

УДК 577.22

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-2-14-18

**ОСОБЕННОСТИ ФИЛОГАНИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ САЙТОВ
РАЗРЕШЕНИЯ МУЛЬТИМЕРНЫХ ФОРМ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК (MRS),
ГОМОЛОГИЧНЫХ MRS ПЛАЗМИДЫ pCS36-4CPA**

© Т.Р. Ясаков, Н.В. Жарикова, Е.Ю. Журенко, В.В. Коробов, Т.В. Маркушева

Проведен анализ филогении последовательности сайта разрешения мультимерных форм плазмидной ДНК (mrs) плазмиды pCS36-4CPA, которая была выделена из штамма-деструктора хлорфеноксиуксусных кислот *Citrobacter* sp. 36-4CPA. С помощью сравнительного анализа гомологи mrs pCS36-4CPA были обнаружены у 16 плазмид, бактерии-хозяева которых относятся к семейству *Enterobacteriaceae*, что указывает на ограничение распространения гомологичных модулей плазмидами этого семейства. Полученные данные обнаруживают полифилетический характер происхождения mrs у плазмид бактерий рода *Citrobacter*.

Ключевые слова: *Citrobacter*, сайт разрешения мультимерных форм плазмидной ДНК (mrs), плазида, модуль стабильности.

Введение. Известно, что функции передачи, хранения и распространения генетической информации внехромосомных элементов (плазмид) выполнимы только в случае их стабильной сегрегации между дочерними клетками при делении. В противном случае становится возможным образование дочерних бесплазмидных клеток, утерявших часть генома и, соответственно, часть функций. К числу нарушений, приводящих к неравномерной сегрегации, можно причислить образование димерных или мультимерных форм плазмид при гомологичной рекомбинации. Образование мультимерных форм плазмид приводит к их неравномерной сегрегации, что особенно опасно для высококопийных плазмид, распределение которых между дочерними клетками носит случайный характер. Неконтролируемая мультимеризация приводит к так называемой «димерной катастрофе» [4]. В генетической инженерии и биотехнологиях создания рекомбинантных штаммов образование бесплазмидных клеток может приводить как к потере целевых конструкций, снижению экспрессии генов, так и к снижению выхода целевого продукта. Известно, что на плазмидах, для которых свойственно образование мультимерных форм, присутствует область, ответственная за их разрешение и контроль

клеточного деления при возникновении мультимеров [1, 3]. Сравнительная характеристика данной последовательности, называемой модулем стабильности плазмид, может служить как дополнительным критерием плазмидной дифференциации, так и отражать закономерности их распространения среди бактерий различных таксонов.

Целью работы является определение, аннотация последовательности модуля стабильности (mrs) плазмиды pCS36-4CPA и ее филогенетическая характеристика.

Материалы и методы. Последовательность плазмиды pCS36-4CPA была секвенирована ранее [5]. Первичный поиск и сравнение последовательностей ДНК, гомологичных mrs плазмиды pCS36-4CPA, были осуществлены в формате сервера BLAST. Дальнейший анализ, выравнивание последовательностей и построение филогенетического дерева проводились по алгоритму, подробно описанному в работе [9].

Результаты и обсуждение. Модуль стабильности (mrs) представляет собой сайт разрешения мультимерных форм плазмидной ДНК. Мультимеризация может приводить к неравномерной сегрегации плазмид между дочер-

ЯСАКОВ Тимур Рамилевич – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, e-mail: iasakov@anrb.ru
ЖАРИКОВА Наталья Владимировна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, e-mail: puzzle111@yandex.ru
ЖУРЕНКО Евгения Юрьевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, e-mail: zhurenkoe@gmail.com
КОРОБОВ Владислав Викторович – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, e-mail: vacikk@mail.ru
МАРКУШЕВА Татьяна Вячеславовна – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, e-mail: tvmark@anrb.ru

ними бактериальными клетками при делении и, как следствие, к образованию бесплазмидных клеток. Его функцией является предотвращение неконтролируемой мультимеризации молекул плазмид вследствие гомологичной рекомбинации. Процесс сайт-специфической рекомбинации происходит при помощи белков XerC and XerD, а также двух вспомогательных белков ArgR и RepA. Резолвазы XerC и XerD осуществляют рекомбинацию молекул плазмид на специальных, высококонсервативных, белок-связывающих сайтах последовательностей ДНК модуля стабильности. Также *mrs* кодирует короткий РНК-транскрипт *Rcd*, осуществляющий негативный контроль клеточного деления [1]. *Mrs* плазмиды pCS36-4CPA был идентифицирован на основе сравнительного анализа ее после-

довательности с ранее хорошо изученной последовательностью *mrs* плазмиды ColE1, обозначаемой *ser*. Длина секвенированной последовательности *mrs* плазмиды pCS36-4CPA составила 166 п.н. Отметим также, что в составе плазмиды мы не обнаружили ранее хорошо описанные гены, контролирующие деструкцию хлорфеноксисукусных кислот [8].

Известно, что последовательности *mrs* имеют высококонсервативную природу. Поэтому было сделано предположение о том, что гомологичные области могут присутствовать в составе других плазмид бактерий рода *Citrobacter*. BLAST-анализ *mrs* плазмиды pCS36-4CPA выявил наличие высокогомологичных последовательностей у 16 ранее секвенированных плазмид (табл.).

Т а б л и ц а

Плазмиды, имеющие гомологи модуля стабильности (*mrs*) плазмиды pCS36-4CPA

Наименование плазмиды	Размер, п.н.	Расположение <i>mrs</i> на плазмиде	Бактериальный штамм	Номер последовательности в GenBank
pAH3680	3680	2383-2548	<i>Aeromonas hydrophila</i>	DQ402049
CSK29544_2p	4938	4734-4900	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	CP011049
pCSA2	4938	4759-4925	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	KC663407
pSP291-3	4422	1959-2126	<i>Cronobacter sakazakii</i> SP291	CP004094
p35734-8.452kb	8452	537-702	<i>Enterobacter asburiae</i> 35734	CP012164
pS51B	4854	4585-4752	<i>Enterobacter cloacae</i>	AB583678
p34978-4.938kb	4938	4448-4614	<i>Enterobacter cloacae</i> 34978	CP010364
p34998-4.921kb	4921	712-878	<i>Enterobacter cloacae</i> 34998	CP010381
pEC01	5002	2371-2537	<i>Enterobacter cloacae</i> IFO 3320	AB117929
pIGRW12	4995	2245-2411	<i>Escherichia coli</i>	EF088686
pCTXM5-637	7438	4273-4438	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	JX017306
pCTXM5-891	12391	9226-9391	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	JX017307
pCTXM5-1358	8216	5051-5216	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	JX017308
pCTXM5-1845	8215	5050-5215	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	JX017309
pCAV1099-5410	5410	2087-2252	<i>Klebsiella oxytoca</i> CAV1099	CP011592
pCAV1335-5410	5410	27-192	<i>Klebsiella oxytoca</i> CAV1335	CP011613

Согласно полученным данным становится очевидным, что большинство *mrs* располагаются на плазмидах, длина которых варьирует в пределах более 3600 п.н. и менее 10000 п.н. Исключение составляет плазмида *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* pCTXM5-891, имеющая длину 12391 п.н. Поэтому вследствие наличия ограничения на размер плазмид можно предположить отсутствие *mrs* в плазмидах других штаммов-деструкторов ксенобиотиков. Примерами могут служить плазмиды pSM22 (длиной более 43 т.п.н.), pRP33-4ch и pRP36D [6, 7]. Анализ результатов BLAST-поиска выявил отсутствие последовательностей, гомологичных *mrs* плазмиды pCS36-4CPA, среди бактерий рода *Citrobacter*. В то же время оказалось, что бактерии, на плаз-

мидах которых обнаружены гомологи, составляют роды семейства *Enterobacteriaceae*, а именно: *Aeromonas*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella* и *Klebsiella*. Полученные данные позволяют предположить, что горизонтальное распространение модулей стабильности, гомологичных *mrs* плазмиды pCS36-4CPA, ограничено бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Отсутствие высокоомологичных *mrs* последовательностей у других плазмид бактерий рода *Citrobacter* свидетельствует в пользу полифилетического происхождения данного модуля.

На это же предположение указывают результаты анализа филогенетического дерева, образованного гомологичными последовательностями *mrs* (рис.).

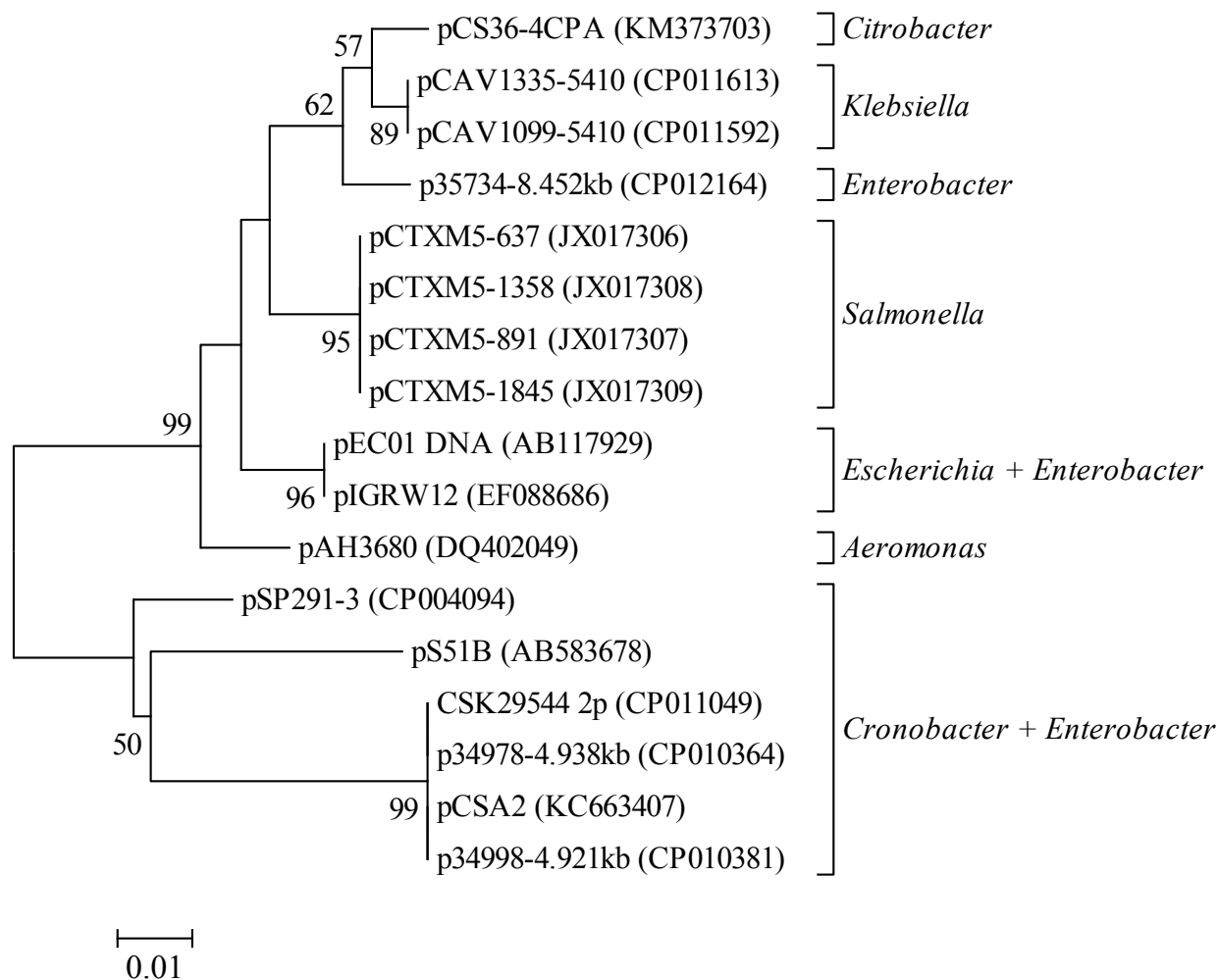


Рис. Филогенетическое дерево последовательности модуля *mrs* плазмиды pCS36-4CPA. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap-анализа» (значащими признаются величины показателя «bootstrap» более 50)

Из рис. видно, что гомологи *mrs* группируются согласно видовой принадлежности их бактериальных хозяев. Исключение составляет род *Enterobacter*, представители которого присутствуют в нескольких кластерах. Это факт может быть объяснен более высокой вероятностью горизонтального распространения плазмид внутри клеток конкретного рода по сравнению с межродовым распространением. Филогенетически к *pCS36-4CPA* наиболее близки *mrs* плазмид бактерий вида *Klebsiella oxytoca* штаммов CAV1099 и CAV1335. Уровень гомологии между последовательностью *mrs pCS36-4CPA* и плазмид CAV1099 и CAV1335 составляет 98.8%. На основании филогенетического дерева можно сделать вывод о том, что высокогомологичные между собой последовательности *mrs* эволюционно произошли от двух разных предков. С учетом этих фактов можно предположить также и полифилетическое происхождение модуля *mrs*. Полученные данные хорошо согласуются с выводами Delgado и коллег [2] о том, что род *Citrobacter* имеет полифилетическое происхождение. Следует отметить, что ранее нами был показан полифилетический характер происхождения модуля репликации у малых плазмид бактерий этого рода [10].

Таким образом, в работе были проанализированы особенности филогении *mrs* плазмиды *pCS36-4CPA*. Эти данные могут быть использованы в генетической инженерии и биотехнологии для повышения стабильности плазмид с заданными свойствами.

Литература

1. Balding C., Blaby I., Summers D. A mutational analysis of the ColE1-encoded cell cycle regulator Rcd confirms its role in plasmid stability // *Plasmid*. 2006. V. 56. P. 68–73.
2. Delgado G., Souza V., Morales R., Cerritos R., González-González A., Méndez J.L., Vázquez V., Cravioto A. Genetic characterization of atypical *Citrobacter freundii* // *PLOS One*. 2013. V. 8 (9). e74120. doi:10.1371/journal.pone.0074120.
3. Sharpe M.E., Chatwin H.M., Macpherson C., Withers H.L., Summers D.K. Analysis of the ColE1 stability determinant Rcd // *Microbiol.* 1999. V. 145. P. 2135–2144.
4. Summers D.K., Beton C.W., Withers H.L. Multicopy plasmid instability: The dimer catastrophe hypothesis // *Mol. Microbiol.* 1993. V. 8 (6). P. 1031–3108.
5. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagi-

tova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T.V. Isolation and sequence analysis of *pCS36-4CPA*, a small plasmid from *Citrobacter* sp. 36-4CPA // *Saudi J. Biol. Sci.* 2018. V. 25 (4). P. 660–671. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014.

6. Анисимова Л.Г., Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Кураков А.В., Маркушева Т.В. Штамм бактерии *Serratia marcescens* с плазмидой, ответственной за деградацию хлорароматических пестицидов // *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический*. 2009. Т. 114, № 3. S1–2. С. 27–31.

7. Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Ясаков Т.Р., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Сравнительный структурно-функциональный анализ плазмид штаммов-деструкторов 2,4,5-г рода *Raoultella* // *Вестник Башкирского государственного аграрного университета*. 2013. № 2 (26). С. 13–15.

8. Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Бактериальные гены инициации деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, кодирующие α -кетолутаратзависимую диоксигеназную активность // *Успехи современной биологии*. 2017. Т. 137, № 5. С. 514–528.

9. Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Возможность использования штамма-деструктора фенола и 2,4-дихлорфенола, *Rhodococcus erythropolis* 17s, для очистки промышленных стоков // *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2017. Т. 72, № 4. С. 235–240.

10. Ясаков Т.Р., Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В., Маркушева Т.В. Анализ областей репликации плазмид ColE1-типа у бактерий рода *Citrobacter* // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2013. № 3. С. 19–22.

References

1. Balding C., Blaby I., Summers D. A mutational analysis of the ColE1-encoded cell cycle regulator Rcd confirms its role in plasmid stability. *Plasmid*, 2006, vol. 56, pp. 68–73.
2. Delgado G., Souza V., Morales R., Cerritos R., González-González A., Méndez J.L., Vázquez V., Cravioto A. Genetic characterization of atypical *Citrobacter freundii*. *PLOS One*, 2013, vol. 8 (9). e74120. doi:10.1371/journal.pone.0074120.
3. Sharpe M.E., Chatwin H.M., Macpherson C., Withers H.L., Summers D.K. Analysis of the ColE1 stability determinant Rcd. *Microbiol.*, 1999, vol. 145, pp. 2135–2144.
4. Summers D.K., Beton C.W., Withers H.L. Multicopy plasmid instability: The dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.*, 1993, vol. 8 (6), pp. 1031–3108.
5. Zharikova N., Iasakov T., Bumazhkin B.K., Patutina E.O., Zhurenko E.I., Korobov V.V., Sagitova A.I., Kuznetsov B.B., Markusheva T.V. Isolation and sequence analysis of *pCS36-4CPA*, a small plasmid from

Citrobacter sp. 36-4CPA. Saudi J. Biol. Sci., 2018, vol. 25 (4), pp. 660–671. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.014.

6. Anisimova L.G., Yasakov T.R., Zharikova N.V., Korobov V.V., Zhurenko E.Yu., Kurakov A.V., Markusheva T.V. The *Serratia marcescens* bacterium strain with the plasmid responsible for the chloroaromatic pesticides degradation. Byulleten Moskovskogo obshchestva ispytateley prirody. Otdel biologicheskiiy, 2009, vol. 114, no. 3, S1–2, pp. 27–31.

7. Zharikova N.V., Zhurenko E.Yu., Yasakov T.R., Korobov V.V., Markusheva T.V. Comparative structural and functional analysis of plasmids in the genus *Raoultella* strains degrading 2,4,5-T. Vestnik BSAU, 2013, no. 2 (26), pp. 13–15.

8. Zharikova N.V., Iasakov T.R., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Markusheva T.V. Bacterial genes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation encoding

α -ketoglutarate-dependent dioxygenase activity. Biology Bulletin Reviews, 2018, vol. 8 (2), pp. 155–167. doi: 10.1134/S2079086418020081.

9. Korobov V.V., Zhurenko E.I., Zharikova N.V., Iasakov T.R., Markusheva T.V. Possibility of using phenol- and 2,4-dichlorophenol-degrading strain, *Rhodococcus erythropolis* 17S, for treatment of industrial wastewater. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2017, vol. 72 (4), pp. 201–205. doi: 10.3103/S0096392517040083.

10. Yasakov T.R., Zharikova N.V., Zhurenko E.Yu., Korobov V.V., Markusheva T.V. The analysis of replication origins of the ColE1-type plasmids from *Citrobacter* genus bacteria. Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN, 2013, no. 3, pp. 19–21.



THE PHYLOGENY OF MULTIMER RESOLUTION SITES (MRS), HOMOLOGOUS TO THE MRS OF pCS36-4CPA PLASMID

© T.R. Iasakov, N.V. Zharikova, E.Yu. Zhurenko, V.V. Korobov, T.V. Markusheva

Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, RAS,
69, prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

This paper analyzes the phylogeny of the multimer resolution site (mrs) of the pCS36-4CPA plasmid. The plasmid was isolated from chlorophenoxyacetic acid degrading strain *Citrobacter* sp. 36-4CPA. Using a comparative analysis, homologs of mrs pCS36-4CPA were detected in 16 plasmids, the host bacteria of which belong to the family *Enterobacteriaceae*. This indicates the limitation of the propagation of homologous modules by the plasmids of this family. These data reveal the polyphyletic nature of the origin of mrs in the plasmids of the bacteria of the genus *Citrobacter*.

Key words: *Citrobacter*, multimer resolution site (mrs), plasmid, stability module.