

**АНАЛИЗ ОБЛАСТЕЙ РЕПЛИКАЦИИ ПЛАЗМИД ColE1-ТИПА
У БАКТЕРИЙ РОДА *CITROBACTER***

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

Проведен поиск и анализ последовательностей ДНК плазмид бактерий рода *Citrobacter*. Выявлены плазмиды рCRP3 и рСКОЗ, имеющие сходные области контроля репликации (*ori*) и установлены их филогенетические взаимоотношения с плазмидами семейства ColE1.

Ключевые слова: область репликации, последовательность, плазида, бактерии, *Citrobacter*, NCBI.

К бактериям рода *Citrobacter* отнесены факультативно анаэробные грамотрицательные прямые палочки семейства *Enterobacteriaceae* [1]. Представители этого рода, отличительной особенностью которых является широкий спектр метаболической активности, широко распространены в окружающей среде, обитают в почве, воде, пищевых продуктах, в кишечном тракте млекопитающих [2–3]. К примеру, известны способности цитробактеров синтезировать шикимовую кислоту, глюкозамин и др. [4–5], и, наряду с этим, деградацию ряда ксенобиотиков, среди которых отмечены синтетические красители разнообразной природы, ароматические соединения (фенол и др.), полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и др. [6–7]. Известны патогенные виды *C. koseri* и *C. freundii*, являющиеся причиной менингитов, диареи и других заболеваний людей и животных [8–10]. Вместе с тем важные особенности строения и функционирования геномов, в частности плазмид и их областей репликации, у представителей рода *Citrobacter* остаются во многом неизвестными.

Цель настоящей работы – идентификация и сравнительная характеристика областей репликации плазмид бактерий рода *Citrobacter*.

Условия эксперимента. Последовательности ДНК плазмид были получены из меж-

дународной базы данных NCBI. Множественное и попарные выравнивания, а также построение филогенетических деревьев проводилось с помощью программы Mega4 [11]. Эволюционная история была получена с использованием алгоритма Neighbor-Joining [12]. Эволюционные расстояния были рассчитаны методом Maximum Composite Likelihood [11]. Статистическая достоверность порядка ветвления оценена с помощью бутстрэп-анализа [13].

Результаты. Анализ последовательностей ДНК плазмид бактерий рода *Citrobacter* размером до 10 т.п.о., депонированных в NCBI, позволил выявить плазмиды рCRP3 и рСКОЗ.

По результатам множественного и попарного выравнивания были выявлены области плазмид рCRP3 и рСКОЗ, обладающие значительным сходством с *ori* плазмид семейства ColE1. В формате программы MEGA4 было установлено, что гомология с ColE1 составила около 81% в случае плазмиды рCRP3 и около 74% – для плазмиды рСКОЗ.

Принимая во внимание то, что основу семейства ColE1 составляют подробно изученные ранее плазмиды, такие как рRK2, р29807, р15A, CloDF, последовательности ДНК этих плазмид были подвергнуты сравнительному анализу.

ЯСАКОВ Тимур Рамилевич – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: yasakov@anrb.ru
ЖАРИКОВА Наталья Владимировна – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: tvmark@anrb.ru
ЖУРЕНКО Евгения Юрьевна – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: tvmark@anrb.ru
КОРОБОВ Владислав Викторович – к.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: tvmark@anrb.ru
МАРКУШЕВА Татьяна Вячеславовна – д.б.н., Институт биологии УНЦ РАН, e-mail: tvmark@anrb.ru

Характеристики плазмид семейства ColE1 и несущих их штаммов

Плазмида	Номер доступа в GenBank	Размер, п.о.	Бактериальный источник
pCRP3	AF311902	3172	<i>Citrobacter. rodentium</i> ATCC 51459
pCKO3	CP000823	9294	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895
ColE1	J01566	6646	<i>Escherichia coli</i> pEW2762 и pMM1
ClоDF	X04466	9957	<i>Escherichia coli</i> K12 P678-54
pRK2	AY639886	5360	<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637
p29807	AJ132618	2682	<i>Yersinia enterocolitica</i> #29807

В табл. 1 приведены характеристики плазмид и бактериальных штаммов, которые были использованы в работе.

На рис. 1 приведено филогенетическое древо, построенное на основе сравнения областей репликации с аналогичными областями ранее описанных плазмид семейства ColE1.

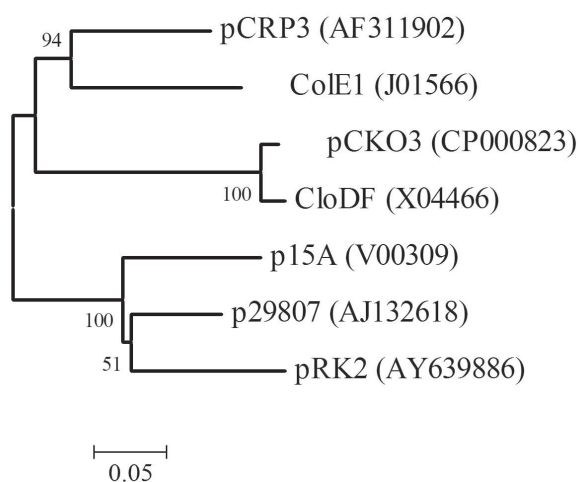


Рис. 1. Филогенетическое древо областей репликации плазмид pCRP3 и pCKO3. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстрэп-анализа (значимыми признаются величины показателя «bootstrap» более 50).

Результаты филогенетического анализа показали, что, согласно установленным особенностям строения областей репликации, обе исследуемые малые плазмиды pCRP3 и pCKO3 представителей рода *Citrobacter* относятся к семейству ColE1. При этом pCRP3 образует кластер с плазмидой ColE1, а pCKO3 с другой плазмидой ClоDF.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что обе плазмиды несут области контроля репликации, имеющие общее происхождение, но эволюционирующие в разных направлениях.

Следует отметить, что плазмиды, обладающие областью репликации ColE1-типа, в настоящее время можно отнести к интенсивно изучаемым объектам. Это связано с тем, что данный тип организации области репликации свойственен большому числу малых плазмид, которые, в свою очередь, имеют широкое распространение среди различных таксонов бактерий.

Таким образом, в настоящей работе были идентифицированы области контроля репликации плазмид pCRP3 и pCKO3 бактерий рода *Citrobacter* и показано, что плазмиды pCRP3 и pCKO3 могут быть классифицированы как плазмиды семейства ColE1.

Работа выполнена при содействии программ Президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов», «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», а также гранта Республики Башкортостан молодым ученым и молодежным научным коллективам (2012) и госконтракта № 14.512.11.0077 ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы».

ЛИТЕРАТУРА

1. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. В 2 т. М.: Мир, 1997. 799 с.

2. Mohanty S., Singhal R., Sood S., Dhawan B., Kapil A., Das B.K. *Citrobacter* infections in a tertiary care hospital in Northern India // *Journal of Infection*. 2007. V. 54. P. 58–64.
3. Sakimbaeva S.D. Dependence of the dynamics of the multiplication of bacteria in the genus *Citrobacter* on the temperature factor and on the product type in experimental contamination // *Vopr Pitan*. 1985. V. 4. P. 56–59.
4. Ghosh S., Chisti Y., Banerjee U.C. Production of shikimic acid. *Biotechnology // Advances*. 2012. V. 30(6). P. 1425–1431.
5. Kim Y.-M., Lee S.-E., Park B.-S., Son Mi-K., Jung Y.-Mi, Yang S.-Ok, Choi H.-K., Hur S.-Ho, Yum J.H. Proteomic Analysis on Acetate Metabolism in *Citrobacter* sp. BL-4 // *Int. J. Biol. Sci*. 2012. V. 8(1). P. 66–78.
6. Li F., Zhu L. Effect of surfactant-induced cell surface modifications on electron transport system and catechol 1,2-dioxygenase activities and phenanthrene biodegradation by *Citrobacter* sp. SA01 // *Bioresource Technology*. 2012. V 123, P. 42–48.
7. Mohite B.V., Pawar S.P., Morankar A. Isolation, Selection and Biodegradation Profile of Phenol Degrading Bacteria from Oil Contaminated Soil // *Bull Environ Contam Toxicol*. 2011. V. 87. P. 143–146.
8. Bai L., Xia S., Lan R., Liu L., Ye C., Wang Y., Jin D., Cui Z., Jing H., Xiong Y., Bai X., Sun H., Zhang J., Wang L., Xu J. Isolation and Characterization of Cytotoxic, Aggregative *Citrobacter freundii* // *PLoS ONE*. 2012. 7(3), e33054. doi:10.1371/journal.pone.0033054.
9. Deng W., Li Y., Vallance B.A., and Finlay B.B. Locus of Enterocyte Effacement from *Citrobacter rodentium*: Sequence Analysis and Evidence for Horizontal Transfer among Attaching and Effacing Pathogens // *Infect Immun*. 2001. V. 69(10). P. 6323–6335.
10. Samonis G., Karageorgopoulos D.E., Kofteridis D.P., Matthaiou D.K., Sidiropoulou V., Maraki S., Falagas M.E. *Citrobacter* infections in a general hospital: characteristics and outcomes // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009. V. 28(1). P. 61–68.
11. Tamura K., Nei M., and Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 2004. V. 101. P. 11030–11035.
12. Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. V. 4. P. 406–425.
13. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. V. 39. P. 783–791.



ColE1-TYPE REPLICATION ORIGINS OF THE GENUS *CITROBACTER*

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

Citrobacter plasmids with ColE1-type replication origin were searched among sequences available in the NCBI database. Phylogenetic relationships between them and ColE1 family plasmids were clarified.

Key words: replication origin, sequence, plasmid, bacteria, *Citrobacter*, NCBI.