КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

НОВАЯ ПЛАЗМИДА PALWVS1.4 ШТАММА ACINETOBACTER LWOFFII VS15, НЕСУЩАЯ ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К ХЛОРАМФЕНИКОЛУ

© 2020 г. А. Я. Ермакова^{*a*}, А. В. Белецкий^{*a*}, А. В. Марданов^{*a*}, М. А. Петрова^{*b*}, Н. В. Равин^{*a*}, А. Л. Ракитин^{*a*}, *

^аИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия ^bИнститут молекулярной генетики РАН, Москва, 123182 Россия *e-mail: rakitin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 19.04.2020 г. После доработки 07.05.2020 г. Принята к публикации 08.05.2020 г.

В результате секвенирования и анализа генома устойчивого к хлорамфениколу штамма Acinetobacter lwoffii VS15, выделенного из вечной мерзлоты, обнаружена кольцевая плазмида длиной 11964 п.о., названная pALWVS1.4. Помимо генов, обеспечивающих поддержание плазмиды и ее мобилизацию, pALWVS1.4 содержит ген *cflA*, кодирующий мембранный белок семейства MFS транспортеров. Близкие гомологи *cflA* встречаются у бактерий рода *Psychrobacter*, но отсутствуют в геномах *Acinetobacter*. Ген *cflA* фланкирован двумя копиями IS элемента семейства IS4, что указывает на его приобретение штаммом VS15 за счет горизонтального переноса в составе предполагаемого составного транспозона. Получен рекомбинантный штамм *Escherichia coli* – продуцент CflA и показано, что в условиях индуцированной экспрессии штамм обладает устойчивостью к хлорамфениколу.

Ключевые слова: *Acinetobacter*, вечная мерзлота, устойчивость к антибиотикам, плазмида, горизонтальный перенос генов

DOI: 10.31857/S0026365620050079

Бактерии рода Acinetobacter повсеместно распространены благодаря своей способности адаптироваться к различным экологическим нишам (Touchon et al., 2014). Некоторые виды, прежде всего A. baumannii, являются клинически важными патогенами, другие, например, A. calcoaceticus, A. johnsonii, A. haemolyticus и A. lwoffii, широко распространены и в природе, и в клинике, а большинство вилов обитает в волных экосистемах и почвах (Doughari et al., 2011). Такая пластичность штаммов Acinetobacter во многом обеспечивается большим набором разнообразных плазмид. Распространение детерминант устойчивости к антибиотикам, входящих в состав различных мобильных элементов, и связанный с этим рост числа резистентных клинических штаммов Acinetobacter является важной проблемой для медицины (Da Silva, Domingues, 2016). Источником мобильных элементов с генами устойчивости могут быть как природные штаммы Acinetobacter, так и другие виды бактерий.

В настоящее время выявлено четыре основных механизма устойчивости бактерий к антибиотикам: (1) модификация мишени действия антибиотика, (2) ферментативная инактивация антибиотика, (3) снижение проницаемости мембран микробной клетки, (4) активное выведение антимикробных препаратов из клетки с помощью различных транспортеров (Nikaido, 2009; van Hoek et al., 2011).

Механизм устойчивости, обусловленный активным выведением молекул антибиотика из клетки, основывается на работе специализированного набора белков, образующих трансмембранные транспортеры. Такие трансмембранные помпы способны транспортировать токсичные вещества, ксенобиотики, в том числе и антибиотики большинства известных на данный момент классов, из внутриклеточного пространства во внешнюю среду (Marquez, 2005). На данный момент описано несколько семейств бактериальных транспортеров (Marquez, 2005; Biswas et al., 2008; Li et al., 2010): ABC суперсемейство (ATP-binding Cassette), MFS суперсемейство (Major Facilitator Superfamily), MATE семейство (Multidrug And Toxic Compound Extrusion), SMR семейство (Small Multidrug Resistance) и RND суперсемейство (Resistance-Nodulation-Division). MFS транспортеры составляют одно из самых широко распространенных суперсемейств. Они способны переносить широкий круг биологически активных веществ: моно и олигосахариды, антибиотики, аминокислоты, нуклеозиды, фосфорорганические эфиры, метаболиты цикла Кребса (Pao et al., 1998; Kumar et al., 2020). Энергия для переноса обеспечивается катионным градиентом, чаще всего H^+ или Na^+ (Law et al., 2008).

Ранее из многолетнемерзлых пород Колымской низменности, имеющих возраст 20–40 тыс. лет, нами был выделен штамм *Acinetobacter lwoffii* VS15, и было установлено, что он устойчив к стрептомицину (100 мг/мл), спектиномицину (100 мг/мл) и хлорамфениколу (20 мг/мл) (Mindlin et al., 2009). Нами было показано, что устойчивость к стрептомицину и спектиномицину детерминирована геном *aadA27*, который несет плазмида pALWED1.8 (Kurakov et al., 2016).

Целью данной работы являлся определение нуклеотидной последовательности и анализ генетической структуры другой плазмиды, pALWVS1.4, из этого штамма и функциональная характеристика содержащегося в ней гена устойчивости к хлорамфениколу.

Для секвенирования генома штамма A. lwoffii VS15 использовали технологии Illumina ("Illumina". США) и мономолекулярного нанопорового секвенирования ("Oxford Nanopore", Великобритания). В результате секвенирования библиотеки геномной ДНК на Illumina MiSeq было получено 1.1 млн пар чтений (2 × 300 нт). Дополнительно геномную ДНК секвенировали с помощью системы MinION ("Oxford Nanopore", Великобритания), в результате чего было получено 52924 чтения со средней длиной 6610 нт (всего 349.9 млн нт). Для сборки контигов из всех чтений использовали программу Unicycler v. 0.4.8 (Wick et al., 2017). В результате была получена полная кольцевая последовательность хромосомы длиной 3260140 нт и 8 кольцевых контигов размером 134096, 32788, 15780, 11964, 10985, 6814, 4677, 4135 нт, вероятно, представляющих плазмиды. Плазмида длиной 4135 нт соответствовала ранее описанной pALWED1.8, а плазмида длиной 11964 нт, обозначенная pALWVS1.4, была исследована в настоящей работе.

Плазмида pALWVS1.4 (GenBank MT319099) является низкокопийной, средняя кратность прочтения соответствующего контига при секвенировании генома в 3.47 раза превышала среднюю кратность прочтения хромосомы. Генетическая организация плазмиды представлена на рис. 1. Плазмида содержит гены белков, ответственных за инициацию репликации (repB), конъюгативный перенос за счет мобилизации конъюгативными плазмидами (mobA, mobC) и токсин-антитоксиновый модуль (relB, relE), обеспечивающий стабильное наследование плазмиды в популяции за счет действия механизма постсегрегационного киллинга (Gotfredsen, Gerdes, 1998). Перед геном repB расположен сайт инициации репликации (ori). Также в плазмиде содержится оперон, включающий гены диоксигеназы и транспортера лизина (lysO). Участки плазмиды pALWVS1.4, включающие все эти гены (с 1 по 6532 и с 7347 по 7514 нуклеотид), более чем на 99% идентичны по нуклеотидной последовательности плазмидам pALWED1.5 (GenBank CP032114), pALWEK1.7 (GenBank CP032109), и pZS-6 (GenBank CP019151) из двух древних (также выделенных из вечной мерзлоты) и современного штаммов *A. lwoffii* (рисунок).

Два участка плазмиды pALWVS1.4 (с 6533 по 7346 и с 7515 по 11964 нуклеотид), в этих родственных плазмидах отсутствует. Эти участки содержит одну копию IS элемента ISAlw31 семейства IS5 и лве илентичные копии IS элемента ISAba1 семейства IS4 (рисунок). Обнаруженные в pALWVS1.4 мобильные элементы лишь единичными нуклеотилными заменами отличаются от последовательностей ISAlw31 и ISAba1. обнаруженных в A. lwoffii ZS207 и A. baumannii CLA-1. В обоих IS элементах содержатся открытые рамки считывания, кодирующие транспозазы, однако в них имеется по одной точке сдвига рамки считывания. Вероятно, образование полноразмерной транспозазы обеспечивается программируемым сдвигом рамки считывания, что было показано для ISAba1 из A. baumannii (Mugnier et al., 2009).

Между двумя копиями ISAba1 в плазмиде pALWVS1.4 расположен ген cflA, кодирующий MSF транспортер семейства Bcr/CflA (InterPro IPR004812). Предположительно, это ген устойчивости к хлорамфениколу. Инсерционные элементы ISAba1 часто встречаются в плазмидах и хромосомах Acinetobacter, реже у некоторых других гамма-протеобактерий. В ряде случаев они образуют составные транспозоны, состоящие из двух копий ISAba1, между которыми располагаются гены устойчивости к антибиотикам. К настоящему времени описано два таких транспозона: Tn6252 (Hamidian, Nigro, 2019), содержащий ген устойчивости к карбапенемам оха235, входящий в состав плазмиды pO237-4 из A. baumannii 11A14CRGN003. и Tn6168 (Hamidian et al., 2019) с геном резистентности к цефалоспоринам – *атрС* в плазмиде pJ9-3 из A. baumannii J9 (рисунок). Однако структура, в которой между двумя копиями ISAba1 располагался бы гомолог гена cflA, ранее не была описана. Способность к транспозиции обнаруженного нами элемента требует экспериментальной проверки.

Сравнение pALWVS1.4 и сходных по нуклеотидным последовательностям плазмид pALWED1.5, pZS-6 и pALWEK1.7 показало, что они являются для нее предковыми формами. pALWVS1.4 отличается от этих плазмид только наличием двух вставок — IS элемента ISAlw31 и составного транспозона, включающего две копии ISAba1 и ген cflA между ними (рис. 1).

Ген *cflA* кодирует белок, состоящий из 398 аминокислотных остатков, с расчетной молекулярной массой 43.1 кД. Анализ вторичной структуры CflA с помощью TMHMM Server v. 2.0 (http:// www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) выявил наличие 12 трансмембранных спиралей, что указывает на мембранную локализацию белка. Поиск сходных последовательностей в GenBank показал, что *cflA* по



Рис. 1. Генетическая организация плазмиды pALWVS1.4. Координаты указаны (в нт) в соответствии с последовательностью pALWVS1.4 (GenBank MT319099). Гены базового модуля выделены серыми стрелками, гены транспозаз – черными стрелками, гены устойчивости к антибиотикам *cflA*, *оха235* и *ampC* – стрелками без заливки. IS элементы плазмиды pALWVS1.4 показаны прямоугольниками. В нижней правой части рисунка изображена структура транспозонов Tn6252 из pO237-4 и Tn6168 из pJ9-3; черными стрелками обозначены копии IS*Aba1. duf4105* – ген белка с консервативным доменом DUF4105, функция которого неизвестна. Серой заливкой соединены участки плазмид с идентичностью нуклеотидных последовательностей выше 99%.

нуклеотидной последовательности полностью идентичен транспортеру MSF семейства (WP_075107253) из *Psychrobacter* sp. C_20.9, выделенного из морских моллюсков в Испании (Lasa, Romalde 2017). Белки, сходные по аминокислотным последовательностям на 60–78%, встречаются у различных гамма-протеобактерий. Гомологи *cflA* имеются и в геномах различных штаммов *Acinetobacter*, однако уровень идентичности аминокислотных последовательностей не превышает 61%.

Для функциональной характеристики CflA coответствующий ген был клонирован в экспрессионном векторе рQE30, в котором предварительно был делетирован собственный ген cat устойчивости к хлорамфениколу (вектор pQE30 Δ Cm). Рекомбинантную плазмиду pQE30 Δ Cm cflA вводили в штамм *Escherichia coli* DLT1270, в котором индуцируемая экспрессия может осуществляться путем внесения ІРТС в среду. Единичной колонией бесплазмидного штамма DLT1270, штамма с "пустым" DLT1270/pQE30\DCm вектором И штамма DLT1270/pQE30ΔCm cflA инокулировали 5 мл среды LB (для штаммов с плазмидами добавляли 100 мкг/мл ампициллина) и выращивали на шейкере при 37°С в течение 16 ч. Затем полученные культуры засевали в соотношении 1 : 100 в среду LB с добавлением 1 мМ ІРТС и выращивали до достижения $OD_{600} = 0.5$. Культуры разводили физиологическим раствором до оптической плотности $OD_{600} = 0.1$ и рассевали на чашки с агаром, содержащем 1 мМ ИПТГ и хлорамфеникол в концентрациях 0, 2.5, 5 и 10 мкг/мл. Чашки выдерживали в термостате при 37°C в течение 3 сут, регистрируя рост колоний. Опыт повторяли 3 раза. В результате установлено, что плазмида pQE30 Δ Cm_cflA придает клеткам штамма DLT1270 устойчивость к хлорамфениколу в концентрации 2.5 мкг/мл, при которой бесплазмидный штамм и штамм с "пустым" вектором колоний не образовывали. При концентрациях хлорамфеникола 5 и 10 мкг/мл рост колоний не наблюдался ни для одного из тестируемых штаммов. В отсутствии ИПТГ образование колонии на чашках с хлорамфениколом не наблюдали. Таким образом, белок CflA способен придавать клеткам штамма *E. coli* DLT1270 низкий уровень устойчивости к хлорамфениколу, по-видимому, обеспечивая экспорт антибиотика из клетки.

Хотя штамм A. lwoffii VS15 был выделен из многолетнемерзлых отложений на Северо-Востоке Сибири, ген транспортера хлорамфеникола плазмиды pALWVS1.4 оказался полностью идентичен гену cflA из "морского" штамма бактерий рода Psychrobacter, выделенного в Испании, а близкие гомологи в геномах других Acinetobacter отсутствовали. При этом фланкирующий cflA мобильный элемент почти полностью (1 замена на 1180 нт) идентичен ISAba1 из клинического штамма A. baumannii CLA-1. По-видимому, инсерция гена cflA в плазмиду-предшественник pALWVS1.4 произошла за счет перемещения составного транспозона несколько десятков тысяч лет назад. Полученные данные позволяют предполагать, что подобные составные транспозоны могут участвовать в переносе генов лекарственной устойчивости между природными и клиническими штаммами Acinetobacter.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

Вклад авторов: А.Я. Ермакова и А.Л. Ракитин – анализ последовательности плазмиды, функциональная характеристика транспортера хлорамфеникола, подготовка статьи; А.В. Белецкий и А.В. Марданов – получение полной нуклеотидной последовательности плазмиды; М.А. Петрова – выделение штамма *A. lwoffii* VS15 и подготовка статьи; Н.В. Равин – анализ данных и подготовка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Biswas S., Raoult D., Rolain J.M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis // Int. J. Antimicrob. Agents. 2008. V. 32. P. 207–220.

Da Silva G.J., Domingues S. Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii* // Microorganisms. 2016. V. 4. pii: E29.

Doughari H.J., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview // Microbes Environ. 2011. V. 26. P. 101–112.

Gotfredsen M., Gerdes K. The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family // Mol. Microbiol. 1998. V. 29. P. 1065–1076.

Hamidian M., Hawkey J., Wick R., Holt K.E., Hall R.M. Evolution of a clade of *Acinetobacter baumannii* global clone 1, lineage 1 via acquisition of carbapenem- and aminogly-coside-resistance genes and dispersion of IS*Aba1* // Microb. Genom. 2019. V. 5. e000242.

Hamidian M., Nigro S.J. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii // Microb. Genom. 2019. V. 5. e000306. Kumar S., Lekshmi M., Parvathi A., Ojha M., Wenzel N., Varela M.F. Functional and structural roles of the Major Facilitator Superfamily bacterial multidrug efflux pumps // Microorganisms. 2020. V. 8. pii: E266.

Kurakov A., Mindlin S., Beletsky A., Shcherbatova N., Rakitin A., Ermakova A., Mardanov A., Petrova M. The ancient small mobilizable plasmid pALWED1.8 harboring a new variant of the non-cassette streptomycin/spectinomycin resistance gene aadA27 // Plasmid. 2016. V. 8. P. 36–43.

Lasa A., Romalde J.L. Genome sequence of three Psychrobacter sp. strains with potential applications in bioremediation // Genomics Data. 2017. V. 12. P. 7–10.

Li X.Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update // Drugs. 2010. V. 69. P. 1555–1623.

Marquez B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors // Biochimie. 2005. V. 87. P. 1137–1147.

Mindlin S.Z., Petrova M.A., Gorlenko Zh.M., Soina V.S., Khachikian N.A., Karaevskaya E.A. Multidrug-resistant bacteria in permafrost: isolation, biodiversity, phenotypic and genotypic analysis // New permafrost and glacier research / Eds. Krugger M.I. and Stern H.P. Hauppauge. N.Y.: Nova Science, 2009. P. 89–105.

Mugnier P.D., Poirel L., Nordmann P. Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii* // J. Bacteriol. 2009. V. 191. P. 2414–2418.

Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria // Annu. Rev. Biochem. 2009. V. 78. P. 119–146.

Pao S.S., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr. Major facilitator superfamily // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. P. 1–34. Touchon M., Cury J., Yoon E.J., Krizova L., Cerqueira G.C., Murphy C., Feldgarden M., Wortman J., Clermont D., Lambert T., Grillot-Courvalin C., Nemec A., Courvalin P., Rocha E.P. The genomic diversification of the whole Acinetobacter genus: origins, mechanisms, and consequences // Genome Biol. Evol. 2014. V. 6. P. 2866–2882.

van Hoek A.H., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J. Acquired antibiotic resistance genes: an overview // Front. Microbiol. 2011. V. 2. Article 203.

Wick R.R., Judd L.M., Gorrie C.L., Holt K.E. Unicycler: resolving bacterialgenome assemblies from short and long sequencing reads // PLoS Comput. Biol. 2017. V. 13. e1005595.

A Novel Plasmid pALWVS1.4 from *Acinetobacter lwoffii* Strain VS15, Carrying the Chloramphenicol Resistance Gene

A. Y. Ermakova¹, A. V. Beletsky¹, A. V. Mardanov¹, M. A. Petrova², N. V. Ravin¹, and A. L. Rakitin^{1, *}

¹Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: rakitin@biengi.ac.ru

Received April 19, 2020; revised May 7, 2020; accepted May 8, 2020

Sequencing and analysis of the genome of the chloramphenicol-resistant strain *Acinetobacter lwoffii* VS15, isolated from permafrost, revealed a circular plasmid 11964 bp in length, designated pALWVS1.4. Apart from the genes supporting the plasmid maintenance and mobilization, pALWVS1.4 contains the *cflA* gene encoding the membrane protein of the MFS transporter family. Close homologues of *cflA* were found in bacteria of the genus *Psychrobacter*, but were absent in the *Acinetobacter* genomes. The *cflA* gene is flanked by two copies of IS elements of the IS4 family, indicating that it was acquired by *A. lwoffii* VS15 via horizontal transfer within this putative composite transposon. A recombinant *Escherichia coli* strain expressing CflA was obtained and it was shown that under conditions of induced expression, the strain was resistant to chloramphenicol.

Keywords: Acinetobacter, permafrost, antibiotic resistance, plasmid, horizontal gene transfer