

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

4·2012

Квартальный  
научно-теоретический журнал

Основан в январе 1983 г.

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. В. КОСТРОВ  
Зам. главного редактора Ю. М. РОМАНОВА  
Ответственный секретарь Т. С. ИЛЬИНА

В. И. АГОЛ, А. Д. АЛЬТШТЕЙН, В. А. ГВОЗДЕВ, В. Н. ГЕРШАНОВИЧ,  
А. Л. ГИНЦБУРГ, В. В. ДЕМКИН, Н. В. КАВЕРИН, Е. Д. КУЗНЕЦОВА (научный  
редактор), С. А. ЛИМБОРСКАЯ, С. А. ЛУКЬЯНОВ, Н. Ф. МЯСОЕДОВ,  
С. В. НЕТЕСОВ, Е. Д. СВЕРДЛОВ, Г. Б. СМЕРНОВ, Н. И. СМЕРНОВА,  
В. З. ТАРАНТУЛ

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А. М. БОРОНИН (Пушино-на-Оке), В. И. ВОТЯКОВ (Минск), А. А. ПРОЗОРОВ  
(Москва), Н. В. ТОМИЛИН (Санкт-Петербург), Ю. К. ФОМИЧЕВ (Минск),  
С. В. ШЕСТАКОВ (Москва)

Журнал утвержден в Перечне ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Бюллетень ВАК)

Журнал полностью переводится на английский язык в США издательством ALLERTON PRESS, INC.

Сведения о статьях, публикуемые в журнале, размещаются в следующих международных информационно-справочных изданиях: *Index Medicus*, *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *Ulrich's International Periodicals Directory*, а также журнал включен в информационные продукты Thomson Reuters. Начиная с тома 23 (1) 2008 г. издание индексируется и вносится в следующие базы данных:

- Science Citation Index Expanded (известный также как SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition®
- Biotechnology Citation Index®
- Biological Abstracts
- BIOSIS Previews.



МОСКВА «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

## ОБЗОР

- Ильина Т. С.** Мобильные ISCR-элементы: структура, функции и роль в создании, наращивании и распространении блоков бактериальных генов множественной резистентности к антибиотикам ..... 3

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Jun Li Huang, Ling Xiao Bao, Han Yan Zou, Shu Gang Che, Gui Xue Wang.** High-level production of a cold-active  $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* Bs5 and its molecular cloning and expression ..... 14
- Попова А. В., Мякина В. П., Платонов М. Е., Воложанцев Н. В.** Молекулярно-генетическая характеристика антибиотикоустойчивых штаммов *Acinetobacter baumannii* и оценка их чувствительности к бактериофагу AP22 ..... 18
- Байгильдина А. А., Исламгулов Д. В.** Генетическая детерминированность изменения экспрессии VE-кадгерина и повышенной деэндотелизации сосудов при геморрагической лихорадке с почечным синдромом ..... 23
- Кулаков Ю. К., Цирельсон Л. Е., Желудков М. М.** Молекулярно-генетическая характеристика изолятов бруцелл, выделенных от собак и оленей в различных регионах России ..... 28
- Жираковская Е. В., Аксанова Р. Х., Горбунова М. Г., Тикун А. Ю., Курильчиков А. М., Соколов С. Н., Нетесов С. В., Тикунова Н. В.** Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в Западной Сибири в 2007—2011 гг. .... 33
- Алфавитный указатель статей, опубликованных в журнале "Молекулярная генетика, микробиология и вирусология" в 2012 г. .... 42

## REVIEW

- Ilyina T. S.** Mobile ISCR Elements: Structure, Functions, and Role in the Emergence, Increasing and Spreading of Blocks of Bacterial Genes of Multiple Antibiotic Resistance

## EXPERIMENTAL WORKS

- Jun Li Huang, Ling Xiao Bao, Han Yan Zou, Shu Gang Che, and Gui-Xue Wang** High-Level Production of a Cold-Active  $\beta$ -Mannanase from *Bacillus subtilis* Bs5 and Its Molecular Cloning and Expression
- Popova A. V., Myakinina V. P., Platonov M. E., and Volozhantsev N. V.** Molecular Characterization of the Multidrug-resistant *Acinetobacter Baumannii* Strains and Assessment of Their Sensitivity to the Phage Ap22
- Baygildina A. A. and Islamgulov D. V.** Genetic Determinancy of the Change in the VE-Cadherin Expression and Intensified Vessel Deendothelisation at Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome
- Kulakov Y. K., Tsirelson L. E., and Zheludkov M. M.** Molecular-genetic Characterization of Canine and Rangiferine Brucella Isolates from Different Regions of Russia
- Zhirakovskaya E. V., Aksanova R. Kh., Gorbunova M. G., Tikunov A. Yu., Kurilshchikov A. M., Sokolov S. N., Netesov S. V., and Tikunova N. V.** Genetic Diversity of Group A Rotavirus Isolates Found in Western Siberia in 2007-2011
- Index of articles published in "Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya" in 2012



Почтовый адрес редакции:

**Москва, 115088****ул. Новоостاپовская, д. 5, стр. 14****ОАО «Издательство "Медицина"»**

Редакция журнала "Молекулярная генетика, микробиология и вирусология"

Тел. редакции: 8 (499) 264-36-66

Зав. редакцией И. Х. Измайлова

## ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс 8-499-264-00-90

**Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.**

Редактор Е. И. Константинова

Художественный редактор  
**М. Б. Белякова**

Корректор А. В. Малахова

Переводчик С. К. Чаморовский

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Сдано в набор 02.08.12  
Подписано в печать 14.09.12  
Формат 60 × 88%.  
Печать офсетная. Печ. л. 5,00.  
Усл.-печ. л. 4,90. Уч.-изд. л. 5,50.  
Заказ 548.  
Подписной тираж номера 205 экз.  
ЛР №010215 от 29.04.97 г.  
E-mail: meditsina@mtu-net.ru  
**www.medlit.ru**  
Отпечатано в типографии ООО «Подольская Периодика»,  
142110, Подольск, ул. Кирова, 15

---

ОБЗОР

---

© Т. С. ИЛЬИНА, 2012  
УДК 575.826:577.216.9:579.253

Т. С. Ильина

**МОБИЛЬНЫЕ ISCR-ЭЛЕМЕНТЫ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И РОЛЬ В СОЗДАНИИ, НАРАЩИВАНИИ И РАСПРОСТРАНЕНИИ БЛОКОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ**

ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России, Москва

В обзоре рассмотрены данные литературы о недавно открытом способе горизонтального распространения бактериальных генов на примере генов лекарственной резистентности, характерном для атипичных инсерционных последовательностей ISCR. Механизм транспозиции этих элементов, включающий репликацию по типу "катящегося кольца", образование автономных не реплицирующихся кольцевых структур и гомологичную рекомбинацию, обеспечивает мобилизацию любого участка прилегающей ДНК. ISCR-элементы представляют более мощную систему распространения генов, чем транспозоны и интегроны, и способствуют быстрому появлению целых групп мобильных генов, включая гены устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам. Рассмотрены данные о структурной организации и функциях ISCR-элементов, их сходстве с группой IS91-подобных элементов и отличии от нее, их роли в создании, наращивании и распространении блоков генов, кодирующих множественную резистентность к антибиотикам, их роли в эволюции бактериальных и плазмидных геномов.

**Ключевые слова:** *распространение генов резистентности к антибиотикам, атипичные IS-элементы — ISCR, горизонтальный перенос генов, эволюция бактерий*

### Введение

Широкое использование секвенирования бактериальных геномов, плазмид и бактериофагов и возможность проведения сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов или их отдельных участков способствуют быстрому прогрессу исследований в области молекулярной генетики. В частности, в молекулярной генетике бактерий появилась возможность решать вопросы, связанные с эволюцией бактерий, механизмами их быстрой адаптивной изменчивости, созданием, происхождением и способами распространения блоков из неродственных для бактерий генов, их наращиванием. Особенно заметные успехи достигнуты в изучении механизмов распространения бактериальных генов, ответственных за появление бактерий, устойчивых к таким лекарственным препаратам, как широко применяемые в медицине антибиотики. Это определяется чрезвычайно большой значимостью антибиотиков при использовании их в медицинской практике и высокой селективностью признаков антибиотикорезистентности, способствующей проведению исследований.

Наряду с расширяющимся со временем спектром используемых природных и синтетических антибиотиков повсеместно регистрируется появление множественной лекарственной устойчивости (multiple drug resistance — MDR) и ее угрожающее распространение среди патогенных бактерий разных видов и родов.

Гены лекарственной устойчивости распространяются с помощью систем, включающих сайтспецифичную и гомологичную рекомбинации и генетиче-

ские структуры, такие как плазмиды, инсерционные последовательности (IS-элементы), транспозоны (Tn-элементы), интегроны с их генными кассетами. Кроме того, в этом процессе участвуют и другие сложно организованные модульные структуры — интегрирующие конъюгативные и мобилизуемые элементы (ICE и IME соответственно), геномные острова. Эти системы участвуют в переносе генов как в пределах одной молекулы ДНК, так и между разными молекулами (хромосомная—плазмидная, хромосомная—фаговая), находящимися в одной клетке, способными в дальнейшем обеспечить межклеточное распространение генов посредством конъюгации, трансформации или трансдукции.

Наиболее активными в межклеточном переносе и распространении чужеродных генов среди бактерий разных таксономических групп являются бактериальные плазмиды, особенно конъюгативные, способные осуществлять не только свой собственный перенос из одних клеток в другие, но и мобилизовать перенос неконъюгативных плазмид. Обычно плазмиды несут широкое разнообразие генов, помогающих клеткам бактерий выживать в создающихся определенных условиях, например в присутствии антибиотиков или солей тяжелых металлов, или обеспечивать их проникновение и существование внутри инфицируемых организмов. Появление таких генов в плазмидах в большинстве случаев связывали с мобильными элементами — транспозонами и интегронами, способными включать кассетные гены.

Большинство транспозонов несут в своем составе гены резистентности к антибиотикам. Некоторые из них, такие как Tn5, Tn4001, Tn21, содержат несколько генов резистентности, а если в их состав входит интегрон (например, в Tn21), число таких генов может возрастать за счет последовательного включения ряда кассетных генов, обеспечивающих множественную резистентность к антибиотикам.

Интегроны способны включать в один и тот же сайт интеграции несколько кассетных генов резистентности, экспрессирующихся с промотора интегрона (своего промотора кассетные гены обычно не имеют), и, кроме того, иногда они содержат гены резистентности, не имеющие кассетной организации. Каким образом они попадают в интегрон, какое-то время оставалось загадкой. Сами интегроны не являются мобильными, их распространение обычно связывают с транспозонами или плазмидами.

Сравнительно недавно стало очевидно, что в создании блоков генов, включая гены резистентности к ан-

тибиотикам, в составе плазмид и других генетических элементов принимает участие по крайней мере еще одна система рекомбинации. Об этом свидетельствует появление в последнее десятилетие все большего количества работ, связанных с выделением и изучением клинических штаммов самых разных патогенных бактерий, отличающихся устойчивостью ко многим антибиотикам, таким как бета-лактамазы классов А, С, D широкого спектра активности, металло-бета-лактамаза (MBL), квинолоны, триметоприм, хлорамфеникол, аминогликозиды, тетрациклин, флорфеникол, макролиды и др. Удивительным было то, что гены резистентности к целому ряду антибиотиков в этих штаммах локализованы в одном участке хромосомы или плазмиды в виде отдельных блоков. Механизм появления и распространения таких блоков стал понятен после открытия особых последовательностей, CR (common regions), сцепленных с этими группами генов [82]. Найденные первоначально в составе двух интегров класса 1, они оказались родственными, способными независимо транспозироваться с помощью механизма, включающего репликацию по типу "катящегося кольца" (rolling circle — RC). При таком способе транспозиции CR-последовательности могли осуществлять перемещение не только самих себя, но и прилегающих к их терминальному концу последовательностей ДНК, часто представленных генами резистентности к антибиотикам. В результате следующих друг за другом актов транспозиции ряды таких генов могут увеличиваться, создавая большие блоки способных к перемещениям генов.

Позднее были получены данные о том, что CR-элементы связаны не только с генами устойчивости к антибиотикам. Они были найдены у многочисленных грамотрицательных бактерий в штаммах клинического происхождения, а также у некоторых представителей грамположительных бактерий, выделенных в различных странах и континентах. CR-элементы обнаружены в составе как хромосом, так и плазмид, сцепленных с самыми разными генами. Они участвуют в образовании геномных островов патогенности сложной организации и некоторых из известных интегративных конъюгативных элементов бактерий (типа SXT холерного вибриона), обеспечивая появление в этих структурах генов множественной лекарственной устойчивости и, возможно, других генов [75, 82, 85].

Механизм транспозиции CR-элементов обеспечивает способность мобилизовать любой участок прилегающей ДНК. На основании изучения их свойств и анализа накопленных в литературе данных исследователи, активно занимающиеся этой проблемой [82, 85], пришли к выводу, что CR представляют более мощную систему распространения генов, чем интегроны, и являются ответственными за быстрое появление и распространение целых групп новых генов, включая гены, контролирующие устойчивость патогенных бактерий к антибиотикам.

В представленном обзоре будут рассмотрены данные литературы о структурной организации и функциях CR-элементов, их сходстве с атипичной группой IS91-подобных элементов, сходстве и различиях известных CR-элементов между собой и с IS-элементами бактерий, их роли в создании, нара-

щивании и горизонтальном распространении блоков генов, кодирующих множественную резистентность к антибиотикам.

### Обнаружение CR-элементов в составе интегров класса 1

Среди бактерий, принадлежащих к семейству Enterobacteriaceae и псевдомонадам, перенос генов резистентности к антибиотикам обусловлен главным образом плазмидами широкого круга хозяев, несущими транспозоны [25]. Многие гены резистентности в транспозонах представлены мобильными генными кассетами, являющимися частью интегров [34]. Описано 4 класса интегров на основании данных о сходстве кодируемых ими интеграз, причем большинство из них принадлежит к классу 1 интегров, и этот тип был найден у многих представителей семейства Enterobacteriaceae, включая *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. и *Salmonella* spp.

Интегроны — это природные системы клонирования и экспрессии генов, которые способны улавливать с помощью сайтспецифической рекомбинации гены, имеющие организацию генных кассет, и обеспечивать их активное функционирование [70, 71]. Они не являются трансмиссивными генетическими структурами и распространяются с помощью мобильных элементов [3, 23, 24, 80]. В некоторых штаммах, отличающихся множественной резистентностью, интегроны содержат несколько генов резистентности (часто 2—3, иногда до 8), благодаря чему они получили название интегров множественной лекарственной резистентности, MRI (multiple resistance integrons).

Интегроны класса 1 содержат 2 консервативных сегмента — 5'-CS и 3'-CS. В 5'-CS-области локализован ген *intI* интегразы, промотор *P<sub>CS</sub>*, обеспечивающий экспрессию встроенных кассетных генов, и *attI*-сайт интеграции, в который с помощью сайтспецифической рекомбинации включаются генные кассеты. Каждая кассета представляет собой замкнутую в кольцо мобильную нереплицирующуюся структуру, содержащую 1 ген и прилегающую к нему последовательность, выполняющую роль рекомбинационного сайта (59 base element, 59 be, или *attC*) [47, 59, 72]. При встраивании кассеты в *attI*-сайт интегрона последовательность 59 be располагается рядом с кассетным геном и отделяет его от следующей встроенной кассеты.

В 3'-CS-области интегрона, отделенной от 5'-CS-области рядом внедренных кассет, расположены гены антибиотикорезистентности и ORF, не имеющие кассетной организации. Обычно интегроны класса 1 содержат только одну копию 3'-CS [13]. Однако 2 интегрона этого класса, *In6* и *In7*, отличаются наличием частичной дупликации 3'-CS-области, которая отделена от исходной 3'-CS гомологичными последовательностями ДНК размером 2154 п. о. и некассетными генами резистентности к антибиотикам [83]. В интегоне *In6* эта последовательность сцеплена с геном, кодирующим устойчивость к хлорамфениколу (*catAII*), тогда как в интегоне *In7* она сцеплена с геном резистентности к триметоприму (*dfrA10*). Интегроны были найдены в составе двух разных плазмид, *pSa* и *pDG0100*, принадлежащих к разным группам совместимости [*IncW* и *IncC*], но сходство между



ними свидетельствовало об их общем происхождении. Поиск аналогичных последовательностей в банке генов привел к обнаружению в составе плазмиды RSF1010 укороченной структуры, проявляющей высокую степень гомологии с последовательностями, найденными в интегронах In6 и In7. Эта структура оказалась сцепленной с геном резистентности к сульфаниламидам. Позднее подобные структуры были найдены в составе разных интегронов и плазмид, в хромосомах бактерий разных видов и родов, и это послужило основанием для присвоения им названия "общие области", или CR [78, 82, 83]. Однако в 90-е годы прошлого века открытие CR-элементов не привлекло большого внимания ученых. Новые данные до 2000 г. накапливались медленно, но в последнее десятилетие появилось много работ о структурной организации этих элементов, их мобильной природе и способности активно участвовать в горизонтальном переносе генов, особенно в распространении генов, ответственных за множественную резистентность к антибиотикам [8, 9, 68, 73, 82, 83, 85, 87].

### CR-элементы — необычные инсерционные элементы, родственные IS91

Обнаруженная в составе интегронов In6 и In7 CR-последовательность содержит в своем составе открытую рамку считывания Orf513, кодирующую продукт из 513 аминокислотных остатков [60, 82, 83]. Сравнение с аминокислотными последовательностями известных белков показало, что продукт Orf513 имеет некоторую степень родства с транспозазами инсерционных последовательностей IS91, IS801 и IS1294, объединяемых в одно семейство. Идентичность аминокислотного состава была низкой, но в продукте CR-элементов явно присутствовали некоторые аминокислотные мотивы транспозиционных белков [41, 81], что указывало на то, что он мог выполнять функцию белка транспозазы.

Инсерционные последовательности семейства IS91 являются необычными IS-элементами, отличающимися от типичных IS-элементов рядом характеристик: 1. Концевые последовательности элементов IS91-семейства не содержат инвертированные повторы [43, 82], различаются между собой и выполняют разные функции [41, 81, 82]. Один конец выполняет функцию сайта начала репликации (oriIS), другой — сайта терминации репликации (terIS). 2. Элементы IS91-семейства специфически внедряются в 3'-конец последовательности мишени, представленной тетра-нуклеотидами 5'-CTTG или 5'-GTTC. 3. При внедрении в мишень они не образуют прямых дупликаций последовательностей мишени. 4. Механизм транспозиции IS91-подобных элементов отличается от механизмов транспозиции типичных IS и включает несколько этапов — репликацию по типу RC, образование нереплицирующейся автономной замкнутой кольцевой структуры и последующую гомологичную рекомбинацию для осуществления заключительного акта транспозиции [42, 81]. Белки транспозиции этих элементов не содержат DDE-мотивы стандартных транспозаз, их активность зависит от тирозина (Tyr249 и Tyr253), и они родственны Rep-белкам стафилококковых плазмид и белку репликации бактериофага φX174. Другим отличием этих белков являет-

ся их активность в транс-положении. Известно, что транспозазы типичных IS-элементов предпочтительно действуют в цис-положении [43].

Последовательность oriIS состоит из нуклеотидов 5'-GxTTTTxAAATTCSTAT-3' и расположена на расстоянии примерно 300 п. о. от терминальных концов генов транспозаз IS91 и IS1294 и 179 п. о. от транспозазного гена IS801. Для транспозиции IS91 абсолютно необходимыми являются последовательность oriIS и тетра-нуклеотид 5'-CTTG или 5'-GTTC, сцепленный с oriIS [55].

Последовательность terIS представлена 25 или 26 п. о. и содержит внутренний совершенный прерванный инвертированный повтор из 6 п. н. Делеция terIS или ее неправильное узнавание ведут к одноконцевой RC-транспозиции, в процессе которой могут транспозироваться фрагменты разной длины, фланкированные в одном конце ori, а в другом — любой из доступных последовательностей GTTC или CTTG хозяина. Другими словами, при такой транспозиции обеспечивается возможность мобилизации последовательностей, сцепленных с одной копией IS91 [42].

IS91-элемент был найден первоначально в составе альфа-гемолитических плазмид *Escherichia coli* рядом с геном hly [93], и последующие исследования показали, что IS-элементы, принадлежащие к этому семейству, участвуют преимущественно в распространении генов, связанных с патогенностью [42].

Проведенный сравнительный анализ CR-последовательности интегрона In6 с использованием базы данных о нуклеотидных последовательностях прокариот позволил идентифицировать не только родство CR с IS91, но и найти многие другие CR-последовательности с разными уровнями гомологии между собой, составившие разные подгруппы CR-элементов.

Структурная организация CR-элементов и элементов IS91-семейства имеет большое сходство. CR-элементы так же, как и IS91, не содержат концевые инвертированные повторы, а имеющиеся концевые последовательности различаются между собой нуклеотидным составом и функциями. В 3'-конце CR1 (такое название получили первые CR, открытые в In6 и In7) на расстоянии 240—250 п. о. от Orf513 находится концевая последовательность, отличающаяся лишь несколькими нуклеотидами от oriIS IS91. Это дало основание заключить, что она является ori RC-репликации CR-элемента [41, 55, 81, 82]. Вместо тетра-нуклеотида, сцепленного у IS91 с oriIS, CR содержит нуклеотидную пару GA на конце [82].

Последовательности terIS CR-элементов не определены достаточно точно из-за сложности определения места слияния с нуклеотидной последовательностью хозяйской ДНК. Однако в случае CR2-элемента заметные различия между 4 независимо выделенными вариантами позволили идентифицировать их вероятные 5'-концы, находящиеся на расстоянии примерно 120 п. о. от старта гена транспозазы CR-элемента. Сравнительный анализ 5'-концевых последовательностей CR2 и terIS IS91 показал, что предполагаемая последовательность ter CR2 имеет короткий прерванный инвертированный повтор из 4 п. о. по сравнению с 6 п. о. terIS91 [82].

Обнаруженное сходство CR-элементов и элементов IS91-семейства в структурной организации и функци-