonas*, тоже относящийся к  $\gamma$ -протеобактериям [13]. Ранее мы выявили некоторое структурное сходство белков RepA плазмид Р-7-группы и неклассифицированной плазмиды рPS10 [6], для которой было показано, что вызванные воздействием гидроксилamina точечные мутации в гене *repA* расширяли круг хозяев рPS10 [14]. К сожалению, обработка гидроксиламином плазмиды рFME5mini не привела к образованию мутантов, способных реплицироваться в *E. coli* ни при 37°C, ни при 28°C.

Стабильность поддержания рFME5mini в трансформантах *Pseudomonas* оценивали в течение 10 сут (~200 генераций) в неселективных условиях. Показатели стабильности репликона несколько варьировали между видами псевдомонад (рис. 3, а), что отражает влияние бактериального генетического окружения на поддержание внехромосомных элементов. Подобные результаты были получены и при оценке стабильности базового репликона рCAR1 (правда, в течение 5 сут): рCAR1mini сохранялся в 96% популяции штамма *P. putida* DS1, но быстро элиминировался из штамма KT2440, принадлежащего к тому же виду [15]. В нашей лаборатории ранее оценивали различия физиологических и биодegradативных характеристик ряда комбинаций “бактерия *Pseudomonas* – катаболическая плазида” [16, 17]. Интересно, что плазида рFME5 стабильно сохранялась в природном хозяине, с высокой частотой переносилась с помощью конъюгации в штамм *P. aureofaciens* BS1393, из которого элиминировалась уже в течение 2 сут (данные не приведены). Однако базовый репликон плазмиды – рFME5mini – стабильно наследовался в этом хозяине в течение 10 сут. Таким образом, “выживаемость” плазмиды в бактериальной популяции при прочих равных условиях определяется не только свойствами

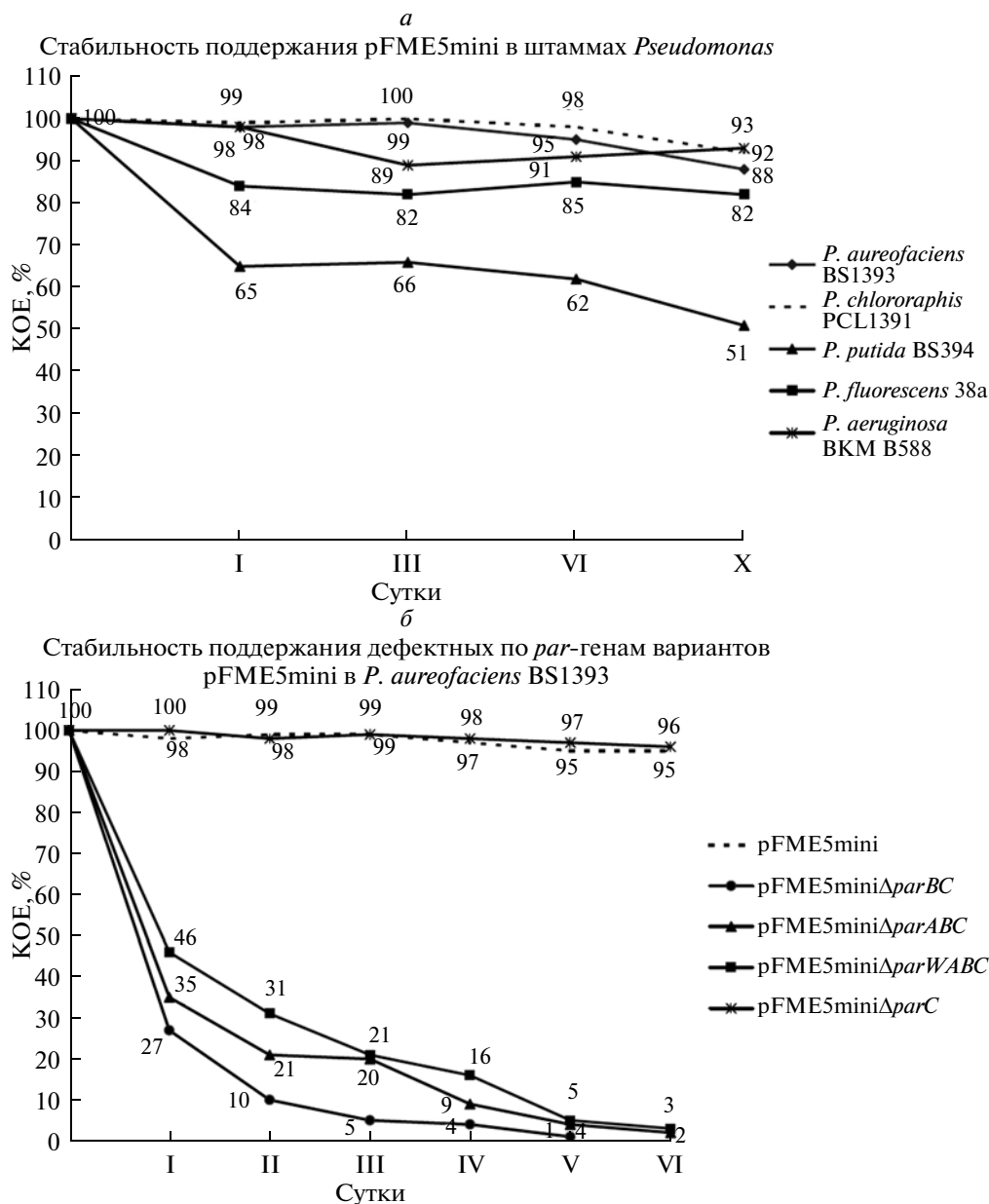
базового репликона, но и дополнительным, “нагруженным”, генетическим материалом.

Поскольку в четырех из пяти неродственных штаммах псевдомонад репликон рFME5mini поддерживался стабильно, можно считать, что он содержит полный набор генов и участков ДНК, обеспечивающих автономную репликацию и сегрегацию плазмидных копий в клетках бактерий рода *Pseudomonas*.

*Анализ нуклеотидной последовательности  
рFME5mini*

Для уточнения предварительной внутригрупповой классификации IncP-7-плазмид, а также разработки тактики мутационного анализа базового репликона плазмиды биодegradации нафталина рFME5 мы определили его нуклеотидную последовательность. Рестрикционный анализ рFME5mini и сравнение рестрикционных профилей с последовательностями плазмид рND6-1-подгруппы позволили определить подходящие места узнавания эндонуклеаз для субклонирования фрагментов репликона в вектор рUC19 для дальнейшего секвенирования.

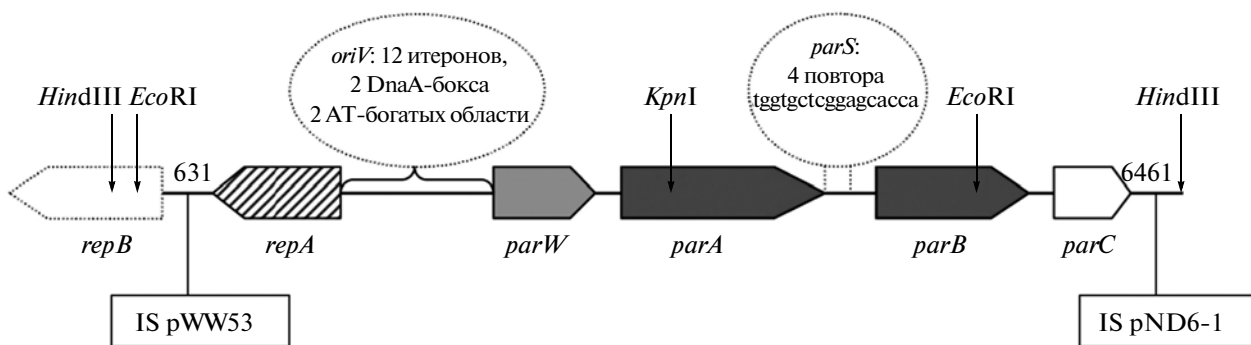
Нуклеотидная последовательность была определена для целого *Hind*III-фрагмента (6952 пн), заключающего в себе базовый репликон, и депонирована в GenBank под номером JQ929663. Несмотря на удаленное географическое положение мест обитания хозяев рFME5 и других секвенированных плазмид IncP-7-группы, оказалось, что базовые репликоны этих внехромосомных элементов высококонсервативны. Последовательность рFME5mini в среднем на 99–100% идентична аналогичным последовательностям плазмид рND6-1-подгруппы и на 84% – рCAR1, содержит интактные гены *repA*, *parW*, *parA*, *parB*, *parC* и 5'-конец *repB* (рис. 4). Последний ген, кодирующий ДНК-хеликазу, присутствует у всех известных Р-7-плазмид, но, как оказалось, не является обязательным компонентом базового репликона (по крайней мере в клетках псевдомонад), более того, у плазмиды рDK1 ген *repB* инактивирован внедрением IS1162. Интересно, что филогенетически (судя по количеству нуклеотидных замен) рFME5mini ближе базовым репликонам плазмид биодegradации толуола (рWW53, рL6.5), чем нафталина (рND6-1). В отличие от рWW53 и рND6-1 исследуемая область рFME5mini интактна, т.е. не содержит вставок транспозонов или инсерционных элементов (рис. 4). У плазмиды рND6-1 в направлении downstream от гена *parC* произошло внедрение 1235-пн элемента IS222 (с удвоением триплета GGT), а у рWW53 между генами *repB* и *repA* внедрен 1598-пн IS*Ppu20* (с удвоением последовательности АТТАА).



**Рис. 3.** Стабильность поддержания рFME5mini в различных штаммах псевдомонад (*a*) и мутантных по *par*-локусу вариантов рFME5mini в *P. aureofaciens* BS1393 (*b*). Измерение проводили в течение 10 сут (*a*) и 6 сут (*b*) в неселективных условиях. Диаграммы для вариантов рFME5miniΔ*parW* и рFME5miniΔ*parA* не приведены, так как подобны диаграммам рFME5miniΔ*parWABC* и рFME5miniΔ*parABC*.

Структура областей инициации репликации Р-7-плазмид Rms148 и рCAR1 подробно описана ранее [6, 12]. Область *oriV* рFME5mini содержит 12 итеронов (места связывания с инициатором репликации RepA) с консенсусом 5'-CGACTA-CA(G/A)ATT(A/C)CGGCT-3' и последовательность, гомологичную двум инвертированным редуцированным итеронам, перекрывающуюся с предполагаемыми -35 и -10 боксами промотора гена *repA*. Кроме того, *oriV* рFME5mini содержит две АТ-богатых области, разделенные DnaA-боксами и содержащие 12-нуклеотидные прямые по-

вторы с консенсусом TTTTNTGTTTT. Первый DnaA-бокс у всех представителей группы соответствует консенсусу TT(A/T)TNCACA, последовательность второго DnaA-бокса вариабельна, но минимальное отклонение от консенсуса обнаружено у рFME5 и других представителей рND6-1-подгруппы. Являются ли оба бокса необходимыми для инициации репликации — не известно, но на примере плазмиды Р1 показано более эффективное плавление ДНК в *oriV* в присутствии нескольких DnaA-боксов [18].



**Рис. 4.** Генетическая карта pFME5mini. Нуклеотидная последовательность определена для *Hind*III-фрагмента (6952 пн). Гены, обеспечивающие репликацию и стабильное поддержание базового репликона pFME5, выделены цветом. Прямоугольниками под схемой обозначены инсерционные последовательности в соответствующих местах базовых репликонов других плазмид IncP-7 группы: IS*Ppu20* – в pWW53 и IS222 – в pND6-1. Число над местом внедрения – позиция нуклеотида pFME5mini, после которого произошло внедрение IS-элемента в гомологичные плазмиды.

Ген *repA* pFME5mini (867 пн) на 100% идентичен *repA* всех представителей pND6-1-подгруппы, на 96% – pCAR1 и на 93% – Rms148. Существенной гомологии с последовательностями генов инициаторов репликации за пределами P-7-группы обнаружено не было. Вычисленная аминокислотная последовательность RepA позволила обнаружить помимо описанных в работе [6] гомологов, кодируемых плазмидами pECB2 и pPS10, подобный инициатор репликации у *Pseudomonas psychrotolerans* L19 (69% идентичности при 81% перекрытия последовательностей). В связи с низким уровнем гомологии почти всех OPC базового репликона с генами не IncP-7-плазмид далее будем сравнивать только их вычисленные аминокислотные последовательности.

В составе *par*-локуса pFME5mini присутствуют гены *parA* и *parB*, кодирующие классическую пару *транс*-действующих сегрегационных белков, обеспечивающих стабильное поддержание многих плазмид, а в особых условиях – и хромосом [19]. Наиболее вероятным претендентом на роль *цис*-действующего элемента *parS* (центромероподобной последовательности, с которой взаимодействуют сегрегационные белки) для P-7-плазмид авторы работы [11] предложили считать уникальный 17-нуклеотидный палиндром 5'-TGGT-GCTCgGAGCACCA-3', обнаруженный между генами *parA* и *parB* всех плазмид группы и способный связывать белок ParB. Плазмида pFME5mini, как и базовые репликоны pWW53, pL6.5 и pND6-1, содержит четыре повтора палиндрома, pCAR1 – три повтора, pDK1 – всего два. Положение сайта *parS*, характерное для репликонов P-7-группы, уникально, поскольку у других плазмид он обычно располагается либо перед, либо после *par*-оперона.

Вычисленная аминокислотная последовательность белка ParA pFME5mini (377/394 а.о.) на 100% идентична гомологам, кодируемым плазми-

дами pND6-1-подгруппы, на 83% – pCAR1, на 63–65% – ParA-белкам различных патоваров *P. syringae*, а также *Pseudomonas* sp. TJI-51 (EGB 99664) и *P. putida* DOT-T1E (pGRT1) (AEK25429). Следует отметить, что доступные нам компьютерные программы определяли различные старты трансляции *parA* для членов pND6-1-подгруппы и плазмиды pCAR1, т.е. N-концы ParA-белков всех плазмид, кроме pCAR1, могут быть на 5% длиннее, а целый продукт состоять из 394 а.о. (в отличие от 377 а.о. pCAR1), что соответствует аннотациям к последовательностям плазмид pND6-1-подгруппы в GenBank. Удлиненный вариант исключает использование промотора, обнаруженного программой VPROM в непосредственной близости от иницирующего кодона укороченной OPC, а именно на этом промоторе иницируется синтез транскрипта, содержащего OPC генов *parA*, *parB*, *parC* у pCAR1 [15]. Однако в той же работе показано, что чуть менее эффективно синтезируется и более длинный транскрипт, с которого тоже транслируются перечисленные выше OPC, но вместе с геном *parW*. Промотор, обеспечивающий образование этого транскрипта, локализован перед геном *parW*. Поэтому существует вероятность трансляции удлиненных вариантов *parA* у представителей pND6-1-подгруппы с транскриптов, начинающихся перед *parW*. Недавно мы определили нуклеотидную последовательность области *parW-parA* плазмиды Rms148 (неопубликованная информация). Оказалось, что точечная мутация перед геном *parA* исключает формирование удлиненного варианта белка, как и в случае pCAR1. Но некоторая филогенетическая удаленность плазмид, принадлежащих к разным подгруппам, не позволяет исключить возможность модификаций в функционировании их базовых репликонов.

На границе N-концевой и центральной частей белка ParA pFME5mini находится P-петля (так



называемый девиантный бокс Уолкера) – сайт связывания АДФ/АТФ; в составе белка также обнаружены два сайта связывания катионов магния. Поскольку белок ParA плазмид всей группы относится к АТФазам Уолкера и имеет размер, приближающийся к 400 а.о., систему сегрегации IncP-7-плазмид можно отнести к типу Ia общепринятой классификации, включающему белки ParA плазмиды P1 и SopA F-фактора [19].

Продукт гена *parB* pFME5mini состоит из 338 а.о., что также соответствует типу Ia сегрегационных систем, и идентичен соответствующим продуктам плазмид pND6-1-подгруппы на 99–100%, pCAR1 (342 а.о.) – на 71%, *Pseudomonas* sp. TJI-51 и нескольких патоваров *P. syringae* – на 42%. Белок ParB обычно взаимодействует с ДНК плазмиды в районе “центромеры” *parS* (у P-7-плазмид, вероятно, 17-пн палиндромы, описанные выше). Комплекс ParB-*parS* в присутствии АТФ распознается АТФазой ParA, молекулы которой полимеризуются в филаментарные структуры, “распалкивающие” плазмидные копии по клеточным четвертям, обеспечивая таким образом активную сегрегацию кластеров плазмид с одинаковым *ori*gиn репликации. Считается, что АТФаза может самостоятельно “измерять” клеточное пространство, т.е. для позиционирования плазмидных копий перед клеточным делением не нужны специфические мембранные рецепторы, кодируемые хозяйским геномом [19]. Интересно, что в составе оперона, кодирующего ParAB-гомологи, у плазмид группы IncP-9 обнаружен ген мембранного белка TolA, функция которого не установлена [20]. Негомологичный *tolA*, но тоже ген мембранного белка (*parW*), обнаружен и у всех плазмид IncP-7-группы.

Вычисленная аминокислотная последовательность продукта гена *parW* (159 а.о.) pFME5mini на 99–100% идентична гомологам, кодируемым pND6-1-подгруппой, на 95% – pCAR1, на 85% – Rms148, на 22% (перекрытие 82%) – гипотетическому белку *Psychromonas* sp. CNPT3 (EAS38234), ОРС которого находится между генами транспозаз рядом с *parA*. Кроме того, наблюдается слабое (32% идентичности) сходство центральной части ParW pFME5mini с белком аскомицета *Ajellomyces capsulatus* H88, содержащим трихоплеин-подобный домен. Трихоплеин/митостатин, связанный с цитоскелетом, обеспечивает правильную локализацию центросомных белков в эукариотических клетках и регуляцию клеточного цикла у позвоночных [21]. Программы PredictProtein и SOSUI определяют трансмембранный домен у ParW pFME5mini в районе 12–29 N-концевых а.о. (а 1–20 а.о. – как  $\alpha$ -спиральный сигнальный пептид). Подобные структуры предсказаны для ParW всех представителей группы. Возможно, мембранные белки, кодируемые IncP-7-репликонами, взаимодействуя с комплексом ParA-ParB-*parS*, обес-

печивают “адресную” доставку сегрегируемых плазмид в зоны под клеточной мембраной и/или участвуют в компактизации разделяемых копий.

Продукт гена *parC*, учитывая полное отсутствие гомологов с установленными функциями, – гипотетический белок. Аминокислотная последовательность ParC pFME5mini (106 а.о.) консервативна в пределах P-7-группы: на 100% идентична соответствующим белкам pND6-1-подгруппы, на 94% – pCAR1 и лишь на 36% (51% перекрытия) – гипотетическому белку *P. psychrotolerans* L19.

### Мутационный анализ pFME5mini

Поскольку полученный нами базовый репликон плазмиды pFME5 стабильно поддерживался в большинстве видов псевдомонад (рис. 3,а), появилась возможность оценить с помощью серии мутаций, какие именно области являются необходимыми для репликации, а какие – для стабильного поддержания pFME5mini. В качестве хозяина для сравнения стабильности мутантных плазмид мы использовали ризосферный штамм *P. aureofaciens* BS1393, так как он формирует ярко-оранжевые колонии на LB-агаре и может быть легко отличим от возможного бактериального загрязнения при длительном культивировании в неселективных условиях.

Результаты оценки стабильности поддержания дефектных по *par*-локусу вариантов pFME5mini представлены на рис. 3,б. Как и предполагалось, для автономной репликации было достаточно области *repA-oriV* (минимальный репликон – pFME5miniparWABC), однако более 50% клонов утрачивали эту конструкцию в течение первых 24 ч. Интересно, что минимальный репликон pCAR1, в отличие от такового pFME5, полностью элиминировался из бактериальной популяции *P. putida* DS1 уже в течение 2 сут [12]. Более постепенная (в течение 5–6 сут) утрата наблюдалась для всех дефектных вариантов pFME5mini. Это различие может быть связано с дивергенцией нуклеотидных последовательностей репликонов двух подгрупп, с выбором хозяина или селективного маркера. Мы использовали в качестве последнего ген устойчивости к тетрациклину, а авторы работы [12] – к канамицину. В работе [22] показано, что скорость элиминации низкокопийных плазмид с одинаковым *oriV*, но разными касетами антибиотикорезистентности, варьировала, причем “тетрациклиновые” плазмиды были стабильнее, чем “канамициновые”.

Как и в случае pCAR1, ген *parC* не участвовал в стабилизации pFME5mini, поскольку показатели стабильности репликона с интактным и делетированным геном не различались. Интеграцию pFME5mini $\Delta$ *parC* в хромосому хозяина исключи-

ли успешным выделением плазмидной ДНК на б-е сут культивирования.

Как ни странно, утрата рFME5mini $\Delta$ parBC происходила несколько интенсивнее, чем совершенно лишённого par-локуса рFME5mini $\Delta$ parWABC и остальных мутантных вариантов. Вероятным объяснением этому может служить незадействованная ввиду отсутствия белка ParB “центромера” parS, содержащая четыре крупных палиндрома, которые могут вносить дополнительную дестабилизацию в дефектную конструкцию.

Итак, с помощью мутационного анализа показано, что для стабильного наследования базового репликона плазмиды рFME5, как и филогенетически удалённой рCAR1, необходимо наличие всех генов par-локуса, за исключением parC, хоть он и присутствует у всех известных IncP-7-плазмид. Пока сложно сказать, является ли эта характеристика общей для всех членов группы, так как не изучено структурное разнообразие и механизмы сегрегации Р-7-плазмид, относящихся к другим подгруппам (Rms148 и, возможно, не обнаруженным). Для лучшего понимания функционирования Р-7-репликонов требуется установление транскрипционных факторов и их мест взаимодействия с операторными областями par-оперонов. Анализируя дефектные варианты рCAR1mini, авторы работы [12] получили интересные результаты ОТ-ПЦР: в случае независимого мутирования генов parW, parA и parB по неизвестным причинам отсутствовал транскрипт первого гена, а транскрипты parA и parB всегда присутствовали. Более поздняя работа [15] выявила наличие двух крупных транскриптов разной длины в области par-локуса рCAR1, о чем говорилось выше. Поскольку трансляция генов parA и parB происходит с альтернативных транскриптов, то мутации, исключающие транскрипцию parWABC, могут не влиять на экспрессию оперона parABC. Но вопрос об участии продуктов par-локуса IncP-7-плазмид в регуляции/авторегуляции транскрипции остается открытым.

Таким образом, сконструировав базовый репликон плазмиды биodeградации нафталина рFME5 (IncP-7) и проанализировав его нуклеотидную последовательность, мы установили, что он идентичен репликонам, отнесенным нами ранее к рND6-1-подгруппе, но не содержит инсерционных элементов в участках, граничащих с repA и parWABC. Показано, что рFME5mini может как реплицироваться, так и стабильно поддерживаться только в клетках гомологичных хозяев — бактерий рода *Pseudomonas*. Полученные результаты и данные, приведенные в работах [11, 12], указывают на то, что узкий круг хозяев плазмид группы IncP-7 обусловлен как особенностями системы их конъюгационного переноса, так и неспособностью к репликации в клетках неродственных

псевдомонадам (гетерологичных) хозяев. Мутационный анализ рFME5mini выявил, что, как и в случае плазмиды биodeградации карбазола рCAR1, для стабильного поддержания базового репликона в бактериальной популяции необходима экспрессия генов parWAB, продуктами которых являются мембранный белок с пока невыясненными функциями (ParW), “мотор” сегрегационной машины — АТФаза Уолкера (ParA) и белок, связывающийся с “центромерой” parS (ParB). Однако дефектные по par-локусу варианты рFME5mini элиминировались из бактериальной популяции на несколько суток позже, чем соответствующие мутанты рCAR1mini. Разработанные нами праймеры, специфичные к генам repA и parC, могут использоваться для детекции IncP-7-плазмид, а к вариантам гена parA — для внутрigrупповой классификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (“Развитие научного потенциала высшей школы (РНП)”, 2.1.1/10938 “Исследование изменений структуры микробных сообществ в ответ на загрязнение устойчивыми органическими соединениями”).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boronin A.M. Diversity of *Pseudomonas* plasmids: To what extent? // FEMS Microbiol. Letters. 1992. V. 79. № 1–3. P. 461–467.
2. Novick R.P. Plasmid incompatibility // Microbiol. Rev. 1987. V. 51. № 4. P. 381–395.
3. Adamczyk M., Jagura-Burdzy G. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids // Acta Biochimica Polonica. 2003. V. 50. № 2. P. 425–453.
4. Sevastyanovich Y.R., Krasowiak R., Bingle L.E.H. et al. Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas* // Microbiology. 2008. V. 154. № 10. P. 2929–2941.
5. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л. и др. Разнообразие генетических систем биodeградации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* // Микробиология. 2005. Т. 74. № 1. С. 70–78.
6. Волкова О.В., Кошелева И.А., Боронин А.М. Структура области инициации репликации плазмиды Rms148 (IncP-7), детерминирующей резистентность бактерией рода *Pseudomonas* к стрептомицину // Мол. биология. 2012. Т. 46. № 4. С. 605–611.
7. Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V., Mulders I.H. et al. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot // Mol. Plant. Microbe Interact. 2000. V. 13. № 12. P. 1340–1345.
8. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л. и др. Плазмиды биodeградации нафталина и салицилата Р-7 группы несовместимости в штаммах флуоресцирующих псевдомонад // Микробиология. 2005. Т. 74. № 3. С. 342–348.

9. Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. 2344 p.
10. Rose M.D., Fink G.R. *KAR1*, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast // Cell. 1987. V. 48. № 6. P. 1047–1060.
11. Yano H., Miyakoshi M., Ohshima K. et al. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids // J. Bacteriol. 2010. V. 192. № 17. P. 4337–4347.
12. Shintani M., Yano H., Habe H. et al. 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. 2006. V. 72. № 5. P. 3206–3216.
13. Shintani M., Fukushima N., Tezuka M. et al. Conjugal transfer of the the IncP-7 carbazole degradative plasmid, pCAR1, in river water samples // Biotechnol. Lett. 2008. V. 30. № 1. P. 117–122.
14. Maestro B., Sanz J.M., Diaz-Orejas R., Fernandez-Tresguerres E. Modulation of pPS10 host range by plasmid-encoded RepA initiator protein // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 4. P. 1367–1375.
15. Shintani M., Tokumaru H., Takahashi Yu. et al. Alterations of RNA maps of IncP-7 plasmid pCAR1 in various *Pseudomonas* bacteria // Plasmid. 2011. V. 66. P. 85–92.
16. Волкова О.В., Анохина Т.О., Пунтус И.Ф. и др. Влияние плазмид биodeградации нафталина на физиологические характеристики ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* // Прикл. биохим. и микробиол. 2005. Т. 41. № 5. С. 525–529.
17. Есикова Т.З., Грищенко В.Г., Боронин А.М. Характер утилизации капролактама штаммами *Pseudomonas* sp. в зависимости от CAP-плазмид и бактерий-хозяев // Прикл. биохим. и микробиол. 1993. Т. 29. № 2. С. 259–266.
18. Del Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarria M.J. et al. Replication and control of circular bacterial plasmids // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. № 2. P. 434–464.
19. Ebersbach G., Gerdes K. Plasmid segregation mechanisms // Annu. Rev. Genet. 2005. V. 39. P. 453–479.
20. Krasowiak R., Smalla K., Sokolov S. et al. PCR primers for detection and characterisation of IncP-9 plasmids // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 42. P. 217–225.
21. Cerqua C., Anesti V., Pyakure A. et al. Trichoplein/mitostatin regulates endoplasmic reticulum–mitochondria juxtaposition // EMBO reports. 2010. V. 11. P. 854 – 860.
22. Velappan N., Sblattero D., Chasteen L. et al. Plasmid incompatibility: more compatible than previously thought? // Protein engineering, design & selection. 2007. V. 20. № 7. P. 309–313.

## Organization and Maintenance Features of IncP-7 Naphthalene Degradation Plasmid pFME5 Basic Replicon

O. V. Volkova<sup>a</sup>, I. A. Kosheleva<sup>a, b</sup>, and A. M. Boronin<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

<sup>b</sup> Pushchino State Educational Institute of Natural Sciences, Pushchino, 142290 Russia  
e-mail: volkova\_o\_v@inbox.ru

A basic replicon of the naphthalene degradation plasmid pFME5 (80 kb, IncP-7) has been constructed and sequenced. The nucleotide sequence of pFME5mini is almost identical to replicons of the pND6-1 subgroup, which was separated based on the *reA-oriV* homology in our previous work. The basic replicon of pFME5 is capable of replication and stable maintenance exclusively in *Pseudomonas* species. An analysis of the deletion mutation indicated that, in contrast to the *parWAB* region, the *parC* gene is not essential for the stability of pFME5mini and can be a common feature of IncP-7 replicons. We revealed that *par*-defective mutants of pFME5mini were slowly eliminated from the bacterial population in a nonselective medium compared to their pCAR1-based counterparts. Designed primers specific to the *repA* and *parC* genes can be used to detect IncP-7 plasmids, while primers specific to two variants of *parA* can be used for intragroup classification.