

На правах рукописи

Петрова

ПЕТРОВА МАЙЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К
СОЕДИНЕНИЯМ РТУТИ И АНТИБИОТИКАМ В ПРИРОДНЫХ
ПОПУЛЯЦИЯХ ПАЛЕОБАКТЕРИЙ**

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук, г. Москва.

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

доктор биологических наук

Миндлин Софья Захаровна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Смирнов Георгий Борисович

д.б.н., чл.-корр. РАМН, профессор,
главный научный сотрудник

ФГБУ Институт физико-химической медицины ФМБА

Прозоров Александр Александрович

д.б.н., профессор,

главный научный сотрудник

ФГБУ науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Хмель Инесса Александровна

д.б.н., профессор,

зав. лабораторией

ФГБУ науки Институт молекулярной генетики РАН

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится “_____” _____ 2013 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

Автореферат разослан “___” _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Т. А. Синельщикова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Результаты многочисленных исследований полных геномов прокариот и эукариот свидетельствуют о существовании горизонтального переноса генов между разными видами и даже царствами живых организмов. В связи с этим механизмы эволюции предстают в совершенно ином свете. Биосфера теперь представляется единой информационной средой, в которой вирусы и другие мобильные элементы распространяют генетическую информацию. Особенно активно горизонтальный перенос происходит у прокариот. Получается, что любое "удачное изобретение" одного из видов бактерий становится доступным и может быть заимствовано всеми остальными, что позволяет им быстро адаптироваться к самым различным изменениям и неблагоприятным воздействиям внешней среды. Неприятными для человека последствиями такой способности бактерий являются возникновение новых патогенных штаммов у ранее непатогенных бактерий, а также быстрое распространение множественной устойчивости к антибиотикам среди клинических штаммов, что создает проблемы для медицины и вызывает уже сильную тревогу в связи с неэффективностью дальнейшего использования антибиотиков в лечебных целях (Gillings & Stokes, 2012; Millar, 2012).

Исследования механизмов горизонтального переноса и, в частности, механизмов возникновения и распространения множественной лекарственной устойчивости активно ведутся во многих лабораториях мира. Вопрос о масштабах и механизмах горизонтального переноса генов в природных популяциях представляет не только большой научный интерес с точки зрения исследования механизмов эволюции геномов бактерий, но имеет и прикладное значение в связи с необходимостью оценки риска интродукции бактерий, созданных методами генной инженерии, в природные экосистемы. Несмотря на огромное количество работ, выполненных по этой теме, интерес к таким исследованиям не снижается. Следует отметить, что все современные теории, касающиеся происхождения как самих генов устойчивости к антибиотикам, так и мобильных элементов, участвующих в их горизонтальном переносе, в основном базируются на изучении клинических бактерий, которые живут в условиях сильного искусственного селективного давления, вызванного применением лекарственных препаратов. Несомненно, что для их подтверждения необходимо изучение природных бактерий. Но таких работ крайне мало. К тому же, по мнению самих исследователей, в этих случаях нельзя исключить возможности вторичного занесения детерминант устойчивости, например из больниц или фермерских хозяйств, что не позволяет делать однозначных выводов из этих исследований (D'Costa et al., 2004). Очевидно одно, что проблема антибиотикорезистентности среди клинически значимых микроорганизмов уходит своими корнями в сложные экологические и эволюционные отношения между самими микроорганизмами, сложившиеся задолго до появления человека как биологического вида.

В лаборатории молекулярных основ генетики (ЛМГО) ИМГ РАН на протяжении многих лет на примере детерминант устойчивости к соединениям ртути велось изучение горизонтального переноса генов среди бактерий из природных источников. Было показано, что в природных популяциях

обнаруживается сравнительно небольшое число одних и тех же типов ртутных транспозонов и *mer*-оперонов, составляющих общий генофонд различных групп грамотрицательных бактерий на всей планете. В связи с этими данными возник вопрос: не является ли такое доминирование небольшого числа детерминант устойчивости в природных микробиоценозах следствием антропогенного загрязнения биосферы. С другой стороны, гены устойчивости к ртути и антибиотикам часто входят в состав одних и тех же R-плазмид и транспозонов, преимущественно из подгруппы Tn21 (Liebert et al., 1999), причем такие транспозоны обнаруживаются не только в клинике, но и в природе. Из всего вышесказанного становится очевидным, что для разрешения всех вопросов, связанных с возникновением, эволюцией и распространением детерминант устойчивости как к ртути, так и к антибиотикам, необходимо исследовать бактерии из экосистем, никогда не подвергавшиеся антропогенному воздействию. Уникальную возможность для изучения всего комплекса проблем, связанных с происхождением детерминант устойчивости и механизмами их переноса у природных штаммов, предоставляют бактериальные сообщества из многолетнемерзлых отложений. К настоящему времени показано, что микробные сообщества, законсервированные естественным путем в толще мерзлых пород, способны сохранять жизнеспособность в течение тысяч и даже миллионов лет (Vogobuyova et al., 1997). Часто в многолетнемерзлых грунтах содержание жизнеспособных бактерий не намного меньше, чем в современных тундровых почвах. Однако, несмотря на принципиальную значимость исследований устойчивых штаммов микроорганизмов из мерзлоты, до самого последнего времени их изучению почти не уделяли внимания. Были опубликованы только отдельные работы, свидетельствующие о присутствии устойчивых к антибиотикам штаммов среди бактерий, выделенных из мерзлых осадков (Tiedje et al., 1994; Ponder et al., 2005). Однако каких-либо систематических исследований с целью сравнительного изучения детерминант устойчивости древних и современных бактерий до последнего времени не проводилось.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было сравнительное изучение детерминант устойчивости к ртути и антибиотикам древних (выделенных из многолетнемерзлых грунтов) и современных бактерий.

В задачи данного исследования входило:

1. Выделить устойчивые к ртути и антибиотикам древние бактерии из образцов многолетнемерзлых отложений, дать их первичную характеристику и создать коллекцию штаммов палеобактерий.
2. Идентифицировать у штаммов из мерзлотной коллекции известные гены устойчивости к ртути и антибиотикам и несущие их транспозоны.
3. Выявить плазмиды, содержащие гены устойчивости к ртути и антибиотикам у штаммов палеобактерий.
4. Выделить активные транспозоны, содержащие гены устойчивости к ртути и антибиотикам из штаммов древних бактерий и охарактеризовать их.
5. Определить молекулярно-генетическую структуру ранее неизвестных транспозонов, обнаруженных у древних бактерий, и изучить их распространение.

6. Провести сравнительный анализ молекулярно-генетической структуры транспозонов древних и современных бактерий.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые была создана и охарактеризована коллекция устойчивых к ртути и антибиотикам бактерий из многолетнемерзлых отложений. Штаммы из созданной коллекции используются в фундаментальных научных исследованиях не только в нашей лаборатории, но и в других российских и зарубежных научных коллективах (например Mindock et al., 2001; Arbatsky et al., 2010 и др.). В настоящей работе показано значительное разнообразие детерминант устойчивости, содержащихся у штаммов этой коллекции. У древних бактерий обнаружены транспозоны, высокомологичные широко распространённым современным природным транспозонам. В то же время у древних бактерий выявлены ранее неизвестные мобильные элементы. Так, впервые обнаружен и исследован простой транспозон, содержащий *mer*-оперон, названный Tn5060, близкородственный гипотетическому предку сложного транспозона множественной лекарственной устойчивости Tn21, широко распространённого среди современных, в том числе и клинических, штаммов бактерий. Одновременно с ним в мерзлоте в составе ранее неизвестного комплексного транспозона Tn5045 обнаружен интегрон InC*, родственник гипотетическому предшественнику подгруппы современных интегров In2-In5, активно участвующих в распространении множественной лекарственной устойчивости. Транспозон Tn5060 и интегрон InC* являются недостающими до этого звеньями в схемах происхождения и эволюции комплексных транспозонов множественной лекарственной устойчивости и содержащихся у них интегров. Также нами обнаружен и охарактеризован ранее неизвестный ртутный транспозон Tn5042, транспозиционный модуль которого принадлежит к IS элементам. Показано, что Tn5042 является еще одним, ранее неизвестным, типом ртутных транспозонов, активно участвующих в горизонтальном переносе генов *mer*-оперона как среди древних, так и среди современных штаммов природных бактерий. В мерзлоте также обнаружен необычный по ряду свойств IS-элемент, *ISPsy1*, обладающий способностью к мобилизации с высокой частотой прилежащих к нему генов устойчивости к антибиотикам посредством одноконцевой транспозиции или путем формирования новых составных транспозонов. Результаты изучения Tn5042 и *ISPsy1* вносят существенный вклад в понимание роли IS-элементов в распространении различных детерминант устойчивости. Полученные данные свидетельствуют о том, что широко распространённые среди современных природных штаммов бактерий детерминанты устойчивости возникли и перемещались задолго до начала антропогенного загрязнения биосферы.

В целом полученные в ходе данного исследования новые научные данные значительно дополняют и уточняют существующие представления о происхождении и эволюции различных типов детерминант устойчивости и путях их распространения. Результаты работы могут быть использованы при составлении курсов лекций для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям в области общей генетики, молекулярной генетики и медицины.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: 3 и 5 съездах ВОГиС (Москва, 2004 г. и 2009 г.); VI Международной научной конференции «Экология человека и природа» (Москва-Плес, 2004 г.); Российской школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология», посвящённой 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна (Москва-Пушино, 2006 г.); II Международной конференции «Биосфера: происхождение и эволюция» (Греция, 2007 г.); II Международной конференции BioMicroWorld2007 (Испания, 2007 г.); XX Международном генетическом конгрессе (Германия, 2008 г.); двустороннем франко-русском семинаре «Транскрипция – от основных механизмов к разработке лекарств» (Франция, 2009 г.); X европейском конгрессе по астробиологии (Пушино, 2010 г.).

Публикации. По результатам работы было опубликовано 16 статей в рецензируемых научных изданиях, 4 главы в тематических сборниках и 10 тезисов международных и всероссийских конференций.

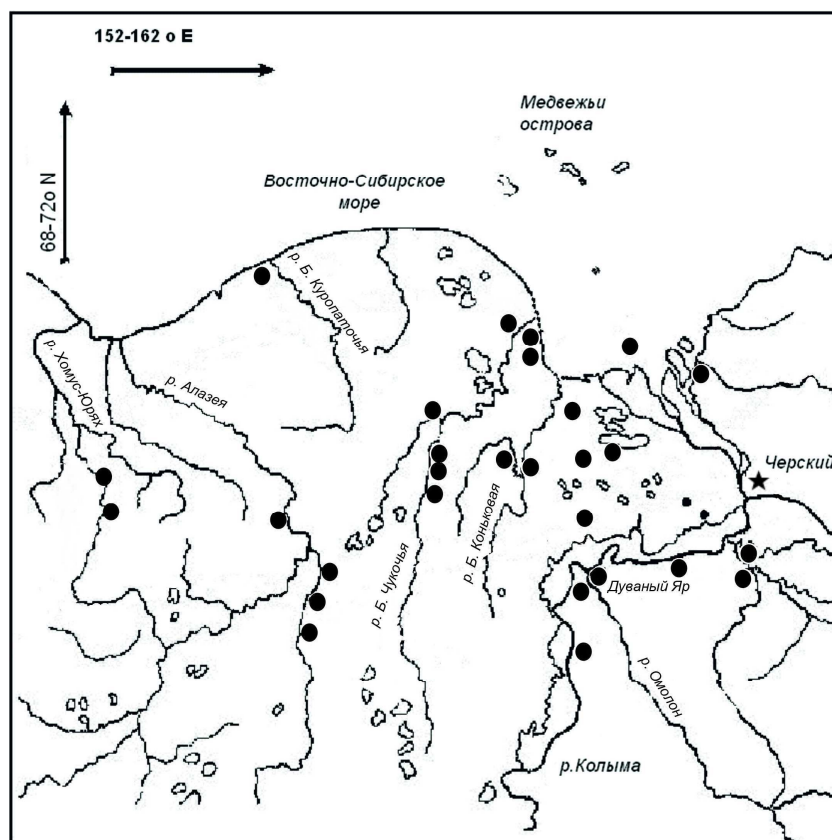
Декларация личного участия автора в получении научных результатов. Автор участвовала в экспедициях по отбору образцов многолетнемерзлых отложений. Автором спланировано и выполнено большинство (80%) экспериментов, проведена обработка и анализ результатов и их подготовка к публикации. Основная часть исследований выполнена в руководимом автором Секторе анализа и хранения микроорганизмов (ЛМГМ ОМГК) ИМГ РАН в соавторстве с сотрудниками ЛМГМ С.З. Миндлин, Ж.М. Горленко, Г.Я. Холодием, Н.А. Хачикян, Н.А. Щербатовой. Образцы многолетнемерзлых пород и их геологическая характеристика были предоставлены Д.А. Гиличинским (Лаборатория криологии почв, Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН). Некоторые штаммы бактерий были предоставлены В.С. Соиной (Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова) и В.А. Щербаковой (Всероссийская коллекция микроорганизмов).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, приложения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 252 страницах машинописного текста и содержит 21 рисунок и 18 таблиц. Библиография включает 270 названий, в том числе 24 русских и 246 иностранных.

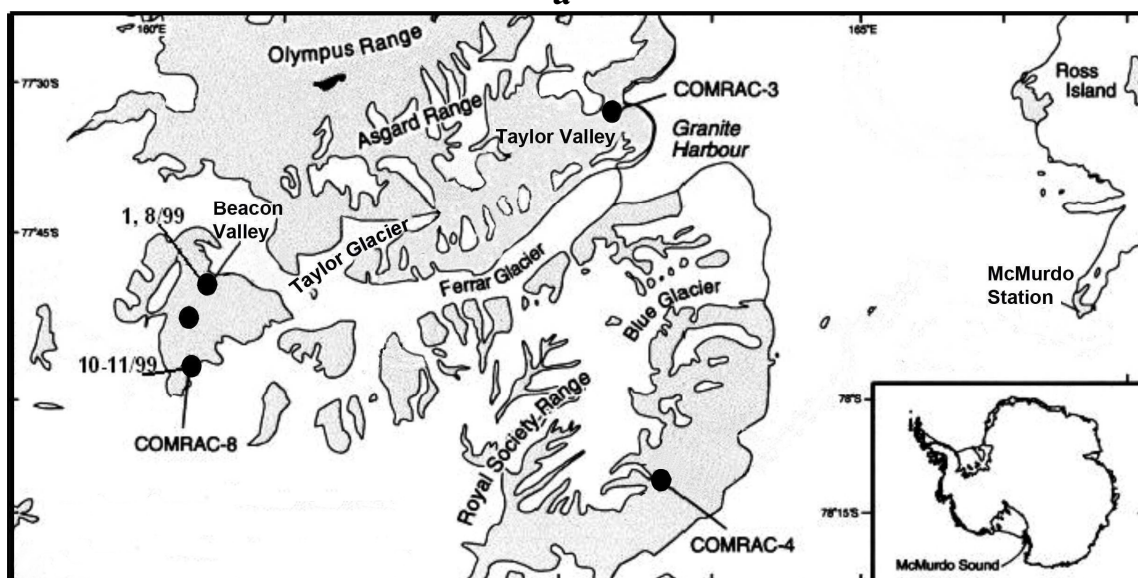
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Создание коллекции древних бактерий, устойчивых к ртути и антибиотикам

Для выделения бактерий использовали образцы многолетнемерзлых древних осадочных пород, ледового грунта (ледогрунта) и льда, отобранные в приполярных районах Арктики и Антарктики. Арктические образцы были отобраны в районе Колымской низменности и побережья моря Лаптевых. Антарктические образцы были отобраны в свободных ото льда полярных пустынях Антарктиды (Victoria Land, Dry Valleys) вблизи американской



а



б

Рисунок 1. Места отбора образцов многолетнемерзлых грунтов в районе Колымской низменности (а) и Антарктиде (б) обозначены черными точками.

антарктической станции Mc Murdo (рис. 1). Возраст пород, из которых были отобраны исследованные образцы, составляет от 5 тысяч до 3 млн. лет. Методика отбора, доставки и хранения образцов исключала возможность их оттаивания и заражения посторонними микроорганизмами (Звягинцев и др., 1985; Vorobyova et al., 1997).

Перед началом работ по выделению устойчивых бактерий из этих образцов необходимо было иметь гарантии того, что выделяемые из мерзлоты микроорганизмы действительно являются древними, а не были занесены туда

позднее с водой по микротрещинам из современной почвы или в процессе отбора образцов. Без строгого доказательства этого, сравнение древних детерминант устойчивости с современными теряло бы всякий смысл.

На сегодняшний день результаты многочисленных микробиологических исследований многолетнемерзлых грунтов дают нам все основания считать, что штаммы, выделяемые из мерзлоты, являются действительно современниками мамонтов. В пользу этого вывода свидетельствуют следующие микробиологические и геологические данные:

1) Миграция почвенной микрофлоры в более глубокие подпочвенные слои не может происходить из-за наличия мерзлоты, которая полностью препятствует просачиванию воды с поверхности, т.к. даже если в подпочвенном слое и образуются микротрещины, попавшая в них вода тут же замерзает. Ведь температура мерзлоты и зимой, и летом составляет $-10-18$ °С. Сезонное оттаивание происходит лишь до глубины 0,5-0,6 м, т.е. только в пределах почвенного профиля (Vorobyova et al., 1997).

2) Обнаружение в пробах многолетнемерзлых пород анаэробных микроорганизмов (Rivkina et al., 1998), которые не могли попасть туда из воздуха в процессе отбора образцов.

3) Выделение из мерзлоты редких видов микроорганизмов, не характерных для современных тундровых почв (Vorobyova et al., 1997).

4) Обнаружение образцов, в которых отсутствуют жизнеспособные микроорганизмы (Vorobyova et al., 1997, а также наши данные).

5) Отсутствие существенных различий по численности и качественному составу микроорганизмов, выделяемых из одних и тех же образцов, проанализированных в экспедиции, сразу же после извлечения их из скважины, и затем после хранения и доставки их в лабораторию в Москве (Звягинцев и др., 1985).

6) При разных вариантах искусственного заражения керн или образцов тест-культурой, ее никогда не удавалось обнаружить при последующем посеве, проведенном по стандартной методике (Хлебникова и др., 1990 и наши данные).

7) При сравнении результатов метагеномного анализа структуры бактериальных сообществ (по анализу нуклеотидных последовательностей генов 16S РНК) с результатами идентификации выделенных штаммов из одних и тех же образцов оказалось, что все группы бактерий, идентифицированные с помощью метагеномного метода, обнаруживаются и при посеве. Более того, часть сиквенсов генов 16S РНК клонов и штаммов полностью идентичны. Следует особо подчеркнуть, что метагеномные и микробиологические исследования проводились в разное время и в разных лабораториях (Vishnivetskaya et al., 2006).

8) Метагеномными методами гены устойчивости к антибиотикам (тетрациклину - *tetM*, лактамам – *bla* и ванкомицину - *vanX*), родственные современным, в том числе и клиническим, были обнаружены в образцах мерзлоты Аляски возрастом 30 тысяч лет (D'Costa et al., 2011).

Следовательно, микроорганизмы, в том числе и устойчивые к антибиотикам, выделяемые из мерзлоты, действительно являются представителями древних микробных сообществ. Таким образом, многолетнемерзлые отложения представляют собой уникальный природный субстрат, где микроорганизмы законсервированы в течение сотен и тысяч лет в замороженном состоянии,

Таблица 1. Характеристика мерзлых образцов и численность выделяемых из них жизнеспособных бактерий (выборочные данные)

Район отбора образцов	Название скважины	Возраст отложений ¹	Глубина отбора образцов, м	Численность жизнеспособных бактерий ²
Побережье моря Лаптевых	1/01-DAV	15-40 тыс. лет	28,0	$1,5 \times 10^2$
	03/03-Тикси	220-290 тыс. лет	2,0	$1,2 \times 10^7$
			16,0	$2,2 \times 10^3$
	12/03-Тикси	220-290 тыс. лет	5,0	$7,2 \times 10^6$
3/01-DC	220-290 тыс. лет	22,5	$1,0 \times 10^7$	
Колымская низменность				
Берег р. Хомус-Юрях	11/89	2-3 млн. лет	24,0	$6,8 \times 10^2$
			25,5	$1,4 \times 10^3$
Берег р. Б. Чукочьа	1/91	2-3 млн. лет	34,0	$4,2 \times 10^4$
Берег р. Б. Чукочьа	2/94	2-3 млн. лет	39,9	$4,4 \times 10^2$
Берег р. Хомус-Юрях	4/93	200-220 тыс. лет	4,0	$8,7 \times 10^3$
Берег р. Хомус-Юрях	3/93	200-600 тыс. лет	6,0	$6,2 \times 10^3$
Побережье Восточно-сибирского моря	4/99	15-35 тыс. лет	13,6	$2,0 \times 10^6$
			14,6	$5,0 \times 10^5$
Берег Б. Олерского оз..	1/95	3-5 тыс. лет	1,8	$4,8 \times 10^4$
			8,8	$7,8 \times 10^4$

¹ Соответствует периоду нахождения осадков в мерзлом состоянии.

² Численность жизнеспособных бактерий по числу колоний (КОЕ), выросших на питательной среде при 25°C.

сохраняя при этом специфические особенности, присущие древним микробоценозам.

В данной работе исследовано более 130 образцов многолетнемерзлых отложений. В большинстве из них обнаружены жизнеспособные бактерии в количестве, превышающем 10^4 КОЕ на 1 г грунта. Как это уже отмечалось другими авторами, среди выросших бактерий преобладают грамположительные штаммы. Однако устойчивыми к соединениям ртути и антибиотикам чаще оказывались грамотрицательные штаммы. Как грамположительные, так и грамотрицательные устойчивые бактерии, удалось выделить из образцов разного возраста, генезиса и географического положения (см. табл. 1).

Большинство выделенных штаммов древних бактерий способны расти при температуре от -1°C до +25(30)°C, и соответственно являются психротрофами. Среди отобранных для дальнейших исследований штаммов грамположительных бактерий, устойчивых к ртути и антибиотикам, были представители родов *Paenibacillus*, и *Exiguobacterium*, а среди грамотрицательных *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Psychrobacter*, *Xanthomonas*, *Plesiomonas*, *Sphingomonas*. Следует отметить, что бактерии тех же систематических групп были выделены из других образцов многолетнемерзлых отложений, и среди них, так же, как и в нашей коллекции, было много штаммов-психротрофов (Vorobyova et al., 1997).

**Таблица 2. Спектры устойчивости штаммов палеобактерий
(выборочные данные)**

Штамм	Район ¹	Возраст, тыс. лет ²	Систематическое положение	Спектр устойчивости ²
ED23-35	A	15-40	<i>Acinetobacter</i> sp.	Hg, Sm
M2-7	A	15-40	<i>Acinetobacter jonsonii</i>	Hg, Ap, Tp
MR5-8	A	15-40	<i>Acinetobacter</i> sp.	Ap, Cm, Gm, Km, Tb
VS15	A	200	<i>Acinetobacter</i> sp.	Ap, Cm, Sm, Sp
MR29-12	A	15-35	<i>Psychrobacter maritimus</i>	Sm, Tc, Tp
MR7-1	A	200-390	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Cm, Gm, Cb, Km, Nm, Sp, Tc, Tp
MR7-3	A	200-390	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Ap, Cm, Gm, Km, Nm, Sp, Tp
MR9-2	A	15-40	<i>Stenotrophomonas retroflexus</i>	Ap, Cm, Gm, Km, Nm, Sp, Tp
ED23-9	A	15-40	<i>Sphingomonas</i> sp.	Gm, Km, Nm, Sm, Tb
EK42	B	50-300	<i>Sphingomonas mucosissima</i>	(Ap), Sm
ED94-62a	A	20-40	<i>Pseudomonas</i> sp.	Hg
A19-1	A	5-10	<i>Pseudomonas</i> sp.	Hg
ED23-10	A	15-40	<i>Pseudomonas libanensis</i>	Hg, Cb, Cm, Sp, Tp
ED23-26	A	15-40	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Hg, Cb, Cm, Km, Sp, Tp
EDM6-1	A	15-40	<i>Pseudomonas</i> sp.	Hg, Cb, Tp
VS38	A	3-5	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cm, Cb, Sm, Sp, Su, Tc, Tp, Nal
Tik1	A	200-600	<i>Pseudomonas putida</i>	Hg, Cm, Cb, Sm, Sp, Tp
Tik3	A	200-600	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cm, Sm, Sp, Su, Tp
EK41	B	50-300	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Ap, Sm
MRI-1	A	3-5	<i>Paenibacillus amyloliticus</i>	Sm, (Sp)
VSH72	A	200-600	<i>Paenibacillus amyloliticus</i>	Sm, (Ap)
EK63	B	50-300	<i>Paenibacillus</i> sp.	Sm, (Ap), (Sp)

¹ А-Арктика, Б-Антарктида

²Использованные концентрации антибиотиков (мкг/мл) и их обозначения: Ампициллин (Ap) – 200, карбенициллин (Cb) – 400, хлорамфеникол (Cm) – 20, гентамицин (Gm) – 5, канамицин (Km) – 25, неомицин (Nm) – 25, тобрамицин (Tb) – 40, стрептомицин (Sm) – 50, спектиномицин (Sp) – 100, сульфатазидол (Su) – 25, налидиксовая кислота (Nal) – 20, тетрациклин (Tc) – 15, триметоприм (Tp) – 25, HgCl₂ (Hg) – 5; наличие скобок указывает на низкий уровень устойчивости. Устойчивости к карбенициллину всегда сопутствовала и устойчивость к ампициллину.

При изучении спектра устойчивости выделенных штаммов обнаружено, что многие из них обладают устойчивостью одновременно к нескольким антибиотикам, причем различных классов. Данные о спектрах устойчивости выделенных штаммов палеобактерий выборочно представлены в таблице 2. Полученные данные были достаточно неожиданными, поскольку в литературе имеются сведения о том, что до начала применения антибиотиков в медицине устойчивые клинические штаммы бактерий составляли менее 3%, причем устойчивы они были только к одному антибиотику. Полученные нами

результаты показали, что у природных штаммов бактерий происходит формирование множественной устойчивости, по-видимому, в результате длительного тесного контакта в почве с продуцентами антибиотиков.

Таким образом, была создана коллекция древних бактерий, устойчивых к соединениям ртути (Hg-r) и различным антибиотикам, которая использовалась в дальнейших исследованиях детерминант устойчивости и ассоциированных с ними мобильных элементов.

2. Первичный анализ детерминант устойчивости у древних штаммов

2.1. Определение наличия *mer*-оперона

Устойчивость бактерий к соединениям ртути, в большинстве случаев, обеспечивается присутствием *mer*-оперонов. Однако, известны и другие механизмы устойчивости. Чтобы оценить перспективность дальнейшего использования коллекции палеобактерий для проведения сравнительных исследований транспозонов, участвующих в распространении генов устойчивости к ртути у древних и современных бактерий, прежде всего, было необходимо определить, содержат ли древние Hg-r штаммы *mer*-опероны. Для определения наличия генов *mer*-оперона использовали гибридизацию иммобилизованных на нитроцеллюлозных фильтрах бактериальных колоний со специфическим зондом, содержащим большую часть *mer*-оперона (гены *merRTPCA*) (см. рис. 4а). Подавляющее большинство (34 из 37) исследованных грамтрицательных штаммов палеобактерий давали четкую гибридизацию с использованным зондом и, следовательно, содержали *mer*-оперон.

2.2. Идентификация генов устойчивости к стрептомицину

Гены устойчивости к стрептомицину отличаются небольшим разнообразием по своей молекулярной структуре и механизмам устойчивости по сравнению с генами устойчивости к другим антибиотикам. В то же время эти гены широко распространены как среди клинических, так и среди современных природных бактерий. Поэтому для оценки перспективности изучения детерминант устойчивости к антибиотикам палеобактерий был проведен скрининг генов, определяющих устойчивость именно к стрептомицину.

Для этих исследований были отобраны 25 штаммов, пять из которых были устойчивы только к стрептомицину, а 20 обладали множественной устойчивостью. У этих штаммов был проведен скрининг генов устойчивости к стрептомицину: *strA-strB*, кодирующих аминогликозидфосфотрансферазы, и *aadA*, кодирующих аминогликозид-аденилилтрансферазы (Shaw et al., 1993). Поиск этих генов проводили с помощью ПЦР, а затем подтверждали их наличие с помощью Саузерн-гибридизации со специфическими зондами к каждому гену. Гены устойчивости к стрептомицину были обнаружены в 18 штаммах (таблица 3). Гены *strA-strB* были впервые обнаружены в геномах нескольких независимо выделенных штаммов грамположительных бактерий, принадлежащих к роду *Paenibacillus*, а также у штамма грамтрицательной бактерии *Psychrobacter*. Гены *strA-strB* преимущественно встречаются у грамтрицательных бактерий, однако они были обнаружены и у грамположительных штаммов рода

Таблица 3. Характеристика устойчивых к стрептомицину штаммов бактерий, выделенных из мерзлоты (выборочные данные)

Штамм	Происхождение и возраст мерзлых осадков ^а	Систематическое положение	Фенотип ^б	Выявленные гены устойчивости
ED23-35	Берег р. Хомус-Юрях, 15-40 тыс. лет	<i>Acinetobacter</i> sp.	Hg, Sm	<i>strA-strB, aadA</i>
ED45-25		<i>Acinetobacter</i> sp.	Hg, Sm	<i>strA-strB</i>
MM8-2	Колымская низменность, 5 тыс. лет	<i>Pseudomonas putida</i>	Sm	<i>aadA</i>
MM8-10		<i>Flavobacterium/Cytophaga</i>	Gm, Km, Sm	<i>strA-strB, aadA</i>
MR5-11		<i>Acinetobacter</i> sp.	Cm, Sm	<i>strA-strB</i>
MRI-1		<i>Paenibacillus amylophilus</i>	Sm	<i>strA, strB</i>
MR29-12	Берег моря Лаптевых, 15-40 тыс. лет	<i>Psychrobacter psychrophilus</i>	Sm, Tc, Tp	<i>strA-strB</i>
Tik1	Берег моря Лаптевых, 200-600 тыс. лет	<i>Pseudomonas putida</i>	Hg, Cm, Cb, Sm, Sp, Tp	<i>strA-strB,</i>
Tik3		<i>Pseudomonas</i> sp.	Cm, Sm, Sp, Su, Tp	<i>strA-strB, aadA</i>
VS27	Колымская низменность, 2-3 млн. лет	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cm, Sm	<i>strA-strB, aadA</i>
VS15	Берег Восточно-Сибирского моря, 15-35 тыс. лет	<i>Acinetobacter</i> sp.	Cm, Sm	<i>strA-strB, aadA</i>
VSH31	Колымская низменность, 3-5 тыс. лет	<i>Paenibacillus amylophilus</i>	Sm	<i>strA-strB, aadA</i>
VS48		<i>Pseudomonas (fluorescens?)</i>	Cm, Sm	<i>aadA</i>
VS50		<i>Pseudomonas (fluorescens?)</i>	Cm, Sm	<i>aadA</i>
VS51		<i>Pseudomonas</i> sp.	Cm, Sm	<i>aadA</i>
VSH72	Колымская низменность, 200-600 тыс. лет	<i>Paenibacillus amylophilus</i>	Sm	<i>strA-strB, aadA</i>
VSH76		<i>Paenibacillus amylophilus</i>	Sm	<i>strA-strB, aadA</i>
EK41	Антарктида, 50-300 тыс. лет	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Ap, Sm	<i>strA-strB</i>

^а время нахождения отложений в мерзлом состоянии. ^б Обозначения, как в таблице 2.

Corynebacterium (Schroder et al., 2012). Этот факт свидетельствует о возможности горизонтального переноса генов *strA-strB* между грамположительными и грамотрицательными бактериями. Перемещению генов *strA-strB* способствует то, что они входят в состав широко распространенных транспозонов типа Tn5393, а также различных плазмид, в том числе и широкого круга хозяев (см. далее). Стоит отметить, что многие штаммы древних бактерий одновременно содержали гены устойчивости обоих типов. Причина этого явления неясна, однако, штаммы *E. coli*, также одновременно обладающие генами *strA-strB* и *aadA*, были выделены у домашних животных в Норвегии (Sunde & Norstrum, 2005).

Что же касается идентификации других генов устойчивости, то тут следует отметить, что штаммы с соответствующими устойчивостями с помощью

гибридизации и/или ПЦР были проверены на наличие у них известных генов устойчивости к канамицину и/или гентамицину (*aadB*, *aacA4*, *aacC1*, *aacC2*, *aacC4*, *aphA*), хлорамфениколу (*catA*, *catB*, *cmlA*) и тетрациклину (*tetA*, *tetB*, *tetC*). Однако только штамм MR29-12 давал слабую гибридизацию с зондом на ген *tetC*. Ни один другой из вышеперечисленных генов обнаружить не удалось.

3. Локализация детерминант устойчивости у древних бактерий

В распространении генов устойчивости к ртути у современных бактерий основная роль принадлежит плазмидам и транспозонам. Устойчивость к антибиотикам у бактерий может быть врожденной (intrinsic), что может быть связано, например, с наличием хромосомных генов устойчивости, а также различных систем активного выброса (efflux systems). Также устойчивость к антибиотикам может быть связана с присутствием плазмид и/или транспозонов, содержащих детерминанты устойчивости. Именно «мобилизованные» гены, которые могут быть легко переданы от одной клетки к другой с помощью горизонтального переноса и заинтересовали нас в первую очередь. В связи с этим мы провели исследования плазмидного состава и осуществили поиск транспозонов у устойчивых штаммов палеобактерий.

3.1. Детерминанты устойчивости, локализованные на плазмидах

Прежде всего, была изучена способность выделенных штаммов передавать гены устойчивости к ртути и антибиотикам при конъюгации. Для опытов по конъюгативному переносу плазмид в качестве доноров были взяты 7 штаммов рода *Acinetobacter* (5 устойчивых только к Hg и 2 – к Hg и стрептомицину), 10 – *Pseudomonas* (1 с множественной устойчивостью к антибиотикам и 9 – к антибиотикам и Hg), и один – *Psychrobacter* с множественной устойчивостью к антибиотикам. Следует отметить, что многие из содержащих плазмиды древних штаммов устойчивых к ртути были одновременно устойчивы и к антибиотикам. Такая устойчивость одновременно к ртути и антибиотикам часто наблюдается и у современных бактерий.

Таблица 4. Плазмидная локализация детерминант устойчивости

Штамм	Спектр устойчивости	Детерминанты устойчивости, локализованные на плазмидах
<i>Acinetobacter</i> sp. ED23-35	Hg, Sm, Sp	Hg, Sm
<i>Acinetobacter</i> sp. ED45-25	Hg, Sm	Hg, Sm
<i>Acinetobacter jonsonii</i> M2-7	Ap, Hg, Tp	Hg
<i>Psychrobacter maritimus</i> MR29-12	Sm, Tc, Tp	Sm, Tc
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ED23-26	Hg, Km, Cb, Cm, Sp, Tp	Hg
<i>Pseudomonas</i> sp. ED94-71	Hg, Km, Cb, Cm, Sp, Tp	Hg
<i>Pseudomonas</i> sp. EDM6-1	Hg, Cb, Tp	Hg
<i>Pseudomonas putida</i> Tik1	Hg, Sm, Cb, Cm, Sp, Tp	Hg, Sm
<i>Pseudomonas</i> sp. Tik3	Sm, Su, Cm, Sp, Tp	Sm, Su

Жирным шрифтом выделены антибиотики, локализацию которых невозможно было определить при мобилизации плазмид, по причине устойчивости к ним реципиентного штамма *Pseudomonas*.

В качестве реципиента для штаммов *Acinetobacter* и *Psychrobacter* был взят штамм *Acinetobacter calcoaceticus* BD413rif, а для псевдомонад – штамм *Pseudomonas fluorescens* P22-1. Последний штамм, как это свойственно многим псевдомонадам, обладал устойчивостью к четырем антибиотикам (Cb, Cm, Sp, Tr). По этой причине перенос детерминант устойчивости к этим антибиотикам не мог быть прослежен.

Кроме того, локализацию генов устойчивости к ртути дополнительно определяли с помощью гибридизации с зондом на *mer*-оперон препаратов плазмидных ДНК.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что у всех древних штаммов *Acinetobacter* и пяти псевдомонад детерминанты устойчивости к ртути локализованы на конъюгативных или неконъюгативных плазмидах, так же, как и у современных представителей этих родов (выборочные данные представлены в табл. 4). У двух древних штаммов *Acinetobacter* и одного *Pseudomonas* одновременно с детерминантами устойчивости к ртути на конъюгативных плазмидах были также локализованы гены устойчивости к стрептомицину. Кроме того, у одного штамма *Pseudomonas* и штамма *Psychrobacter* в состав конъюгативных плазмид входят только гены устойчивости к антибиотикам (стрептомицину и сульфатазолу и к стрептомицину и тетрациклину, соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что и в природе, задолго до начала практического применения антибиотиков, существовали конъюгативные плазмиды, несущие уже один или несколько генов устойчивости к антибиотикам. Этим фактом можно частично объяснить быстрое появление и распространение множественной устойчивости среди патогенных бактерий.

3.2. Поиск интегронов

У современных штаммов бактерий различные гены устойчивости часто включены в состав интегронов. Интегроны – это природные системы клонирования и экспрессии, способные интегрировать и затем экспрессировать так называемые генные кассеты (Rowe-Magnus, 1999, Rowe-Magnus, 2001). Впервые интегроны были найдены в составе мобильных генетических элементов, ответственных за возникновение множественной лекарственной устойчивости у патогенных бактерий, выделенных от человека, животных и растений (Collis, 1993, Stokes 1989). Каждый интегрон состоит из двух частей. Одна из них представляет собой стационарную "платформу", включающую ген *intI*, кодирующий интегразу, относящуюся к семейству тирозиновых сайтспецифических рекомбиназ (Nunes-Duby, 1998), и прилегающие к этому гену сильный промотор P_c , необходимый для экспрессии встраиваемых генных кассет, и сайт интеграции, *attI* (см. рис. 2) (Hall, 1997, Hall, 1995, Rowe-Magnus, 1999, Rowe-Magnus, 2003). Вторая часть представлена мобильными генными кассетами, состоящими из открытых рамок считывания (ORF), лишенных промотора, и сайтов рекомбинации *attC*. Интеграна IntI катализирует сайт-специфическую рекомбинацию между сайтами *attI* и *attC*, в результате чего происходит интеграция или вырезание кассеты (Collis, 1992; Collis, 1998). Генетическая организация интегронов способствует коэкспрессии генных кассет, входящих в его состав, с общего промотора P_c интегрона.

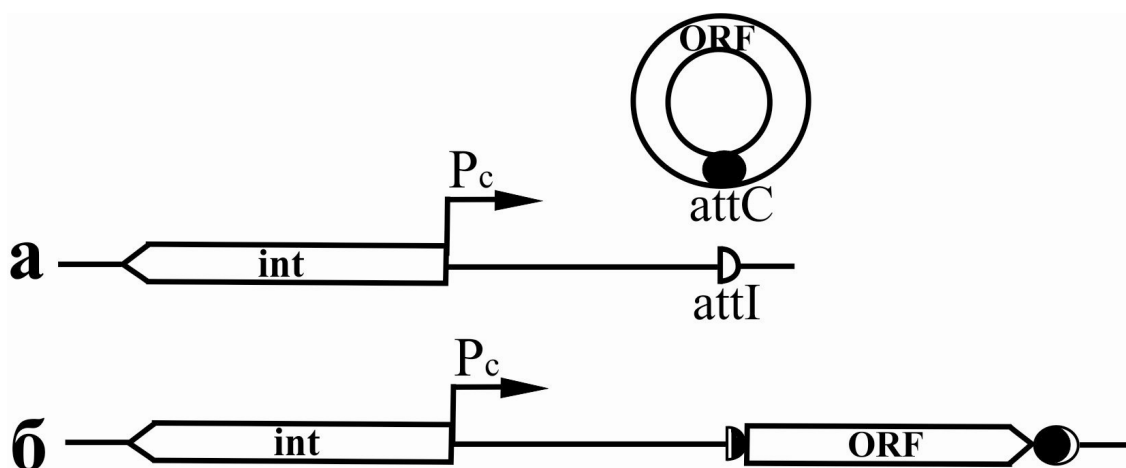


Рисунок 2. Структура интегрона.

а. Структура стационарной интегронной платформы и генной кассеты в свободной кольцевой форме. *int* – ген интегразы; P_c – кассетный промотор; *attI* – простой рекомбинационный сайт (изображен в виде белого полукруга); ORF – открытая рамка считывания генной кассеты; *attC* – *attC*-сайт (изображен, как черный овал). **б.** Интегрон с одной, встроенной в интегронную платформу, кассетой. Рекомбинантные сайты *attC/attI*, образовавшиеся после интеграции кассеты, представлены как черно-белые элементы

Среди клинических бактерий преимущественно встречаются интегроны 1 класса, тогда как среди природных штаммов их разнообразие намного выше (Nield et al., 2001). Все устойчивые к антибиотикам штаммы палеобактерий с помощью ПЦР были проверены на наличие у них интегронов 1, 2, 3 классов, наиболее часто встречающихся и хорошо изученных. Также были поставлены опыты с использованием универсальных праймеров, позволяющих амплифицировать интегразы по меньшей мере, 12 классов, а также любые интегрированные кассетные гены. В результате всех этих опытов интегрон, содержащий кассетный ген *aadA2*, был обнаружен в единственном штамме Tik3. В то же время имеются данные о том, что в современных почвах интегроны различных классов встречаются со значительной частотой (Nield et al., 2001). Все это может свидетельствовать о том, что на распространение интегронов в природе могло повлиять загрязнение биосферы, вызванное хозяйственной деятельностью человека.

3.3. Детерминанты устойчивости, входящие в состав транспозонов

Поиск транспозонов, содержащих гены устойчивости к ртути и антибиотикам, был проведен среди штаммов грамотрицательных палеобактерий. Для этого использовали три подхода: (1) выявление активных транспозонов при их мобилизации с помощью плазмид широкого круга хозяев, (2) обнаружение известных транспозонов грамотрицательных бактерий с помощью гибридизации по Саузерну со специфическими зондами и (3) ПЦР со специфическими праймерами на гены соответствующих транспозаз и детерминант устойчивости.

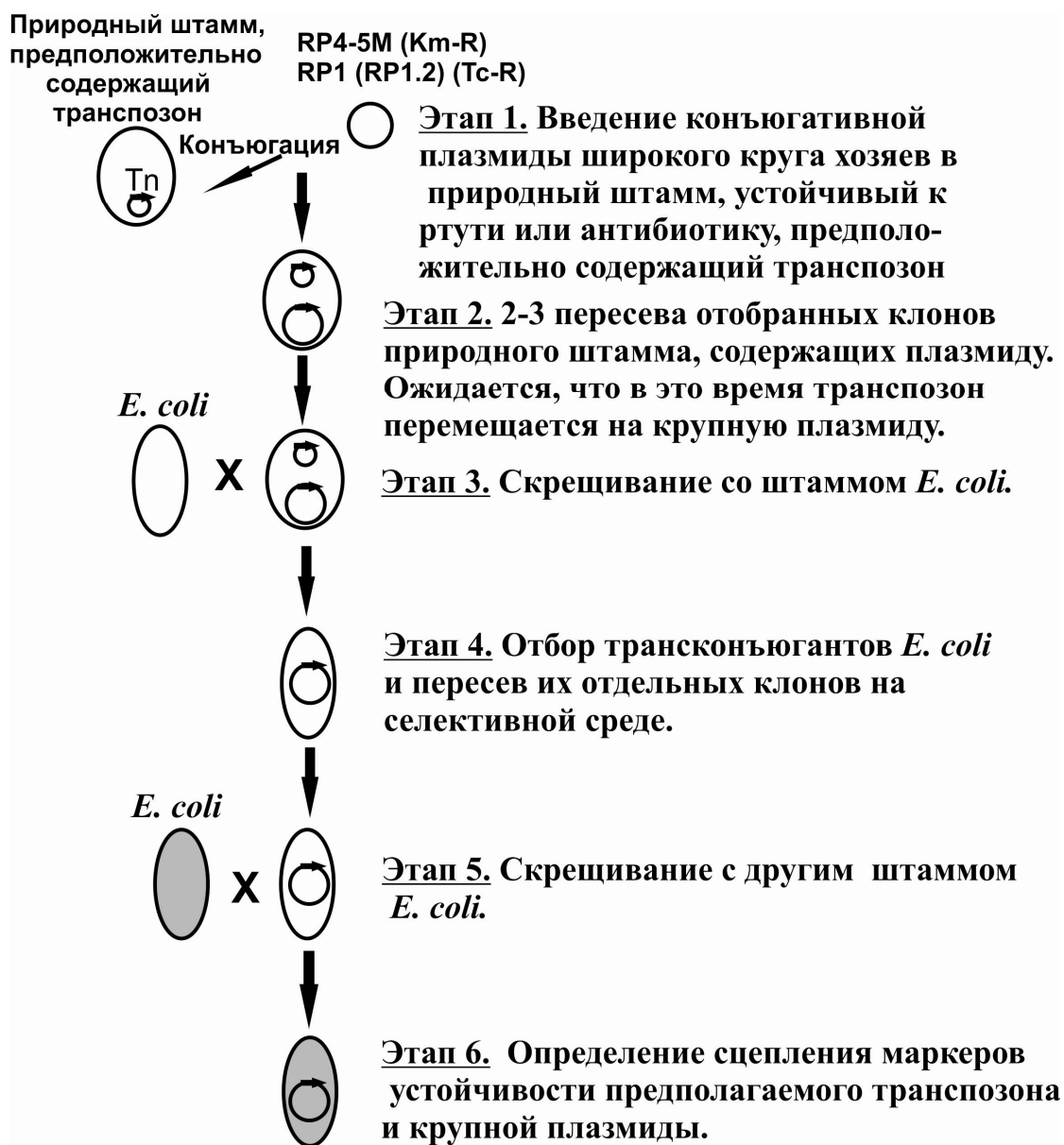


Рисунок 3. Схема процедуры выявления функционально активных транспозонов.

Для выявления активных транспозонов устойчивости к ртути и антибиотикам применили метод мобилизации детерминант устойчивости с помощью крупных плазмид широкого круга хозяев: RP1 и производных от нее RP1.2 и RP4-5M. Последовательность этапов выделения активных транспозонов на примере ртутных представлена на схеме (рис. 3). Следует особо отметить, что не во все штаммы можно ввести плазмиду RP1 (Kelly, Reaney, 1984; Kholodii et al., 1997; Mindlin et al., 2001).

В данной работе из 23 проверенных Hg-г штаммов реципиентом для RP1 и ее производных служили только 10. Из них удалось мобилизовать 6 транспозонов устойчивости к ртути. Только в 28 из 38 проверенных штаммов устойчивых к антибиотикам, удалось ввести крупную плазмиду. Из двух из них удалось мобилизовать активные транспозоны.

Из таблицы 5 видно, что по активности перемещения транспозоны из древних штаммов различались на несколько порядков. Самым активным оказался транспозон из штамма ED23-33.

Таблица 5. Результаты опытов по выделению активных транспозонов

Штамм	Скрещивание с <i>E. coli</i> AB1456 ¹			Выявленный мобильный элемент
	Tc-r Str-r, в 0,1 мл [N]	Hg-r Str-r, в 0,1 мл [T]	Частота переноса [T/N]	
Содержащие <i>mer</i>-оперон				
ED23-33	3,0x10 ⁶	3,0x10 ⁵	10 ⁻¹	Tn5058
ED94-62a	3,0x10 ⁶	2,0x10 ¹	7,0x10 ⁻⁶	Tn5042
ED23-5	6,0x10 ⁶	2,0x10 ¹	3,3x10 ⁻⁶	Tn5053 v8
ED23-70	3,0x10 ⁶	4,5x10 ²	1,5x10 ⁻⁴	Tn5041B
ED72-65	2,0x10 ⁶	7,5x10 ¹	3,7x10 ⁻⁵	Tn5053 v9
A19-1	5,0x10 ⁶	4,0x10 ³	8,0x10 ⁻⁴	Tn5060
Содержащие гены устойчивости к антибиотикам				
Штамм	Скрещивание с <i>E. coli</i> JF238 ²			Выявленный мобильный элемент
	Km-r Nal-r, в 0,1 мл [N]	Nal-r Str-r, в 0,1 мл [T]	Частота переноса [T/N]	
MR29-12	2,0x10 ⁷	1,1x10 ¹	5,5x10 ⁻⁷	Tn5080, IS <i>Ppy1</i> +прилегающие гены <i>tet(H)</i> и <i>strA-strB</i>
Tik3	3,0x10 ⁶	2,0x10 ¹	7,0x10 ⁻⁶	Tn5045

⁽¹⁾ Плазмида-реципиент: RP1.2; ⁽²⁾ Плазмида-реципиент: RP4-5M (Km-r)

проверены на наличие у них всех основных типов транспозонов, содержащих *mer*-опероны. С этой целью были использованы зонды на транспозазы Tn21, Tn5041 и Tn5044, относящиеся к семейству Tn3, а также Tn5053. На рис. 4а представлена молекулярно-генетическая структура этих транспозонов и фрагменты, использованные в качестве зондов при их поиске в коллекции штаммов палеобактерий. Из проверенных 23 штаммов 7 дали гибридизацию с одним из четырех зондов. Таким образом, в коллекции палеобактерий были обнаружены все основные типы ртутных транспозонов, распространенных среди современных природных бактерий.

В связи с тем, что при идентификации генов устойчивости к антибиотикам у древних штаммов бактерий были обнаружены лишь известные гены устойчивости к стрептомицину, среди палеобактерий мы провели скрининг транспозона Tn5393, играющего ведущую роль в распространении генов *strA-strB*. Все древние штаммы, содержащие *strA-strB* (см. табл. 3), были проверены с помощью гибридизации колоний на наличие у них транспозазы Tn5393 (см. рис. 4б). Нам удалось обнаружить транспозазу Tn5393 у 4 (ED23-35, ED45-25, Tik1 и EK41) из 14 исследованных штаммов. Другой ген устойчивости к стрептомицину, *aadA*, у современных бактерий чаще всего является кассетным геном в составе различных интегронов. Но, как было сказано ранее, интегрон 1 класса, содержащий кассетный ген *aadA*, был обнаружен только в штамме Tik3. Сложный транспозон из этого штамма удалось мобилизовать и детально охарактеризовать (см. далее).

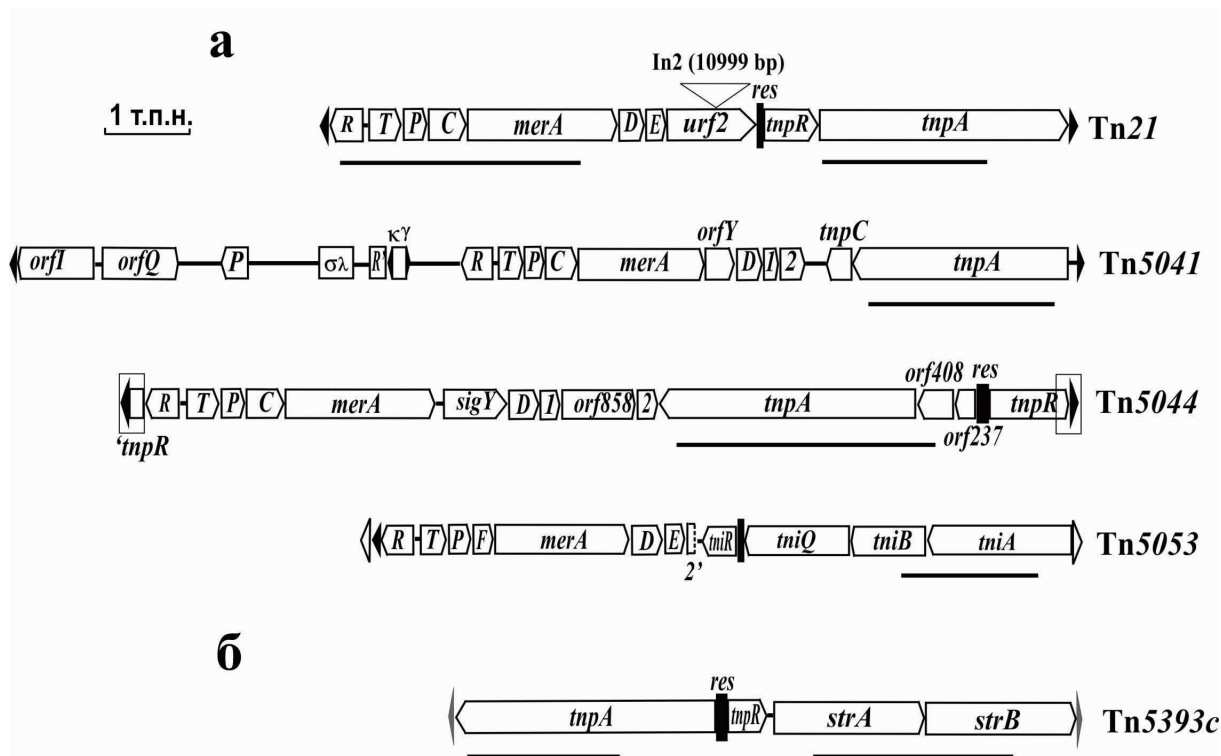


Рисунок 4. Молекулярно-генетическая структура транспозонов различных типов и зонды, использованные в работе.

Использованные зонды обозначены черными линиями под молекулярно-генетическими картами транспозонов. **а.** Зонды, использованные для поиска генов *mer*-оперона и основных типов ртутных транспозонов. *R, T, P, C, merA, D, E, urf2, 1, 2* - гены, входящие в состав различных *mer*-оперонов; *tnpA, tnpR, tniA, tniB, tniQ, tniR* - гены транспозиции; *orfY, orf858, sigY, orf408, orf237* - открытые рамки с неизвестными функциями; *к_γ, σ_λ, R', orfI, orfQ, orfR* – фрагменты генов и мобильных элементов, входящих в состав Tn5041. **б.** Зонды, использованные для поиска Tn5393 и генов *strA-strB*. *tnpA, tnpR* - гены транспозиции Tn5393; *strA-strB* - гены устойчивости к стрептомицину.

4.1. Транспозоны подгруппы Tn5044

С зондом на транспозазу Tn5044 дали гибридизацию 2 штамма. Отличительной особенностью Tn5044 является наличие у него гена *sigY*, гомологичного сигме субъединице РНК-полимеразы (см. рис. 4а). Однако указанные древние штаммы не дали гибридизацию с зондом на этот ген.

Осуществить транспозицию мобильных элементов из этих двух штаммов на плазмиду RP1 не удалось. После обработки различными рестриктазами, у древних штаммов гибридизовались фрагменты, отличные от таковых Tn5044 и родственных ему транспозонов Tn1412 и Tn5046, а также различающиеся между собой. По-видимому, штаммы палеобактерий содержат какие-то новые транспозоны, родственные Tn5044. Среди современных бактерий различные родственные этому транспозону варианты также очень распространены, тогда как сам Tn5044, является эндемиком (Горленко и др., 2004).

4.2. Транспозоны подгруппы Tn5041

С зондом на транспозазу Tn5041 дал гибридизацию штамм *P. fluorescens* ED23-70 (см. таблицу 5). У ED23-70 размер гибридизовавшегося фрагмента был значительно больше (около 8 т.п.н), чем соответствующий фрагмент у Tn5041 (1,7 т.п.н). Впоследствии этот штамм был подробно исследован в нашей лаборатории.

Было установлено, что ED23-70 действительно содержит активный ртутный транспозон Tn5041B, близкородственный Tn5041 (Kholodii et al., 2002).

4.3. Транспозоны подгруппы Tn21

С зондом на транспозазу Tn21 дал гибридизацию единственный штамм *Pseudomonas* sp. A19-1. Транспозон Tn21 и многочисленные члены его подгруппы играют ведущую роль в распространении не только *mer*-оперонов, но и различных генов устойчивости к антибиотикам (Liebert et al., 1999). Чаще всего такие транспозоны обнаруживаются у штаммов, выделенных из клиник. Все известные члены данной подгруппы являются сложными (комплексными) транспозонами, возникшими в результате инсерции в базовый ртутный транспозон транспозона типа Tn402, содержащего интегрон, с последующей делецией части транспозиционного модуля последнего. Транспозиционный модуль Tn402, родственен генам транспозиции Tn5053. Поэтому все штаммы, содержащие подобные сложные транспозоны, дают одновременно гибридизацию с зондами на обе транспозазы. Штамм A19-1 был способен гибридизоваться только с зондом на транспозазу Tn21, что наводило на мысль о том, что ртутный транспозон из этого штамма не содержит интегрона, в отличие от самого Tn21 и близкородственных ему транспозонов. Эти данные дали нам основания предполагать, что штамм A19-1 содержит новый безинтегронный транспозон, родственный Tn21. Подробные данные о структуре транспозона этого штамма представлены далее.

4.4. Транспозоны семейства Tn5053

Транспозон Tn5053 относится к семейству мобильных элементов, неродственному семейству Tn3. С зондом на транспозазу Tn5053 дали гибридизацию 3 штамма: *Pseudomonas* sp. ED23-5, *P. putida* ED23-33 и ED72-65. Транспозоны, содержащиеся в этих штаммах удалось мобилизовать с помощью плазмиды pRP1.2 (табл. 5). Рестрикционный анализ рекомбинантных плазмид pRP1.2::Hg-г с транспозонами из ED23-5 и ED72-65 показал, что переместившиеся мобильные элементы по рестриктной карте полностью идентичны Tn5053. Частичные сиквенсы транспозона из ED23-5 подтвердили, что он действительно является вариантом Tn5053.

Транспозон, переместившийся на pRP1.2 из штамма ED23-33, обладал рестриктной картой, отличной от всех известных транспозонов. Полный сиквенс транспозона из этого штамма, обозначенного Tn5058, (Y17897), подтвердил, что это действительно новый транспозон, родственный Tn5053. Практически идентичный ему транспозон Tn50580 (AM048832) был обнаружен у современных бактерий из р. Нуры (Казахстан) (Smalla et al., 2006).

5. Исследование молекулярно-генетической структуры ранее неизвестных транспозонов устойчивости к ртути.

В опытах по мобилизации генов устойчивости (см. раздел 3.3.) в коллекции Hg-г древних бактерий был обнаружен ряд штаммов, содержавших новые функционально активные ртутные транспозоны, способные перемещаться в плазмиды широкого круга хозяев. В данной работе были детально охарактеризованы два таких транспозона, обнаруженных в штаммах *Pseudomonas* sp. A19-1 и *Pseudomonas fluorescens* ED94-62a (см. табл. 5).

У первого штамма была обнаружена гомология с транспозазой Tn21, при отсутствии интегрона. Кроме того, A19-1 содержал активный транспозон. Такие

свойства транспозона из A19-1 позволяли предположить, что он может являться безинтегронным предшественником Tn21, существование которого было предсказано рядом авторов (Tanaka et al., 1983; Liebert et al., 1999).

У второго штамма, *Pseudomonas fluorescens* ED94-62a, в опытах по блот-гибридизации не удалось обнаружить гомологии с транспозазами известных транспозонов и, тем не менее, из него удалось получить транспозицию мобильного элемента, обуславливающего устойчивость к ртути. Поэтому было решено подробно исследовать переместившийся неизвестный транспозон из этого штамма.

5.1. “Древний” транспозон Tn5060 – безинтегронный предшественник Tn21

Была определена полная нуклеотидная последовательность нового транспозона из штамма A19-1, названного Tn5060 (AJ551280). Результаты сравнительного анализа структуры Tn21 и Tn5060 схематически представлены на рис. 5. В отличие от Tn21, Tn5060 не содержит интегрона In2 протяженностью 11kb. Остальные составные элементы обоих транспозонов полностью идентичны, за исключением 4 нуклеотидных замен. Их *mer*-опероны протяженностью 4 т.п.н. содержат гены *merRTPCADE*, гомологичные между собой более чем на 99.9% (две замены обнаружили в гене *merR* и одну замену в гене *urf2*). Транспозиционные модули обоих транспозонов, состоящие из концевых повторов, генов *tnpA* и *tnpR* и *res*-сайта и имеющих протяженность 3,6 т.п.н отличаются единственной заменой в гене *tnpA*.

Ранее было высказано предположение (Brown et al., 1986; Liebert et al., 1999) о том, что в результате внедрения In2 в транспозон-предшественник Tn21 исходная рамка *urf-2* (Liebert et al., 1997, 2000) разделилась на две части: 5'-концевую (сохранившую название *urf-2*) и 3'-концевую, названную *tnpM*. Структура Tn5060, который имеет полноразмерный ген *urf-2*, подтверждает эту гипотезу. Полностью соответствуют ей и результаты сравнения структуры и размера гена *urf-2* Tn5060 с таковыми гипотетического “гибридного” гена *urf2M* Tn21 (Liebert et al., 1999), образованного путем слияния последовательностей *urf-2* и *tnpM*, остающихся после исключения интегрона (и вычетом прилежащих 5-ти пар нуклеотидов, возникших при дупликации мишени).

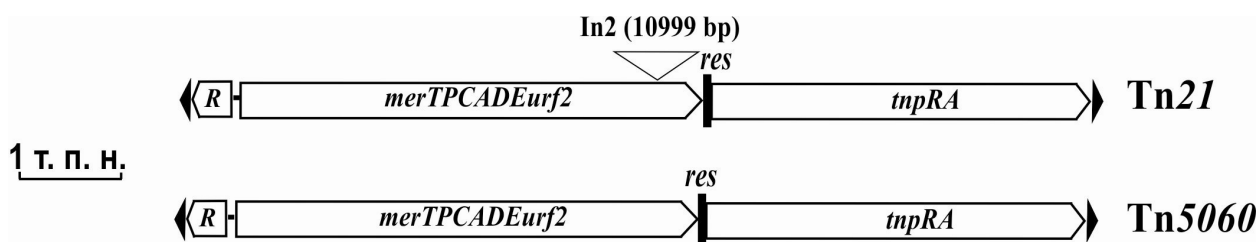


Рисунок 5. Молекулярно-генетическая карта Tn5060 и Tn21.

Обозначения генов такие же, как и на рис. 4. In2 - интегрон 1-класса с генами устойчивости к антибиотикам, входящий в состав Tn21.

В соответствии с общепринятой гипотезой, предшественником ряда современных сложных транспозонов множественной лекарственной устойчивости (MDR транспозонов) клинических бактерий, родственных Tn21, был ртутный транспозон, не содержащий интегрона (Liebert et al., 1999). В связи с этим в ряде работ проводили сравнительный анализ структуры Tn21 и

близкородственных ему безинтегронных транспозонов (Tanaka et al., 1983; Lett et al., 1985; Liebert et al., 1999; Mindlin et al., 2001; Essa et al., 2003). Однако оказалось, что ни один из них не может считаться транспозоном-предшественником Tn21. Из всех известных простых транспозонов, устойчивости к ртути, родственных Tn21, Tn5060 является самым близким к нему по своей структуре и свойствам. И если не он сам, то ближайший его родственник может рассматриваться в качестве предшественника Tn21 и всей подгруппы родственных ему транспозонов.

Встраивание интегрона In2 в простой транспозон устойчивости к ртути, прототипом которого является Tn5060, оказалось чрезвычайно важным по своим последствиям, ибо привело к формированию обширной группы комплексных MDR транспозонов, распространившихся по всему миру (Grinsted et al., 1990; Osborn et al., 1997).

По-видимому, нельзя считать случайным тот факт, что именно в коллекции древних штаммов, распространенных в природе задолго до наступления антибиотической эры, нам удалось обнаружить простой транспозон-предшественник сложных MDR транспозонов подгруппы Tn21, тогда как ни одного комплексного транспозона у устойчивых к ртути палеобактерий обнаружить не удалось. Это свидетельствует о том, что именно искусственное селективное давление, вызванное массированным применением антибиотиков, привело к быстрому формированию и распространению комплексных транспозонов, содержащих как гены лекарственной устойчивости, так и *ter*-опероны.

5.2. Новый транспозон Tn5042: его структура и распространение среди современных и древних бактерий

Анализ полученной нами полной нуклеотидной последовательности транспозона из древнего штамма *Pseudomonas fluorescens* ED94-62a, обозначенного Tn5042 (AJ563380), подтвердил, что это новый транспозон, неродственный описанным ранее. Данный транспозон является одним из самых маленьких ртутных транспозонов: его размер составляет всего 6987 п. н. Оказалось, что транспозиционный модуль Tn5042 родственен мобильным элементам из семейства IS66. Мобильные элементы из этого семейства обычно кодируют три открытые рамки считывания *tnpA*, *tnpB*, *tnpC*, вовлеченные в процесс транспозиции. У некоторых представителей семейства имеется дополнительно четвертый ген, *orf4*, функции которого неизвестны. IS элементы данного семейства ограничены несовершенными инвертированными повторами размером от 13 до 30 п. н. При транспозиции члены семейства IS66 вызывают дубликацию последовательности мишени размером 8 п. н. Элементы из семейства IS66 широко распространены среди грамотрицательных бактерий, принадлежащих к родам *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Escherichia*, *Pseudomonas* и *Vibrio* (Mahillon & Chandler, 1998; Han et al., 2001).

Транспозон Tn5042 кодирует три полноразмерные открытые рамки считывания, проявляющие гомологию с генами *tnpA*, *tnpB* и *tnpC* других членов семейства (рис. 6а). Длина генов *tnpA*, *tnpB* и *tnpC* составляет 390, 345 и 1506 п. н. соответственно. Транспозиционный модуль Tn5042 наиболее схож с генами транспозиции ISPre3, также принадлежащему к семейству IS66, согласно сделанному нами анализу его нуклеотидной последовательности. Гомология

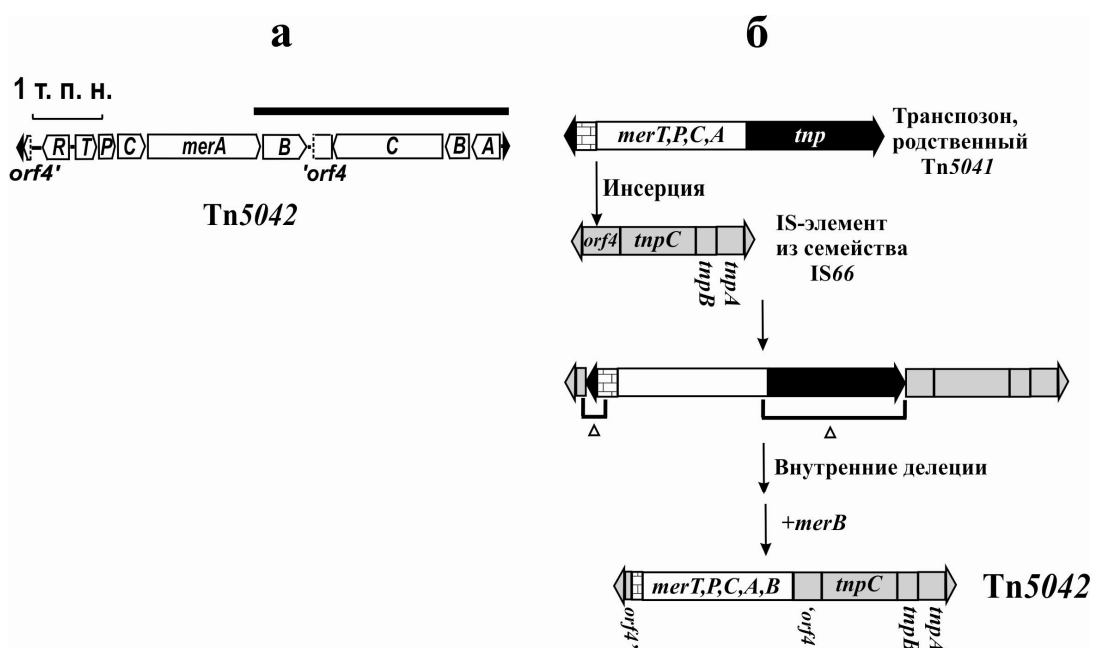


Рисунок 6. Структура Tn5042 и гипотетическая схема его образования.

а. Молекулярно-генетическая карта Tn5042. Обозначения генов *mer*-оперона такие же, как и на рис. 4; А, В, С – гены транспозиции *tnpA*, *tnpB*, *tnpC*; *orf4'* и *orf4* – фрагменты открытой рамки с неизвестными функциями *orf4*, входящей в состав некоторых IS-элементов из семейства IS66. Длинной жирной линией обозначен фрагмент, использованный в качестве зонда для скрининга Tn5042. **б.** Схема происхождения Tn5041 (не в масштабе). Предполагается, что Tn5042 возник в результате транспозиции Tn5041-подобного транспозона в IS-элемент из семейства IS66 и последовавших за этим двух внутренних делеций, а также инсерции гена *merB*. Заштрихованный прямоугольник обозначает левый фланг Tn5041.

между белковыми последовательностями TnpA, TnpB, TnpC из Tn5042 и ISPre3, составляет соответственно 53,5%, 91% и 77,7%. Кроме того Tn5042 содержит фрагмент рамки *orf4* (342 п. н.), гомологичной на 70% соответствующему гену из ISPre3 (ее протяженность в ISPre3 составляет 594 п. н.). Последовательность *orf4* у Tn5042 обрывается за 34 нуклеотида до конца гена *merB* (рис. 6а). Кроме того, недалеко от места обрыва эта рамка повреждена возникшим терминирующим кодоном TGA. По две копии ISPre3 обнаружены в составе крупных конъюгативных плазмид pCAR1 (AB088420) и pCAR1.2. (AB474758) из штаммов *Pseudomonas resinovorans* CA10 и *P. putida* HS01, соответственно. Анализируя последовательности из базы данных, родственные Tn5042, мы обнаружили в плазмиде pOCT из штамма *P. putida* TF4-1L (AJ245436) фрагмент IS-элемента, содержащего только участок гена *tnpC*, прилегающий к *orf4*, концевой инвертированный повтор, и полноразмерную открытую рамку, гомологичные соответственно *tnpC*, TIR и *orf4* из Tn5042. По-видимому, IS-элементы, родственные Tn5042 и ISPre3, часто встречаются у природных псевдомонад.

Tn5042 ограничен несовершенными инвертированными повторами размером 20 п. н, гомологичными на 75% концевым повторам IS элементов из семейства IS66. При своем перемещении Tn5042 вызывает дупликацию ДНК-мишени 8 п. н, как и все другие представители семейства IS66.

Транспозон Tn5042 содержит *mer*-оперон размером около 4,5 т. п. н., состоящий из генов *merR*, *merT*, *merP*, *merC*, *merA* и *merB*. Ближайшие по

нуклеотидным последовательностям *mer*-опероны входят в состав острова патогенности *P. aeruginosa* PAGI-5 (EF611301) (85% гомологии) и Tn5041 (X98999) из штамма *Pseudomonas* sp. КНР41 (82% гомологии). Однако в отличие от этих двух *mer*-оперонов транспозон Tn5042 содержит дополнительно ген органомеркуриатлиазы *merB*, нуклеотидная последовательность которого на 93% гомологична *merB* из *mer*-оперона другого транспозона Tn5058 (Y17897), обнаруженного в штамме *Pseudomonas* sp. ED23-33, также выделенного из «вечной» мерзлоты. Кроме того, гены *merB*, с таким же уровнем сходства, часто входят в состав плазмид современных штаммов бактерий, например *rby1_2p* (CP003091) из штамма *Burkholderia* sp. YI23, выделенного из почвы на поле для гольфа, и *pMCSBF6* (EF107516) и *pTP6* (AM048832) из ДНК, выделенных из морских и речных донных отложений, соответственно.

Гомология с Tn5041 у Tn5042 продолжается левее *mer*-оперона, который обрамлен остатками рамки *orf4*, принадлежащей IS-элементу. Такая молекулярно-генетическая структура Tn5042 указывает на то, что он возник в результате инсерции транспозона, родственного Tn5041 в IS элемент из семейства IS66 (см. рис. 6б). Однако механизм и момент интеграции *merB* остается неясным.

Чтобы определить частоту распространения Tn5042 среди древних и современных бактерий, был проведен поиск этого транспозона в коллекциях устойчивых к ртути бактерий, имеющихся в нашей лаборатории. Сначала был осуществлен предварительный скрининг Tn5042 в коллекциях современных устойчивых к ртути штаммов бактерий, выделенных из образцов собранных на территории европейской части России (77 штаммов) и в Новой Зеландии (17 штаммов). В качестве зонда был использован меченый фрагмент Tn5042, содержащий весь транспозиционный модуль и часть *mer*-оперона (см. рис. 6а). Отобранные 16 штаммов, дававшие в колониях гибридизацию с этим зондом, были повторно проверены на наличие гомологии с Tn5042 с помощью Саузерн-гибридизации. Оказалось, что у 12 из 16 исследованных штаммов размеры внутренних фрагментов, гибридизующихся с зондом, полностью совпадают с величиной фрагментов у Tn5042.

Из препаратов суммарной ДНК 4 штаммов (LS22-3, NZ2, NZ13, NZ15), идентичных по рестрикционной карте с Tn5042, были клонированы фрагменты, содержащие целиком Tn5042. У клонов этих четырех вариантов Tn5042 были определены участки нуклеотидных последовательностей, соответствующих генам *merA*, *tnpC* и *tnpA*. Суммарный размер отсекуированных фрагментов для каждого варианта Tn5042 составлял от 440 до 680 п. н., и в них не было обнаружено ни одной нуклеотидной замены относительно исходного варианта Tn5042. Кроме того, в базе данных мы обнаружили последовательность плазмиды *pQBR103* содержащей транспозон на 99,3% гомологичный Tn5042. Данная плаزمида была обнаружена в штамме *P. fluorescens* SBW25, выделенном в Англии с поверхности листьев и корней сахарной свеклы.

Все древние грамотрицательные устойчивые к ртути бактерии (включая ED94-62а), (табл. 4) также были проверены на наличие в них штаммов, содержащих Tn5042. Из 23 штаммов, кроме ED94-62а, еще 5 дали гибридизацию с использованным зондом. Причем у 4 штаммов (ED23-10, ED23-26, ED23-26а, ED94-71) число и размер внутренних фрагментов, гибридизующихся с зондом, полностью совпадали с таковыми у Tn5042.

Таким образом, впервые обнаруженный и описанный нами транспозон Tn5042 широко распространен как среди современных бактерий в географически удаленных областях Земного шара, так и среди древних бактерий, выделенных из многолетнемерзлых грунтов Колымской низменности.

В обширном семействе IS66, Tn5042 является единственным известным примером формирования транспозона, содержащего *mer*-оперон, на основе IS-элемента.

6. Характеристика транспозонов устойчивости к стрептомицину, родственных Tn5393

Гибридизация устойчивых к стрептомицину палеобактерий с зондом на транспозазу широко распространенного среди современных бактерий Tn5393 выявила четыре штамма (ED23-35, Tik1, ED45-25 и EK41), предположительно содержащих данный транспозон. С помощью ПЦР удалось получить фрагменты генов *strA-strB* (704 п. н.), транспозазы (1046 п. н.), а также продукт, включающий одновременно часть гена резольвазы и начало гена *strA* (1075 п. н.), что свидетельствует о сцеплении транспозиционного модуля Tn5393 с генами

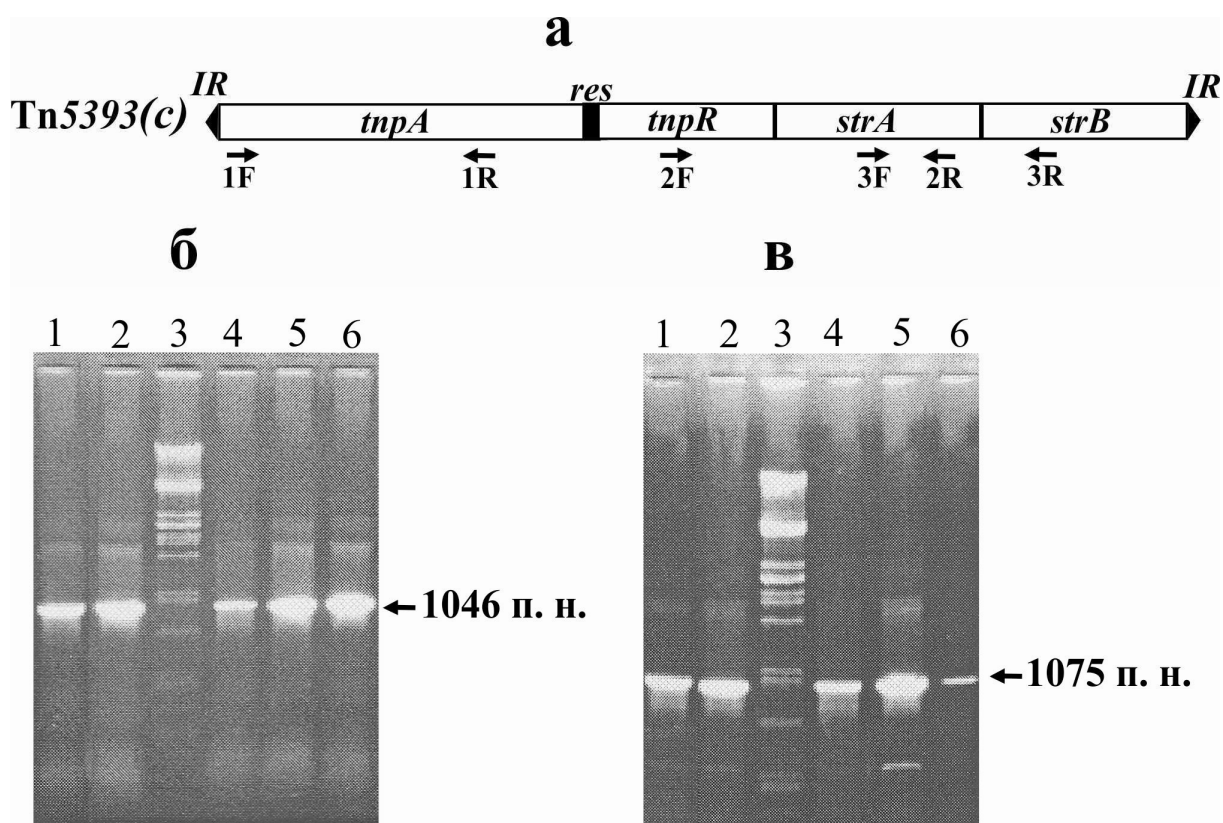


Рисунок 7. Выявление генов транспозиционного модуля, родственных Tn5393 у устойчивых к стрептомицину штаммов палеобактерий.

а. Черными стрелками показаны места отжига праймеров при получении ПЦР продуктов, содержащих фрагменты Tn5393: ген транспозазы (праймеры 1F и 1R); стык генов резольвазы и *strA-strB* (2F и 2R); гены устойчивости к стрептомицину *strA-strB* (3F+3R). Обозначение генов такое же, как на рис. 4. На фотографиях представлены продукты ПЦР с праймерами 1F+1R (**б**) и 2F+2R (**в**). Цифры над фотографиями соответствуют: 1-ED23-35, 2-I-35 (современный штамм, содержащий Tn5393), 3-весовой маркер (ДНК фага лямбда, рестрицированная PstI), 4-Tik1, 5-EK41, 6-ED45-25.

устойчивости к стрептомицину *strA-strB* в исследуемых древних штаммах (см. рис. 7). Шесть из восьми известных современных вариантов транспозона Tn5393 отличаются друг от друга инсерциями различных мобильных элементов в участок между генами *tnpR* и *strA* (варианты a, b, e, g, h, I по Cain & Hall, 2011). Поэтому образование ПЦР продуктов размером 1075 п. н., включающих одновременно участки генов *tnpR* и *strA* (праймеры 2F+2R), свидетельствует об отсутствии каких-либо инсерций в данном районе у транспозонов из мерзлоты. Еще один вариант, Tn5393d, содержит инсерцию в гене *strA*. Размер ПЦР продуктов генов устойчивости к стрептомицину (праймеры 3F+3R) свидетельствует об отсутствии инсерций в данном участке у древних штаммов. Вероятнее всего, в древних штаммах содержится самый простой вариант транспозона, не содержащий никаких инсерций: Tn5393 (ранее Tn5393c), впервые обнаруженный на плазмиде pRAS2 в патогенном для рыб штамме *Aeromonas salmonicida*, выделенном в Норвегии (L'Abée-Lund & Sorum, 2000).

7. Исследование ранее неизвестных мобильных элементов, участвующих в распространении генов устойчивости к антибиотикам

В опытах по мобилизации транспозонов (см. раздел 3.3.) в двух штаммах палеобактерий удалось обнаружить два функционально активных мобильных элемента, содержащих гены устойчивости к антибиотикам. Первый из них был обнаружен в штамме *Pseudomonas* sp. Tik3 (см. табл. 5) и содержал гены устойчивости к стрептомицину/спектиномицину и сульфонидамидам. Второй – в штамме *Psychrobacter maritimus* MR29-12 (см. табл. 5) обеспечивал устойчивость к стрептомицину и тетрациклину. В данной работе было проведено детальное исследование этих мобильных элементов.

7.1. Новый сложный транспозон Tn5045

Предварительный анализ транспозона, переместившегося из древнего штамма *Pseudomonas* sp. Tik3 на плазмиду RP1.2, позволил заключить, что он по ряду свойств отличается от всех известных. В частности, с помощью частичного секвенирования продуктов ПЦР, было установлено, что данный транспозон содержит интегрон 1 класса с единственным кассетным геном устойчивости к стрептомицину/спектиномицину *aadA2*. Существование такого интегрона было предсказано, но сам он ранее нигде не был обнаружен (Bissonnette and Roy, 1992). Поэтому была определена полная нуклеотидная последовательность нового транспозона, названного Tn5045. Результаты анализа нуклеотидной последовательности Tn5045 (FN821089) показали, что это новый сложный транспозон размером около 22 т. п. н., состоящий из трех различных генетических модулей: (1) базового транспозона, родственного Tn1013 (AM261760), обозначенного нами Tn1013*; (2) ранее неизвестного интегрона 1 класса InC*, содержащего гены лекарственной устойчивости; (3) варианта недавно описанного транспозона TnOtChr (AF313472), TnOtChr*, содержащего гены устойчивости к шестивалентным ионам хрома. В составе Tn5045 транспозон

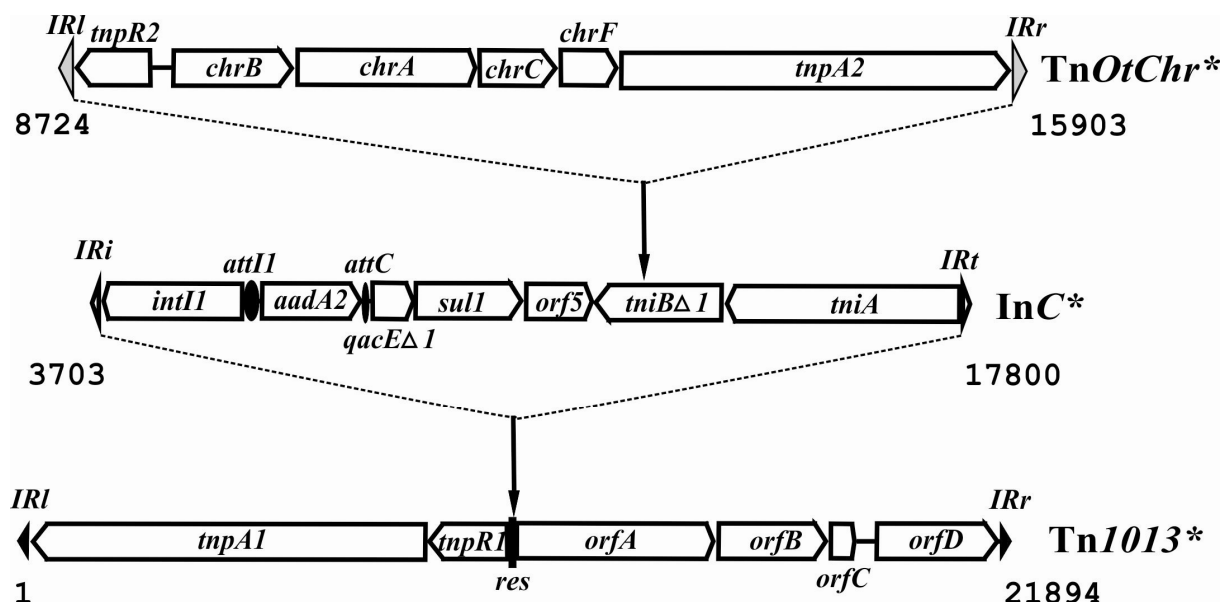


Рисунок 8. Молекулярно-генетическая структура Tn5045.

Цифры под изображениями мобильных элементов, входящих в состав Tn5045, обозначают позицию первого и последнего нуклеотида данного элемента по последовательности FN821089. *orfA*, *orfB*, *orfC*, *orfD* – структурные гены транспозонов, родственных Tn1013; *chrB*, *chrA*, *chrC*, *chrF* – гены, входящие в оперон устойчивости к хрому из TnOtChr*; *intI1* – ген интегразы; *qacEΔ1*, *sul1* и *orf5* – гены, входящие в консервативный район 3'-CS интегрона; *aadA2* – кассетный ген устойчивости к стрептомицину/спектиномицину, входящий в состав интегрона InC. Остальные обозначения, как на предыдущих рисунках.

Tn1013* разделен на две части инсерцией интегрона InC*, а тот, в свою очередь, разделен инсерцией TnOtChr* (см. рис. 8). Все мобильные генетические элементы, входящие в состав Tn5045 близкородственны соответствующим современным элементам.

Транспозон, являющийся базовым для Tn5045, относится к подгруппе Tn21 из семейства Tn3. Поскольку ближайшим родственным ему транспозоном является Tn1013, отличающийся единственной нуклеотидной заменой, мы обозначили его Tn1013* (см. рис. 8). Он содержит концевые инвертированные повторы (IR) размером 37 п. н. и ограничен прямыми дупликациям мишени размером 5 п. н. Транспозиционный модуль базового транспозона Tn1013* в составе Tn5045 разделен на две части инсерцией интегрона 1 класса, произошедшей в *res*-сайт между районами *resI* и *resII*. Левая часть Tn1013*, размером 3697 п. н., содержит левый концевой повтор, гены транспозиционного модуля (*tnpA*-транспозазы и *tnpR*-резольвазы) и большую часть *res*-сайта. Правая часть Tn1013*, в состав которой входят оставшаяся часть *res*-сайта, дополнительные гены *orfA*, *orfB*, *orfC*, *orfD* и правый концевой повтор транспозона, имеет размер 4094 п. н. Продукты, кодируемые генами *orfA* и *orfC*, были ранее определены, как гомологи сульфат пермеазы и DksA-подобного белка, соответственно (Schnabel and Jones, 1999). Белок OrfB родственен ряду белков, аннотированных как универсальные белки стресса (UspA) (Stokes et al., 2007). Продукт гена *orfD* является неизвестным белком. Ближайшие последовательности, родственные генам, расположенным в правой части Tn1013*, были обнаружены в Tn1403 (AF13472), в частично отсеквенированном Tn1404* и в составе плазмид pND6-1 (AY208917) и pDTG1

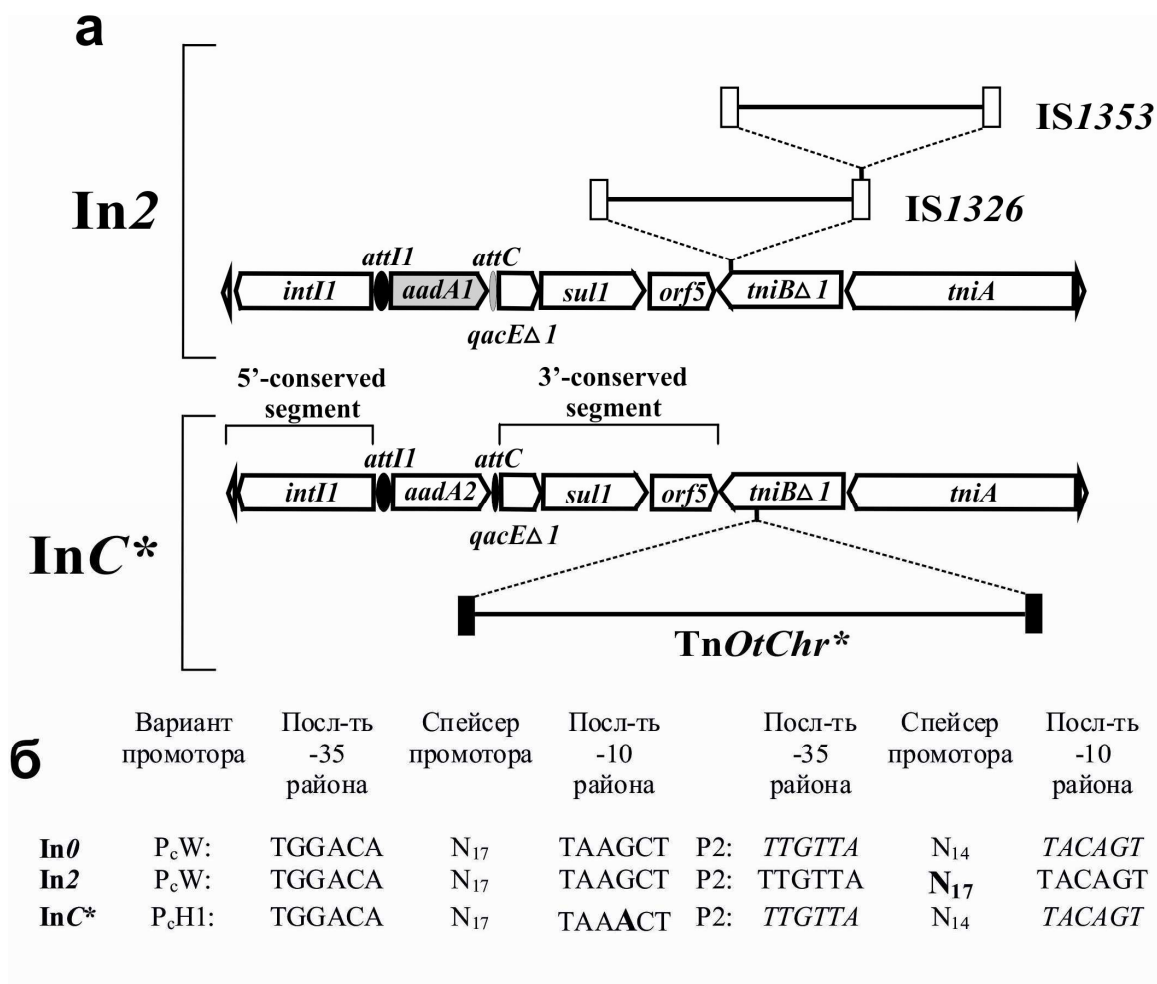


Рисунок 9. Молекулярно-генетическая организация интегров In2 и InC*.

a. Структура интегров. *attI* – сайт рекомбинации интегрона, *attC* – кассетный сайт рекомбинации (59be-элемент). Короткие вертикальные линии указывают местоположение инсерций мобильных элементов IS1326, IS1353 и TnOtChr* в соответствующие интегроны. Остальные обозначения, как на рис. 8. **б.** Варианты промоторов, обнаруженные в интегронах. Неактивная форма промотора P2 со спейсером длиной 14 п. н. выделена курсивом (форма промотора P2 со спейсером длиной 17 п. н. – активна). Нуклеотиды промоторов из интегров In2 и InC*, отличные от In0, выделены жирным шрифтом.

(AF491307). Подобно Tn1013, Tn1013* содержит делецию в гене *orfC* размером 78 п. н. по сравнению с транспозоном Tn1403.

Интегрон 1 класса, разделяющий на две части Tn1013*, относится к In2-In5 семейству интегров. Его инсерция фланкирована прямыми повторами размером 5 п. н. Интегрон обрамлен концевыми повторами размером 25 п. н. и содержит два характерных консервативных района, так называемые 5'-CS и 3'-CS, и единственный кассетный ген устойчивости к стрептомицину/спектиномицину *aadA2* (см. рис. 9а). Среди генных кассет, входящих в состав современных интегров из клинических бактерий, обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость, наиболее часто встречаются гены устойчивости к стрептомицину/спектиномицину *aadA1* или *aadA2*. В зависимости от наличия той или другой кассеты все интегроны, содержащие ген *aadA* подразделяются на две подгруппы *aadA1* и *aadA2*. Предполагают, что интегрон In2, в состав которого входит единственная кассета

aadA1, является предшественником всей *aadA1* подгруппы. Однако интегрон, являющийся предшественником подгруппы *aadA2*, до настоящего времени не был обнаружен. Поэтому ранее была предложена структура гипотетического интегрона-предшественника для этой группы, аналогичного In2, содержащего единственную кассету *aadA2* (Bissonnette and Roy, 1992). Этот гипотетический интегрон был назван InC. Поскольку структура интегрона, входящего в состав Tn5045, сходна со структурой гипотетического интегрона InC, мы обозначили интегрон из Tn5045 как InC*. Как свойственно и другим интегронам из семейства In2-In5, 5'-CS в составе InC* содержит ген *intI1*, кодирующий интегразу, сайт интеграции кассетных генов *attI1* и промотор P_c, необходимый для экспрессии кассетных генов, а 3'-CS – ген устойчивости к сульфонидамидам *sulI* и еще две открытые рамки считывания: *orf5* и *qacEΔ1* (Stokes and Hall, 1989). Как было показано ранее, последняя рамка кодирует делеционную производную гена устойчивости к четвертичным аммониевым соединениям *qacE*. В отличие от других членов семейства интегронов множественной лекарственной устойчивости In2-In5, содержащих кассету *aadA1* и поэтому принадлежащих к так называемой подгруппе *aadA1*, InC* содержит кассету *aadA2* и, следовательно, принадлежит к подгруппе *aadA2*. Кроме того, в гене *tniBΔ1* интегрона InC* не содержится IS-элементов IS1326 и IS1353, а вместо них имеется инсерция транспозона устойчивости к хромью (см. рис. 9а). InC* и In2 также имеют различия в структуре промоторного района, ответственного за экспрессию кассетных генов. Согласно номенклатуре интегронных промоторов (Jove et al., 2010), интегрон InC* содержит вариант промотора P_cH1 без дополнительного промоторного района P2, тогда как In2 содержит гораздо более сильный вариант промотора P_cW+P2 (см. рис. 9б). Организация промоторных областей у интегронов InC* и In2 также хорошо согласуется с моделью происхождения интегронов подгруппы In2-In5 от общего предшественника In0, предложенной Биссонетом и Роем. Оба промотора могли произойти от варианта слабого промотора P_cW, содержащегося в In0, путем или единичной замены в -10 области P_cW, приведшей к возникновению более сильного промотора P_cH1, как у InC*, или инсерции трех остатков гуанина в спейсер промотора, приведшей к возникновению второго сильного промотора P2 в дополнение к P_cW, как в интегрене In2 (см. рис. 9б).

Транспозон, включившийся в ген *tniBΔ1* интегрона InC*, близкородственен недавно описанному транспозону устойчивости к хромью Tn*OtChr* из семейства Tn3, обнаруженному в хромосоме устойчивого к хромью штамма *Ochrobactrum tritici* (Branco et al., 2008). Поэтому транспозон, входящий в состав Tn5045, был назван Tn*OtChr**. Транспозоны Tn*OtChr* и Tn*OtChr** имеют размер 7189 и 7180 нуклеотидных пар, соответственно, и содержат два гена транспозиции (транспозазу и резольвазу), транскрибируемые в разных направлениях, что свойственно транспозонам подгруппы Tn3 (см. рис. 8). Концевые повторы обоих элементов, размером 38 п. н., полностью идентичны. Между генами транспозиции располагаются четыре гена (*chrB*, *A*, *C*, *F*), входящие в состав оперона устойчивости к хромью. Нуклеотидные последовательности этих генов из обоих транспозонов высокоомологичны между собой (см. табл. 6). Единственным заметным отличием является делеция 9 нуклеотидов в гене *chrA* из Tn*OtChr** по сравнению с Tn*OtChr*.

Таблица 6. Сравнительный анализ TnOtChr* и ближайших родственных ему транспозонов

Генный район	Координаты ^a	Уровень гомологии по нуклеотидной посл-ти (длина района, п. н. / %)	
		TnOtChr*/TnOtChr	TnOtChr*/Tn из <i>C. testosteroni</i>
<i>tnpA</i> +IRr	1-3000	2987/99,6	2998/99,9
<i>chrF</i> +прилегающий p-н	3001-3481	477/99,2	480/99,8
<i>chrC</i>	3482-4088	607/100	607/100
<i>chrA</i> +прилегающий p-н	4089-5460	1369/99,8	1370/99,8
<i>chrB</i> +прилегающий p-н	5461-6569	1102/99,4	1109/100
<i>tnpR</i> +IRl	6570-7180	607/99,5	- ^б

^a Координаты приведены по последовательности TnOtChr (EF469735). ^б Ген *tnpR* отсутствует

Однако мы обнаружили еще один подобный транспозон, также имеющий аналогичную делецию, в недавно отсеквенированном геноме *Comamonas testosteroni* (GQ281704). Помимо этого в данном транспозоне полностью делегирован ген *tnpR* (см. табл. 6).

На сегодняшний день Tn5045 является единственным известным транспозоном множественной лекарственной устойчивости, содержащим интегрон, обнаруженным в древнем штамме. Кроме того, интегрон 1 класса InC*, входящий в состав Tn5045 представляет собой единственный известный интегрон, возникший задолго до начала использования антибиотиков. Согласно недавно предложенной модели эволюции интегროнов (Gillings et al., 2008), предшественником клинических интегროнов 1 класса послужил хромосомный интегрон, который в какой-то момент оказался включенным в состав транспозона близкородственного Tn402, локализованного на плазмиде. Также было предположено, что отбор интегროнов, содержащих гены устойчивости к антибиотикам, произошел в клинике спустя несколько десятков лет после начала «антибиотической» эры. Однако обнаружение в штамме палеобактерии из мерзлоты интегрона InC*, содержащего кассетный ген устойчивости к стрептомицину/спектиномицину *aadA2*, заставляет пересмотреть предложенную модель, поскольку с очевидностью свидетельствует о возникновении таких интегროнов в природных популяциях бактерий задолго до начала применения антибиотиков. Массированное использование антибиотиков привело лишь к быстрому распространению интегროнов, содержащих гены устойчивости, среди клинических штаммов, а также к их структурным изменениям.

Анализ нуклеотидных последовательностей всех известных сложных транспозонов, содержащих интегроны 1 класса, показывает, что в настоящее время выявлено, по крайней мере, девять независимых случаев внедрения интегროнов в различные транспозоны из семейства Tn3 (см. табл. 7). Для большинства из них базовыми элементами служат простые транспозоны устойчивости к ртути. Самой большой кластер подобных элементов образует подгруппа транспозона Tn21, возникшая в результате инсерции интегрона In2 в транспозон близкородственный Tn5060 и последующих интеграций кассетных генов устойчивости к различным антибиотикам. Данная подгруппа широко распространена как среди клинических, так и среди современных природных

Таблица 7. Перечень независимо возникших сложных транспозонов, содержащих интегроны.

Название транспозона	Базовый транспозон	Интегрон 1 класса	Кассетные гены	Место инсерции интегрона
Транспозоны, содержащие гены устойчивости к ртути				
Tn21	типа Tn5060	In2	<i>aadA1</i>	>350 п. н. от <i>res</i> -сайта
Tn1696	типа Tn5036	In4	<i>aacC1-orfE-aadA2-cmlA1</i>	Между сайтами <i>resII</i> и <i>resI</i>
Без имени	типа Tn5036	In-t8	<i>oxa30-aadA1</i>	Между сайтами <i>resII</i> и <i>resI</i> ; с отступом в 8 п. н. от места инсерции у Tn1696
Tn6005	типа Tn5036	In(Tn6006)	Кассетный ген с неизвестными функциями	Между сайтами <i>resII</i> и <i>resI</i> ; с отступом в 6 п. н. от места инсерции у Tn1696
Без имени	типа Tn5051	Без имени	<i>blaimp13-aacA4</i>	~200 п. н. от <i>res</i> -сайта
Без имени	типа Tn5051	In70.2	<i>blavim1-aacA4-aadA2-mlA1</i>	В сайт <i>resI</i>
Другие транспозоны				
Tn1412	Tn5563	In32	<i>blaNPS-1-aphA1a</i>	В <i>res</i> -сайт
Tn1403	типа Tn1013	In28	<i>blaP1-cmlA1-aadA1</i>	В сайт <i>resI</i>
Tn5045	типа Tn1013	InC*	<i>aadA2</i>	Между сайтами <i>resII</i> и <i>resI</i>

штаммов бактерий (Toleman et al., 2003). В отличие от данной подгруппы, Tn5045 произошел от транспозона Tn1013, не содержащего генов устойчивости к ртути. В настоящее время, помимо Tn5045, известно еще два случая подобных независимо возникших транспозонов, не содержащих *mer*-оперона (см. табл. 7). Для одного из таких транспозонов, Tn1403, как и для Tn5045, базовым элементом послужил транспозон Tn1013. Однако Tn1403 содержит интегрон In28 вместо InC*, обнаруженного у Tn5045, и инсерцию транспозона типа Tn5393c вместо TnOtChr*.

Существенное преобладание транспозонов, обуславливающих устойчивость к ртути, среди содержащих интегроны сложных транспозонов, выделенных их клиники, может объясняться тем, что еще до начала использования антибиотиков препараты ртути применялись в качестве лекарств и дезинфектантов, что привело к распространению среди больничных штаммов транспозонов, содержащих *mer*-опероны. В течение последующего периода активного использования антибиотиков именно эти транспозоны стали базовыми для внедрения интегროнов и формирования сложных транспозонов множественной лекарственной устойчивости. В отличие от клинических, среди древних природных ртутных транспозонов не было обнаружено ни одного, содержащего интегрон.

Таким образом, полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что формирование сложных транспозонов, содержащих различные типы мобильных элементов и детерминант устойчивости к антибиотикам, происходило в популяциях природных бактерий задолго до начала применения антибиотиков в медицинской практике.

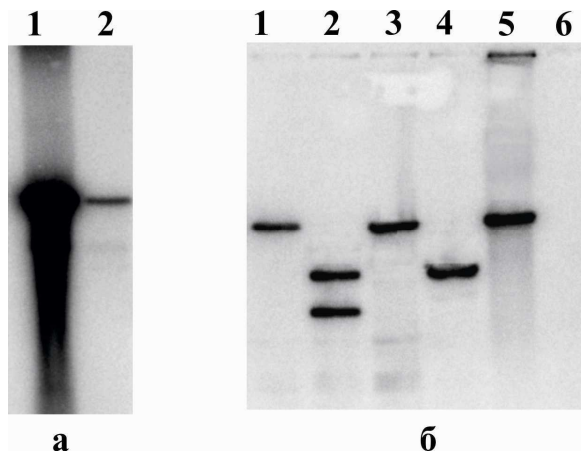


Рисунок 11. Определение количества копий ISPpy1.

Результаты Саузерн-гибридизации препаратов ДНК обработанных рестриктазой *AvaII*. При такой рестрикции количество полос, гибридизующихся с

транспозантов. С помощью Саузерн-гибридизации, а также ПЦР, было установлено, что в исходном штамме содержится только одна копия *ISPpy1* (находящаяся правее генов устойчивости), которая вместе с генами *strA-strB* и *tetR(H)* локализована на конъюгативной плазмиде, обозначенной нами *pKLH80* (см. рис. 11а). Результаты Саузерн-гибридизации трех новых независимо полученных транслокаций генов устойчивости на плазмиду *RP4-5M* показали, что во всех этих случаях перемещение произошло за счет единственной копии *ISPpy1* (см. рис 11б), что свидетельствует о способности этого элемента к одноконцевой транспозиции. Впоследствии в опытах по перемещению генов устойчивости на *pGEM7* был обнаружен еще один независимо возникший составной транспозон, обозначенный нами *Tn5080a*. Секвенирование этого вновь возникшего транспозона, показало, что он, по сравнению с *Tn5080*, содержит более протяженный фрагмент ДНК из *pKLH80*, также обрамленный двумя копиями *ISPpy1* (см. рис 10а). В остальном молекулярно-генетические структуры обоих транспозонов полностью идентичны.

Анализ района из *pKLH80*, содержащего гены устойчивости к антибиотикам и входящего в составные транспозоны, показал, что он является мозаичным и состоит из нескольких фрагментов ДНК, высокоомологичных нуклеотидным последовательностям, обнаруженным в различных бактериях (см. рис. 10а и табл. 8), что указывает на активное участие горизонтального переноса в формировании данной области. На левом фланге этой последовательности (район 1) располагается участок, входящий в состав только более протяженного *Tn5080a* (см. рис 10а и табл. 8). Он включает в себя последовательности, обнаруженные в плаزمиде из различных штаммов психробактера, и содержит *IS*-элемент, родственник *IS4*. Значительная часть данного района не содержит известных генов и ORF. Далее следует район 2, левая часть которого также содержится только в *Tn5080a* (см. рис 10а и табл. 8). В этот район входит *IS*-элемент, не имеющий гомологии с *ISPpy1*, хотя и относящийся к тому же семейству *IS3*, и три открытые рамки считывания. Две из них, *orfZ* и *orfQ*, по-видимому, повреждены концевыми делециями и функции их неясны. Третья рамка, обозначенная *orfX*, предположительно кодирует белок рестрикции/модификации

зондом на *ISPpy1* (см. рис. 10а), соответствует количеству копий *IS*-элемента, содержащихся в анализируемой ДНК.

а. Определение числа копий *ISPpy1* и его локализации в исходном штамме *P. maritimus* MR29-12. 1 – ДНК плазмиды *pKLH80*, содержащейся в MR29-12, 2 – суммарная ДНК MR29-12. б. Определение числа копий *ISPpy1* у клонов, полученных в опытах по перемещению генов устойчивости из исходного штамма на плазмиду *RP4-5M*. Продукты одноконцевой транспозиции: 1 - *RP4-5MII*, 3 - *RP4-5MIII* и 4 - *RP4-5MIV*; 2- плазмиды *RP4-5MI*, содержащая *Tn5080*; 5 - *pKLH80*; 6 - *RP4-5M*.

ДНК, участвующий в мобилизации плазмид. Последовательность района 2 имеет гомологию с хромосомной и плазмидной ДНК из штаммов *Acinetobacter baumannii*. Район 3 содержит гены устойчивости к стрептомицину и на 100% идентичен участку транспозона Tn5393d (Chiou & Jones, 1993; Mantengoli & Rossolini, 2005). Как уже было сказано выше, Tn5393 и его производные широко распространены среди современных бактерий, обитающих в самых различных экологических нишах (Sundin, 2000). В составе рKLN80 имеется только правая часть этого транспозона, включающая в себя гены устойчивости к стрептомицину *strA-strB*, некодирующий район ДНК размером 40 п. н., примыкающий к 5'-концу гена *strA*, и правый концевой повтор (см. рис 10а и табл. 8). Район 4 включает в себя гены *tetR(H)* и проксимально прилегающий к ним фрагмент ORF (*orfY*). В целом данный район, за исключением одного нуклеотида, полностью идентичен участку геномной ДНК из клинического штамма *Histophilus somni* 2336 (см. рис 10а и табл. 8). Фрагмент *orfY* имеет размер 446 п. н. и соответствует 3'-части (нуклеотиды с 73 по 518) открытой рамки считывания с неизвестными функциями, обнаруженной в геноме *H. somni*. Вероятнее всего, 5'-конец *orfY* был утрачен в результате внедрения транспозона типа Tn5393. Гены *tetR-tet(H)*, обладающие высокой гомологией с генами устойчивости к тетрациклину из штаммов родов *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Acinetobacter*, *Moraxella* и *Actinobacillus*, вызывающих различные инфекционные заболевания у человека и животных (Kehrenberg et al., 2001, Miranda et al., 2003, Blanco et al, 2006). В составе рKLN80 концевой фрагмент гена *tet(H)*, размером 21 п. н., делетирован, вероятнее всего, в результате инсерции *ISPsyI*. Такой укороченный вариант белка TetH состоит из 393 аминокислотных остатков вместо 400, входящих в состав полноразмерного продукта. Однако эта делеция не влияет на функции белка и обуславливает устойчивость к тетрациклину, как исходного древнего штамма *P. maritimus*, так и всех лабораторных штаммов *Acinetobacter* и *E. coli*, в которые мы переносили

Таблица 8. Молекулярно-генетический анализ района плазмиды рKLN80, содержащего гены устойчивости к антибиотикам.

Район	Размер п. н.	G+C %	Ближайшие последовательности	Гомология с рKLN80, %
1. IS-элемент, родственный IS4 и прилежащий район	2040	43	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5, плаزمида1 (CP000324)	96 (1-991); 67 (1580-2040)
2. <i>orfZ</i> , IS-элемент, семейства IS3/IS911, <i>orfQ</i> , <i>orfX</i> и прилежащие участки	1282	35	<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR-ZJ06 (CP001937)	100
	698		<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF	68
	523		p2ABSDF плазмида (CU468232)	63
3. <i>strA-strB</i> и прилежащий район	1786	56	<i>Alcaligenes faecalis</i> Tn5393d (AJ627643)	100
4. <i>orfY-tetR-tet(H)</i>	2346	41	<i>Histophilus somni</i> 2336 (CP000947)	99
5. <i>ISPsyI</i>	1275	43	<i>Psychrobacter</i> sp. (AFHU01000091, AFHU01000198)	99 98,0

плазмиды, содержавшие данный ген. Правее генов устойчивости к тетрациклину располагается *ISPsy1* (см. рис 10а и табл. 8). Два фрагмента IS-элемента, практически идентичного *ISPsy1*, были обнаружены в составе двух контигов из сданного в конце 2011 г. в Генбанк (GenBank) и еще полностью не отсеквенированного генома штамма *Psychrobacter* sp. 1501, выделенного из крови человека. Первый контиг (AFHU01000091) содержит левый фланг IS-элемента, включающий в себя фрагмент гена *orfA*, на 99% (три замены на 343 нуклеотида) идентичный последовательности *ISPsy1*, и левый концевой повтор, полностью идентичный левому TIR из *ISPsy1*. Другой контиг (AFHU01000198) содержит правую часть IS-элемента, состоящую из концевого повтора, полностью идентичного правому TIR из *ISPsy1* и полноразмерного гена *orfB*, на 98% (18 замен на 848 нуклеотидов) идентичного последовательности из *ISPsy1*.

В связи с тем, что были выявлены необычные свойства *ISPsy1*, в частности его способность с необычайно высокой частотой формировать составные транспозоны, и эффективно мобилизовывать близлежащие гены устойчивости к антибиотикам, мы решили детально изучить свойства этого нового IS-элемента. *ISPsy1* обладает рядом свойств, характерных и для других представителей семейства IS3: (1) размер элемента сходен с другими членами данного семейства и составляет 1275 п. н.; (2) содержит две, расположенные друг за другом, открытые рамки считывания (*orfA* и *orfB*), кодирующие транспозиционные белки (см. рис 10а); (3) содержит сигнал запрограммированного сдвига рамки считывания (frameshifting signal; FS-сигнал) между *orfA* и *orfB*, необходимого для образования слитого белка транспозазы OrfAB (Mahillon & Chandler, 1998). Однако ряд свойств *ISPsy1* отличают его от типичных представителей семейства IS3. Так, терминальные концевые повторы *ISPsy1* имеют больший размер (49 и 50 п. н.) и заканчиваются 5'-ТА-...-ТА-3' (см. рис. 10б), в отличие от большинства других членов семейства IS3, для которых характерны TIR длиной 20-40 п. н., оканчивающиеся 5'-ТГ-...-СА-3 (Mahillon & Chandler, 1998).

Наличие высокой функциональной активности *ISPsy1* и происходящих от него мобильных элементов в клетках *E.coli* позволило нам провести следующую серию экспериментов по определению частоты и механизмов перемещения, а также структуры продуктов транспозиции. В этих опытах мы использовали ранее апробированный генетический метод скрещивания с отбором рекомбинантных плазмид (mating out experiments). В качестве плазмиды-мишени взяли плазмиду среднего размера R388. В качестве донорных плазмид нами были использованы специально отобранные для этих опытов рекомбинантные плазмиды, производные pBR325 (см. рис. 12а). Первая из них, pBR325-Ppy1, содержала только *ISPsy1*, вторая, pBR325-80.1, – *ISPsy1* с генами устойчивости к антибиотикам, третья, pBR325-80.2, – транспозон Tn5080a. Все эти плазмиды содержали *ISPsy1* и производные мобильные элементы в гене *bla*, что позволяло более адекватно сравнивать частоты их перемещения и структуру образующихся продуктов. Указанные плазмиды с помощью трансформации совмещали с R388 в клетках штамма *E.coli* JF238. После инкубации выросшие культуры скрещивали со штаммом *E.coli* C600rif и определяли частоту транспозиции и фенотип транспозантов.

Анализ полученных данных выявил существенные отличия в характеристиках перемещения сложного транспозона Tn5080a, фланкированного двумя копиями *ISPsy1*, и неполного транспозона, содержащего только одну копию этого

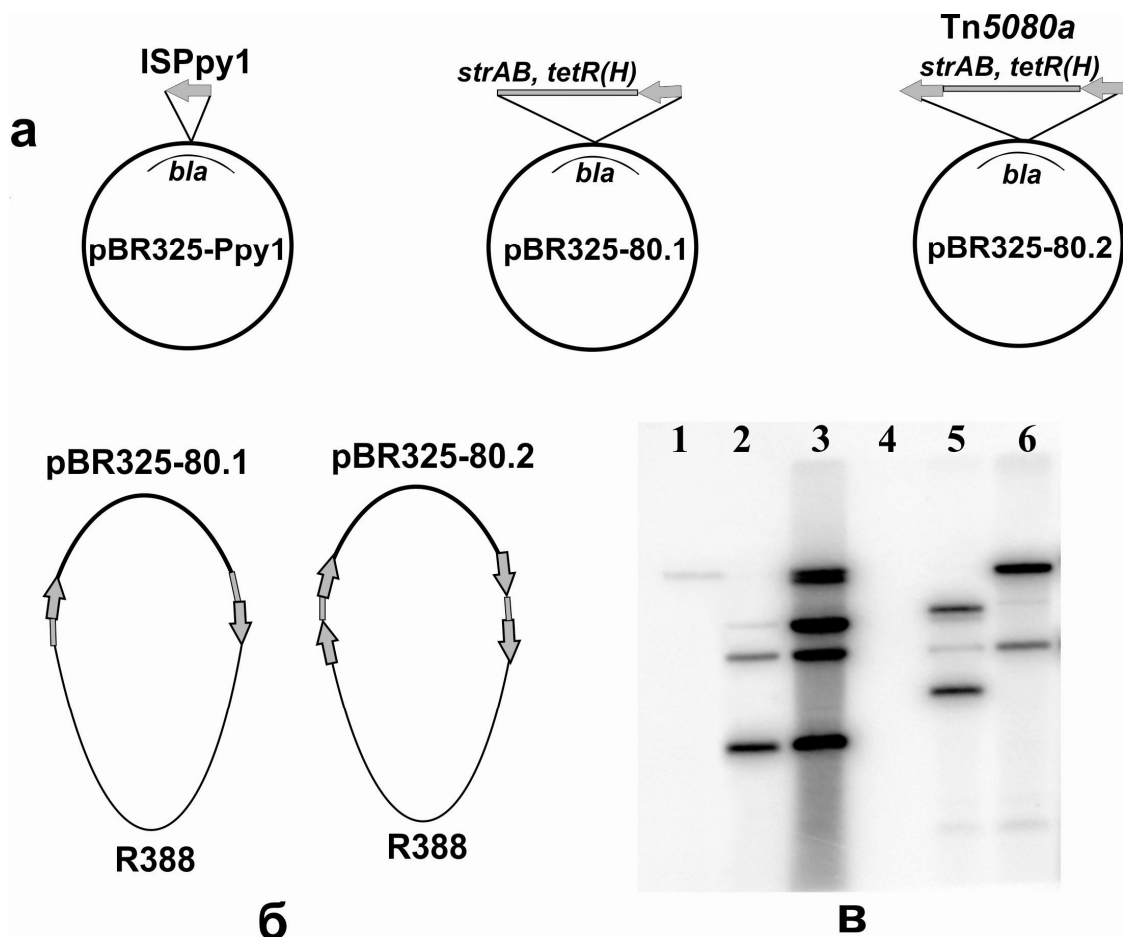


Рисунок 12. Структура рекомбинантных плазмид, содержащих мобильные элементы в гене *bla* pBR325, и результаты анализа различных посадок мобильных элементов в R388.

а. Схематические изображения использованных плазмид: pBR325-Ppy1 содержит только одну копию *ISPpy1*, pBR325-80.1 – одну копию *ISPpy1* и прилежащие гены устойчивости, pBR325-80.2 – *Tn5080a*. *ISPpy1* изображен серой стрелкой; участок плазмиды pKLN80, содержащий гены устойчивости к стрептомицину и тетрациклину, – серой линией. **б.** Предполагаемая структура коинтегратов, образующихся в результате одноконцевой транспозиции из плазмиды pBR325-80.1 и перемещения *Tn5080a* из pBR325-80.2 в плазмиду R388. Последовательность pBR325 обозначена жирной линией. **в.** Результаты Саузерн-гибридизации с зондом на *ISPpy1* плазмидных ДНК, обработанных *Ava*II (см. подпись к рис. 11): 1 – ДНК R388; 2 – ДНК транспозанта из pBR325-80.1 (одноконцевая транспозиция); 3, 5 и 6 – ДНК транспозантов *Tn5080a*; 4 – ДНК фага λ , рестрицированная *Pst*I (весовой маркер).

элемента (табл. 9). При использовании неполного транспозона не только резко снижалась частота перемещения генов устойчивости, но и способность образовывать простые инсерции. Оказалось, что все изученные транспозанты представляют собой продукты объединения ДНК обеих плазмид (коинтеграты) (табл. 9 и рис 12 б); об этом свидетельствовали, в частности, данные по их одновременной устойчивости к хлорамфениколу (маркер pBR325) и триметоприму (маркер R388). Среди продуктов транспозиции *Tn5080a* обнаруживались как коинтеграты, так и простые инсерции с преобладанием последних. Самая высокая частота транспозиции была получена при перемещении самого *ISPpy1* (без прилегающих генов). Следует отметить, что в этом случае было возможно отбирать только коинтеграты (табл. 9).

Таблица 9. Частота образования транспозантов при перемещении *IS_{Ppy1}* и содержащих его элементов из *pBR325* в *R388*

Плаزمид-донор	Частота перемещения в <i>R388</i> *	Всего проверено транспозантов		Из них:	
		Тр-р Sm-р Rif-р	Тр-р Cm-р Rif-р	Cm-s	Cm-r
<i>pBR325-80.2</i>	$1,1 \times 10^{-6}$	94	-	83 (88,3%)	11 (11,7%)
<i>pBR325-80.1</i>	$2,6 \times 10^{-8}$	21	-	0	21 (100%)
<i>pBR325-Ppy1</i>	$2,2 \times 10^{-5}$	-	40	0	40 (100%)

Сводные данные 2-х опытов. *Sm-rRif-r/Тр-рRif-р в первых двух скрещиваниях и Cm-rRif-r/Тр-рRif-р- в 3-ем скрещивании

Чтобы получить данные о механизмах перемещения *IS_{Ppy1}* и содержащих его мобильных генетических элементов, мы проанализировали молекулярную структуру образовавшихся в этих опытах продуктов транспозиции. Для этого плазмидная ДНК 6 транспозантов *IS_{Ppy1}*, 5 – *Tn5080a* и 13 продуктов одноконцевой транспозиции была рестрицирована *AvaII* и прогибридизована с зондом на *IS_{Ppy1}*. Сводные данные по анализу структуры транспозантов различных типов представлены на рис 12в. Выводы, полученные при фенотипическом анализе структуры продуктов транспозиции при перемещении полного и неполного транспозона, были подтверждены с помощью Саузерн-гибридизации. Видно, что продукты одноконцевой транспозиции содержат по две копии *IS_{Ppy1}* (дорожка 2), что свидетельствует о возникновении коинтегратов. При перемещении *Tn5080a* возникают 2 типа продуктов транспозиции: прямые инсерции (дорожки 5 и 6) и коинтеграты (дорожка 3, а также рис. 12б). При перемещении самого *IS_{Ppy1}*, также как и сложного транспозона, образуются как прямые инсерции, так и коинтеграты (данные не представлены).

Полученные результаты выявили значительно более высокую эффективность перемещения генов устойчивости, фланкированных двумя копиями *IS_{Ppy1}*, по сравнению с эффективностью их мобилизации посредством одной копии этого элемента, а также способность сложных транспозонов, фланкированных двумя копиями *IS_{Ppy1}*, образовывать простые инсерции в процессе транспозиции.

Мы провели серию специальных экспериментов, чтобы выяснить инсерционную специфичность *IS_{Ppy1}*. Для этого был разработан метод получения посадок *IS_{Ppy1}* и производных мобильных элементов в ген *bla* векторных плазмид. Это позволило получить ряд независимых посадок *IS_{Ppy1}* и *Tn5080a* и проанализировать места инсерций и размер прямых дубликаций мишени, а также ориентацию внедрившихся мобильных элементов. Были исследованы 3 инсерции *IS_{Ppy1}* и *Tn5080a* в *pBR325* и 7 инсерций *Tn5080a* в *pGEM-5Z*. Было обнаружено, что обе возможные ориентации инсерций наблюдались с одинаковой частотой (см. рис. 13). В местах посадок наблюдались прямые дубликации мишени длиной 3-5 п. н., что характерно для всех представителей семейства *IS3*. Все инсерции были равномерно распределены по всей протяженности гена *bla*. Такой характер распределения посадок указывает на то, что, в отличие от других представителей *IS3* семейства, *IS_{Ppy1}* не обладает выраженной инсерционной специфичностью.

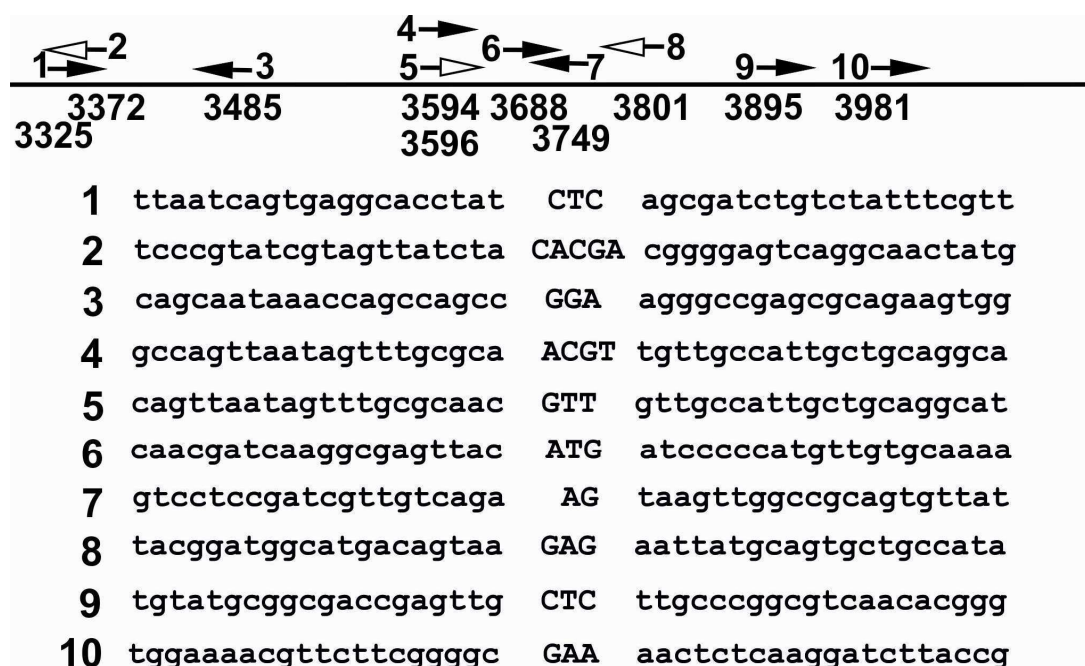


Рисунок 13. Инсерционная специфичность *ISPpy1*.

Места инсерций *ISPpy1* и *Tn5080a* в ген *bla* плазмид pBR325 и pGEM-5Zf(-). Горизонтальные стрелки указывают местоположение и ориентацию посадок мобильных элементов: белые - *ISPpy1*, черные - *Tn5080a*. Номера над стрелками указывают порядковый номер посадки, цифры под линией – местоположение инсерции по последовательности pBR325 (L08855). Ниже приведены нуклеотидные последовательности, обрамляющие инсерции. Номера слева указывают порядковый номер посадки; последовательность прямых дупликаций мишени показана в центре.

Нами было проведено исследование распространения *ISPpy1* среди современных и древних природных грамотрицательных бактерий. С помощью гибридизации колоний мы провели скрининг коллекции, содержащей 7 штаммов, относящихся к роду *Psychrobacter*, 20, принадлежащих к близкому к психробактеру роду *Acinetobacter* и 26 штаммов из родов других грамотрицательных бактерий, на наличие в ней IS-элементов, близкородственных *ISPpy1*. Однако ни один из штаммов, включая *P. maritimus* 3pS, не содержал последовательностей, родственных *ISPpy1*. Эти данные свидетельствуют о низкой транспозиционной активности *ISPpy1* в его природном хозяине и близкородственных ему штаммах.

Чтобы выяснить происхождение *ISPpy1* и найти родственные ему элементы, мы провели биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей из общедоступных баз данных. Как уже было упомянуто выше, фрагменты IS-элемента, высокогомологичного *ISPpy1*, были обнаружены в недосеквенированном геноме *Psychrobacter* sp. 1501. Вероятнее всего, в данном штамме содержится полноразмерная копия варианта *ISPpy1*. Больше IS-элементов, близкородственных *ISPpy1*, в Генбанке найдено не было. Однако мы обнаружили обширную группу IS-элементов со значительно более низкой, но всё же существенной гомологией с *ISPpy1*. Один из этих элементов был идентифицирован нами в штамме *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (Welsh et al., 2008). Мы обозначили этот IS-элемент как *ISCysp20* и сравнили его структуру с *ISPpy1*. Оказалось что гомология между *ISPpy1* и *ISCysp20* по аминокислотным последовательностям, кодируемых ими белков OrfA и OrfB, составляет

соответственно 45 и 56%, причем гомология в наиболее консервативном районе (DD(35)E мотиве) размером 102 а.о. достигает 62%. Необходимо отметить, что по всей вероятности, подобно *IS $Ppy1$* , *ISCysp20* также не способен активно перемещаться в хозяйском штамме. Об этом свидетельствует наличие единственной копии *ISCysp20* в штамме *Cyanothece* 51142 в составе линейной хромосомы (429701 п. н.), тогда как ни на кольцевой хромосоме (4, 934 т. п. н.), ни на одной из четырех плазмид, которые содержит данный штамм, не было обнаружено дополнительных копий элемента.

Чтобы выяснить эволюционные связи между *IS $Ppy1$* и родственными ему элементами и другими хорошо изученными членами семейства IS3, нами были построены филогенетические деревья на основании анализа аминокислотных последовательностей белков OrfA и OrfB (рис. 14а и б). Результаты проведенного анализа показали, что *IS $Ppy1$* , *ISCysp20* и другие родственные им элементы образуют отдельную, ранее не выявленную подгруппу внутри семейства IS3. Мы назвали данную новую подгруппу *IS $Ppy1$* -подгруппой. IS-элементы из данной подгруппы часто обнаруживаются в геномах бактерий, принадлежащих к самым разным семействам. В частности, в составе хромосом и на плазмидах мы обнаружили такие IS-элементы у представителей альфа (*Gluconobacter*, *Azospirillum*, *Magnetospirillum*, *Methylobacterium*, *Sphingobium*, *Acetobacter*, *Asticcacaulis*, *Paracoccus*, *Sphingomonas*, *Rhizobium* и другие), бета (*Nitrosomonas*, *Azoarcus*, *Polaromonas*), гамма (*Acidithiobacillus*, *Marinobacter*, *Halorhodospira*) и дельта (*Geobacter*, *Pelobacter*, *Desulfatibacillum*, *Desulfovibrio*) групп протеобактерий, а также у штаммов из таксонов *Deferribacteres* (*Denitrovibrio*), *Firmicutes* (*Moorella*, *Desulfotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Syntrophomonas*, *Bacillus*, *Sulfobacillus*), *Bacteroidetes* (*Spirosoma*, *Leadbetterella*), *Spirochaetes* (*Spirochaeta*), *Chlorobi* (*Chlorobium*, *Pelodictyon*), *Actinobacteria* (*Mycobacterium*), *Nitrospirae* (*Nitrospira*) и цианобактерий (*Cyanothece*, *Acaryochloris*). Некоторые из этих IS-элементов представлены в таблице 10.

Как было показано ранее (Mahillon & Chandler, 1998), транспозазы всех членов семейства IS3 содержат общие для всех них консервативные аминокислоты в каталитическом домене (так называемом DD(35)E мотиве). Кроме того, каждая из подгрупп этого семейства дополнительно имеет свой собственный набор консервативных аминокислот в данном районе, характерный лишь для данной подгруппы. Мы выяснили, что члены *IS $Ppy1$* -подгруппы также содержат в составе DD(35)E мотива свой собственный набор консервативных аминокислот, отличный от всех других описанных до этого подгрупп из семейства IS3 (см. рис. 14в). Следует отметить, что все проанализированные нами элементы из *IS $Ppy1$* -подгруппы на месте сигнала запрограммированного сдвига рамки считывания содержали сигналы нетипичные для IS-элементов (Baranov et al., 2002). Так вместо типичного для известных представителей семейства IS3 сигнала запрограммированного сдвига рамки считывания (A)₆G, у *IS $Ppy1$* имеется мотив (A)₈G, содержащий два дополнительных остатка аденина, а у *ISCysp20* – (A)₉G, содержащий три лишних остатка. У других представителей из *IS $Ppy1$* -подгруппы мы обнаружили последовательности сигналов ранее не описанные у IS-элементов: (U)₆G, (U)₆A, (A)₉U (см. табл. 10). Следует, однако, отметить, что функциональная активности этих сигналов исследована не была.

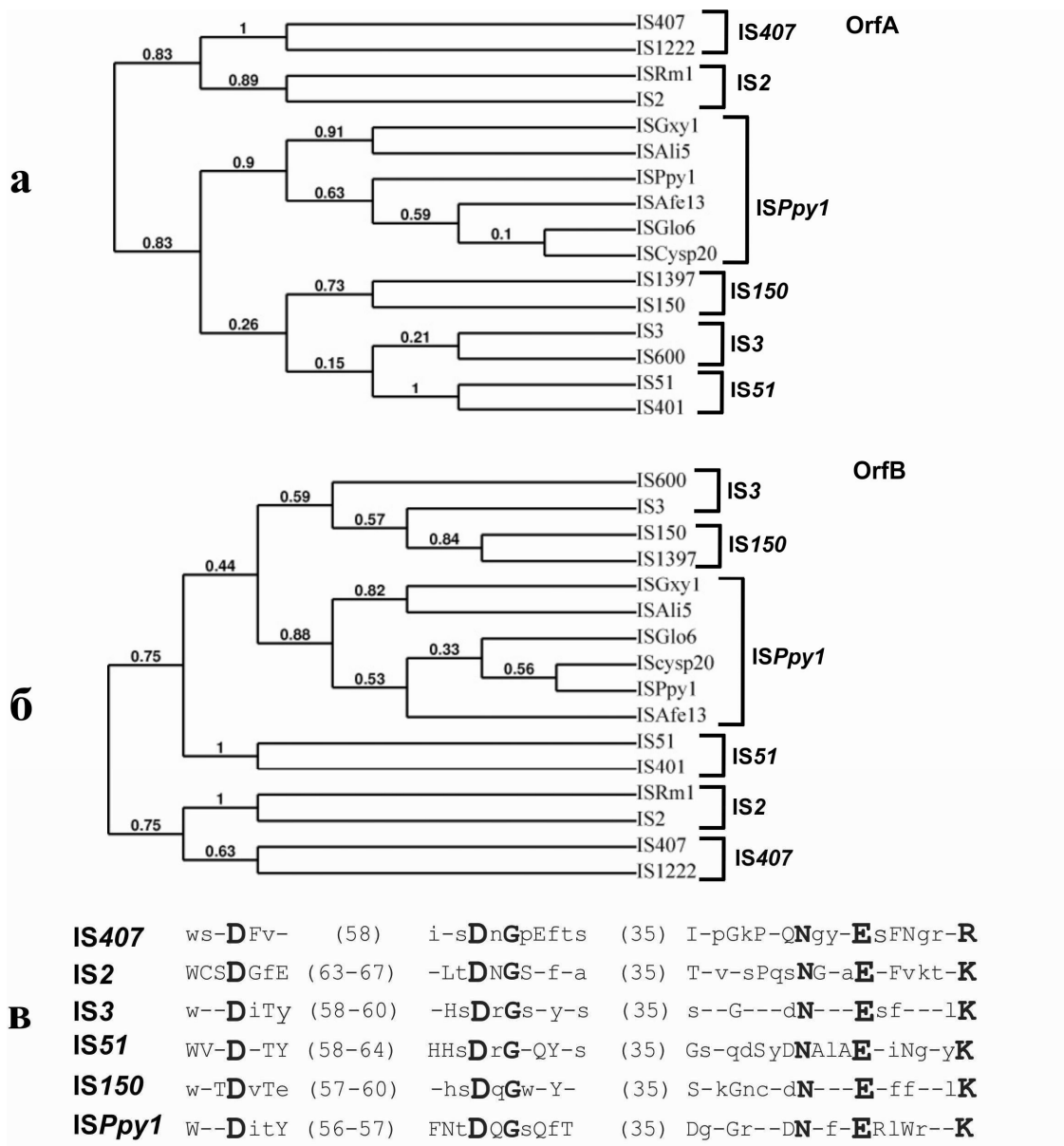


Рисунок 14. Филогенетические дендрогаммы, построенные на основании анализа аминокислотных последовательностей белков OrfA (а) и OrfB (б) методом максимального правдоподобия (maximum likelihood method). Используются последовательности двух представителей из каждой ранее описанной подгруппы IS3 семейства (Mahillon & Chandler, 1998), а также членов обнаруженной нами новой подгруппы ISPPy1. ACs: IS2 AP009048, IS3 AM946981, IS51 M14365, IS150 X07037, IS401 L09108, IS407 M82980, IS600 X05952, IS911 CP000034, IS1222 X78052, IS1296 BX293980, ISRm1 X56563, ISPPy1 AM992204, ISCysp20 CP000807, ISAFE13 CP002985, ISALI5 FQ311868, ISGlo6 CP001090, ISGxy1 AP012160. в. Сравнение DD(35)E – консервативного района новой подгруппы ISPPy1 и ранее известных подгрупп IS3 семейства (IS407, IS2, IS3, IS51 and IS150). Схема построена на основании рис. 3 из статьи Mahillon and Chandler, 1998, с модификациями и дополнениями. Указаны аминокислоты, образующие отдельные участки консервативного района, свойственные каждой из подгрупп IS3 семейства. Жирными заглавными буквами обозначены аминокислоты, имеющиеся у всех членов семейства, обычными прописными – консервативные для каждой подгруппы; строчными – встречающиеся у большинства представителей каждой подгруппы. Цифры в скобках указывают количество аминокислотных остатков между аминокислотами консервативных мотивов.

Таблица 10. Сравнение структуры IS-элементов типичной для представителей IS3 семейства и членов IS*Ppy1*-подгруппы

Название/хозяин	Локализация	Длина, п.н.	Концевые повторы		Прямые повторы	Frame-shifting signals	АС
			Длина, лев/прав	Концевые нуклеотиды			
IS3 семейство ^a	-	1200-1550	20\40	5'-TG-CA-3' 5'-TA-CA-3'	3, 4	(A) ₆ G	-
IS <i>Ppy1</i> , <i>Psychrobacter maritimus</i> MR29-12	pKLN80	1275	49\50	5'-TA-TA-3'	2-5	(A) ₈ G	AM992204
ISCysp20, <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142,	Линейная хромосома	1283 ^b	42\53 ^b	5'-TG-TG-3' ^b	-	(A) ₉ G	CP000807
IS <i>Afe13</i> <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> SS3	хромосома	1334	48\54	5'-TA-TA-3'	3	(A) ₈ G	CP002985
IS <i>Ali5</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i> 4B	Основная хромосома	1266	42\51	5'-TG-CA-3'	-	(U) ₆ G ^c	FQ311868
IS <i>Glob</i> , <i>Geobacter lovleyi</i> SZ	pGLOV01	1281 ^b	42\51 ^b	5'-CT-AG-3' ^b	-	(A) ₉ U ^c	CP001090
IS <i>Gxy1</i> , <i>Gluconacetobacter xylinus</i> NBRC 3288	pGXY010	1313 ^b	41\43 ^b	5'-AG-CT-3' ^b	-	(U) ₆ A ^c	AP012160

^a обобщенные данные; ^b определено приблизительно; ^c предполагаемые сигналы запрограммированного сбоя рамки считывания, не описанные ранее у IS-элементов.

Помимо этого, подобно IS*Ppy1*, все проанализированные нами представители из его подгруппы имеют более длинные, по сравнению с членами других подгрупп из семейства IS3, терминальные инвертированные повторы, оканчивающиеся также нехарактерными нуклеотидами (см. табл. 10).

Таким образом, нами открыта ранее неизвестная подгруппа IS-элементов, единственным функционально изученным представителем которой является IS*Ppy1*, обнаруженный нами в древнем штамме *Psychrobacter maritimus* MR29-12. Нами охарактеризованы основные свойства IS*Ppy1* и получены данные, свидетельствующие о важной роли этого элемента в мобилизации генов устойчивости к антибиотикам.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря тому, что нам удалось создать коллекцию палеобактерий, обладающих устойчивостью к соединениям ртути и различным антибиотикам, стало возможным проведение сравнительного изучения молекулярно-генетической структуры детерминант устойчивости современных и древних бактерий и их распространения до начала активного антропогенного воздействия на биосферу. Было обнаружено, что, как и у современных штаммов, у палеобактерий детерминанты устойчивости к ртути часто входят в состав плазмид

и транспозонов. Среди совсем небольшого числа штаммов из созданной коллекции были обнаружены все основные типы известных современных транспозонов, участвующих в распространении генов устойчивости к ртути и стрептомицину (табл. 11). Обнаруженный нами в мерзлоте ранее неизвестный транспозон нового типа, Tn5042, также оказался широко распространен как среди древних, так и среди современных бактерий. В ходе данной работы мы выявили ряд ярких примеров горизонтального переноса различных детерминант устойчивости и IS-элементов (табл. 11).

Таблица 11. Примеры горизонтального переноса мобильных элементов, обнаруженных у древних бактерий.

Древние мобильные элементы		Современные мобильные элементы		
Название	Хозяин	Название	Хозяин	Место выделения
Транспозоны, содержащие <i>mer</i> -оперон				
Tn5053 var8	<i>Pseudomonas</i> sp.	Tn5053 прототип (L40585)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Средняя Азия (грунт из Хайдарканского месторождения)
Tn5053 var9	<i>P. putida</i>			
Tn5058 (Y17897)	<i>P. putida</i>	Tn50580 (AM048832)	Некультивируемый микроорганизм	Казахстан (речная вода)
Tn5042 прототип (AJ563380)	<i>P. fluorescens</i>	Tn5042var 1 (AM235768)	<i>P. fluorescens</i>	Англия (сахарная свекла)
Tn5060 (AJ551280)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Tn21 (+Int) (AP000342)	<i>Shigella flexneri</i>	Япония (больница)
		Tn5075 (без Int) (AF457211)	<i>E. coli</i>	Англия (больница)
Tn5041B	<i>P. fluorescens</i>	Tn5041 прототип (X98999)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Средняя Азия (грунт из Хайдарканского месторождения)
Транспозон, содержащий гены устойчивости к стрептомицину				
Tn5393c	<i>P. putida</i> <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Brevundimonas vesicularis</i>	Tn5393c (AF262622)	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Норвегия (рыба)
Другие мобильные элементы				
TnOtChr* (FN821089)	<i>Pseudomonas</i> sp.	TnOtChr (AF313472)	<i>Ochrobactrum tritici</i>	Португалия (земля, загрязненная заводскими стоками)
IS <i>Ppy1</i> Прототип (AM992204)	<i>Psychrobacter maritimus</i>	IS <i>Ppy1v1</i> (AFHU01000198 AFHU01000091)	<i>Psychrobacter</i> sp.	США (клиника)

Из таблицы 11 видно, что формирование и широкое распространение всех основных типов транспозонов произошло уже в древности. До сих пор многие из них продолжают встречаться по всему миру у штаммов, обитающих в природных сообществах. Некоторые же обнаруживаются у клинических штаммов, убедительно свидетельствуя о том, что именно природные популяции бактерий служат основным источником как самих детерминант устойчивости, так и их отдельных частей, для клинических штаммов.

У палеобактерий, обитавших в природе до начала хозяйственной деятельности человека, были одновременно обнаружены простой транспозон устойчивости к ртути Tn5060, практически не отличающегося по нуклеотидной последовательности от гипотетического предшественника Tn21, и интегрон IntC*, содержащий единственный кассетный ген устойчивости *aadA2*, и, в свою очередь, также близкородственный гипотетическому предшественнику группы современных клинических интегронов. Из этих данных логически следует, что использование в клинике сначала препаратов ртути, а затем и антибиотиков привело к быстрому формированию из уже существовавших до этого мобильных генетических элементов новых сложных транспозонов, типа Tn21, несущих одновременно детерминанты множественной лекарственной устойчивости и *mer*-оперон.

ВЫВОДЫ

1. Впервые из многолетнемерзлых отложений выделена коллекция устойчивых к соединениям ртути и различным антибиотикам палеобактерий, относящихся к родам *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Psychrobacter*, *Plesiomonas*, *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Exiguobacterium*.

2. Продемонстрировано наличие у древних штаммов бактерий конъюгативных и неконъюгативных плазмид, содержащих *mer*-опероны и гены устойчивости к антибиотикам.

3. У Hg-г палеобактерий обнаружены все основные типы содержащих *mer*-оперон транспозонов, повсеместно распространенных среди современных природных бактерий, что свидетельствует об их широком распространении еще до начала антропогенного загрязнения биосферы.

4. В древнем штамме *Pseudomonas* sp. обнаружен простой транспозон Tn5060, практически идентичный гипотетическому предку, сложного MDR транспозона Tn21, что служит подтверждением гипотезы о происхождении сложных клинических MDR транспозонов подгруппы Tn21 от простого ртутного транспозона.

5. В штамме *Pseudomonas fluorescens* из мерзлоты обнаружен ртутный транспозон нового типа, названный Tn5042, транспозиционный модуль которого гомологичен мобильным элементам из семейства IS66. Tn5042 широко распространен как среди древних, так и среди современных бактерий.

6. У ряда штаммов палеобактерий обнаружены гены устойчивости к стрептомицину *aadA2* и *strA-strB*, а также транспозоны близкородственные Tn5393, активно участвующему в горизонтальном переносе генов *strA-strB* среди современных клинических и природных бактерий. Это свидетельствует о возникновении детерминант устойчивости к стрептомицину и их широком распространении среди природных бактерий задолго до начала использования антибиотиков.

7. В природной плазмиде древнего штамма *Psychrobacter maritimus* обнаружен новый IS-элемент, названный IS*Ppy1*, относящийся к семейству IS3, а также гены устойчивости к стрептомицину *strA-strB* и к тетрациклину *tetR-tet(H)*, высоко гомологичные генам современных клинических штаммов бактерий. IS*Ppy1* способен осуществлять горизонтальный перенос этих генов устойчивости либо путем одноконцевой транспозиции, либо за счет формирования составных транспозонов.

8. Открыта новая подгруппа IS-элементов в составе семейства IS3, единственным функционально охарактеризованным представителем которой является IS*Ppy1*.

9. В хромосоме древнего штамма *Pseudomonas* sp. обнаружен новый сложный транспозон, названный Tn5045, состоящий из трех различных мобильных элементов, вставленных последовательно один в другой. Все мобильные элементы, входящие в состав Tn5045, высокогомологичны современным, но в целом образуют уникальный ранее неизвестный сложный транспозон.

10. Составные элементы (простые ртутные транспозоны, интегроны и кассетные гены устойчивости к антибиотикам) сложных транспозонов множественной лекарственной устойчивости подгруппы Tn21 возникли у природных штаммов бактерий задолго до начала хозяйственной деятельности

человека, а в результате применения ртутных препаратов и антибиотиков в медицине в клинике произошло быстрое формирование сложных транспозонов из подгруппы Tn21 и их распространение.

11. Природные бактерии являются естественным «резервуаром» генов устойчивости, попадающих в клинические штаммы бактерий путем горизонтального переноса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК:

1. Bogdanova E.S., Bass I.A., Minakhin L.S., Petrova M.A., Mindlin S.Z., Volodin A., Kalyaeva E.S., Tiedje J.M., Hobman J.L., Brown N.L., and Nikiforov V.G. 1998. Horizontal spread of *mer* operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology* 144:609-620.
2. Никифоров В.Г., Басс И.А., Богданова Е.С., Горленко Ж.М., Каляева Э.С., Коптева А.В., Ломовская О.Л., Минахин Л.С., Минахина С.В., Миндлин С.З., Петрова М.А., Холодий Г.Я., Юрьева О.В. 1999. Распространение транспозонов устойчивости к ртути в природных популяциях бактерий. *Мол. биология* 33: 55-62.
3. Миндлин С.З., Басс И.А., Богданова Е.С., Горленко Ж.М., Каляева Э.С., Петрова М.А., Никифоров В.Г. 2002. Горизонтальный перенос генов устойчивости к соединениям ртути в природных популяциях бактерий. *Мол. биология* 36(2): 216-227.
4. Mindlin S., Kholodii G., Gorlenko Zh., Minakhina S., Minakhin L., Kalayeva E., Kopteva A., Petrova M., Yurieva O., Nikiforov V. 2001. Mercury resistance transposons of Gram-negative environmental bacteria and their classification. *Res. Microbiol.* 152: 811-822.
5. Петрова М.А., Миндлин С.З., Горленко Ж.М., Каляева Э.С., Соина В.С., Богданова Е.С. 2002. Резистентные к соединениям ртути бактерии из многолетнемерзлых отложений и перспективы их использования в сравнительных исследованиях детерминант ртуть-устойчивости. *Генетика* 38(11): 1569-1574.
6. Kholodii G., Mindlin S., Petrova M., Minakhina S. 2003. Tn5060 from the Siberian permafrost is most closely related to the ancestor of Tn21 prior to integron acquisition. *FEMS Microbiol. Lett.* 226(2): 251-255.
7. Kholodii G., Mindlin S., Gorlenko Zh., Petrova M., Hobman J. and Nikiforov V. 2004. Translocation of transposition-deficient (Tn^d*PKLH2*-like) transposons in the natural environment: mechanistic insights from the study of adjacent DNA sequences. *Microbiology*, 150: 979-992.
8. Горленко Ж. М., Каляева Э. С., Басс И. А., Петрова М. А., Миндлин С. З., 2004. Распространение в природных популяциях бактерий транспозонов Tn5044 и Tn5070, несущих неканонические *mer*-опероны. *Генетика* 40(12): 1717-1721.
9. Mindlin S., Minakhin L., Petrova M., Kholodii G., Minakhina S., Gorlenko Zh., Nikiforov V. 2005. Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds since the Upper Pleistocene. *Res. Microbiol.* 156: 994-1004.
10. Vishnivetskaya T., Petrova M., Urbance J., Ponder M., Moyer C., Gilichinsky D., Tiedje J. 2006. Bacterial Community in Ancient Siberian Permafrost as Characterized by Culture and Culture-Independent Methods. *Astrobiology* 6(3): 400-414.
11. Миндлин С. З., Петрова М. А., Басс И. А., Горленко Ж. М. 2006. Происхождение, эволюция и миграция генов лекарственной устойчивости. *Генетика* 42(11): 1495-1511.
12. Миндлин С.З., Соина В.С., Петрова М. А., Горленко Ж. М. 2008 Выделение устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий из многолетнемерзлых отложений Восточной Сибири. *Генетика* 44(1): 36-44.

13. М.А. Петрова, Ж.М. Горленко, В.С. Соина, С.З. Миндлин. 2008. Изучение ассоциации генов *strA-strB* с плазмидами и транспозонами у современных и древних бактерий. *Генетика* 44(9): 112-116
14. Petrova M., Gorlenko Zh., Mindlin S. 2009. Molecular structure and translocation of a multiple antibiotic resistance region of a *Psychrobacter psychrophilus* permafrost strain. *FEMS Microbiology Letters* 296: 190-197.
15. Petrova M., Gorlenko Zh., Mindlin S. 2011. Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium. *Res Microbiol.* 162: 337-345.
16. М.А. Петрова, Ж.М. Горленко, Н.А.Щербатова, С.З. Миндлин. 2012. Новый мобильный элемент *ISPsyI* древнего штамма *Psychrobacter maritimus*: перемещение в клетках *Escherichia coli* К-12 и образование сложных транспозонов. *Генетика* 48(3): 324-332.

Главы в монографиях:

1. Миндлин С.З., Басс И.А., Богданова Е.С., Горленко Ж.М., Каляева Э.С., Петрова М.А., Холодий Г.Я., Никифоров В.Г. “Горизонтальный перенос генов в природных популяциях бактерий. Гены и транспозоны устойчивости к соединениям ртути” в сборнике: Проблемы и перспективы молекулярной генетики, изд. "Наука", 2003, 124-146
2. David Gilichinsky, Tatiana Vishnivetskaya, Mayya Petrova, Elena Spirina, Vladimir Mamikin, Elizaveta Rivkina. *Bacteria in permafrost in Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2008, 83-102.
3. Sofia Mindlin, Mayya Petrova, Zhosefine Gorlenko, Vera Soina, Natalia Khachikian, Ekaterina Karaevskaya. “Multidrug-resistant bacteria in permafrost: isolation, biodiversity, phenotypic and genotypic analysis” in *New permafrost and glacier research*, Hauppauge, NY, Nova Science Publishers, Inc. 2009, 89-105.
4. Sofia Mindlin and Mayya Petrova. Mercury resistance transposons. In: *Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements*. Landes Bioscience. 2012, 32-52.

Материалы всероссийских и международных конференций:

1. Tiedje J., Petrova M., Moyer C. 1998. Phylogenetic diversity of bacteria from ancient Siberian permafrost. Eighth International Symposium on Microbial Ecology (ISME-8), August 9-14, 1998, Halifax, Canada.
2. Миндлин С.З., Горленко Ж.М., Петрова М.А., Холодий Г.Я., Басс И.А. «Транспозоны устойчивости к ртути и их роль в распространении множественной лекарственной устойчивости.» 3-й съезд ВОГиС, 6-12 июня 2004 г., Москва.
3. Миндлин С.З., Горленко Ж.М., Петрова М.А. «Распространение ртуть-устойчивых бактерий в природе и мобильные элементы (плазмиды и транспозоны), несущие детерминанты устойчивости к соединениям ртути». VI Международная научная конференция «Экология человека и природа». 5-11 июля 2004 г., Москва-Плес.
4. Петрова М.А. «Распространение генов устойчивости к стрептомицину среди современных и древних бактерий». Российская школа-конференция «Генетика микроорганизмов и биотехнология», посвящённая 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна. 28 ноября-1 декабря 2006 г., Москва-Пушино.
5. Petrova M.A., Soina V.S., Mindlin S.Z., Gorlenko Zh.M. Antibiotic resistance of bacteria from permafrost sediments and its similarity to that of present bacteria. II

International Conference “Biosphere Origin and Evolution”, October 28 - November 2, 2007, Loutraki, Greece.

6. Mayya Petrova, Vera Soina., Zhosefine Gorlenko., Sofia Mindlin “Multidrug resistance of bacteria isolated from Arctic permafrost sediments” II International Conference BioMicroWorld2007, 28 November - 1 December, 2007, Seville, Spain.

7. Mayya Petrova, Zhosefine Gorlenko, Vera Soina, Sofia Mindlin. “Antibiotic resistance and mobile elements of bacteria isolated from Arctic permafrost sediments.” XX International Congress of Genetics, July 12-17, 2008, Berlin, Germany.

8. Петрова М.А., Горленко Ж.М., Миндлин С.З. «Новый IS-элемент древнего штамма *Psychrobacter psychrophilus* и его роль в распространении устойчивости к антибиотикам». V съезд ВОГиС, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина. 21-28 июня 2009 г., Москва.

9. Mayya Petrova. “Mechanisms of antibiotic resistance in natural bacterial populations” Bilateral scientific seminar franco-russian “Transcription - from basic mechanisms to drugs”, October 19-22, 2009, Montpellier, France.

10. Petrova M.A., Soina V.S., Gorlenko G.M., Mindlin S.Z. “Genetic characterization of ancient permafrost bacteria as compared with modern-day soil and water bacteria”. X European Workshop on Astrobiology, September 6-8, 2010, Pushino, Russia.