

THE CONTRIBUTION OF *MET* REGION FROM PLASMID PA81 FROM BACTERIUM *ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS* A8 TO HEAVY METAL RESISTANCE

PRÍSPĚVEK GENŮ *MET* Z PLASMIDU PA81 BAKTERIE *ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS* A8 K RESISTENCI K IONTŮM TĚŽKÝCH KOVŮ

Jáchym Šuman, Pavel Kotrba

VŠCHT Praha, Technická 3, Praha 166 28, Česká republika; e-mail: sumanj@vscht.cz

Abstract:

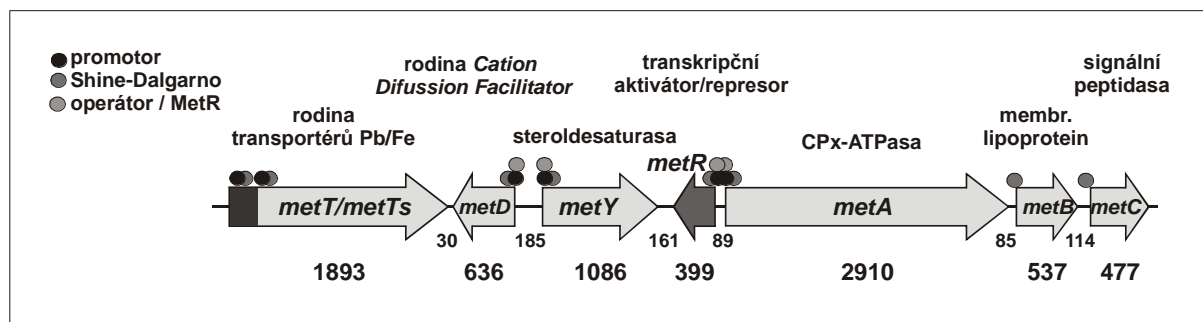
Gram-negative soil bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8 hosts a 92,5-kb plasmid pA81. The analysis of nucleotide sequence revealed that the plasmid harbors a *met* region consisting of seven genes *metTDYRAB*. The homology searches suggested identities of encoded gene products as (i) putative membrane protein from Pb^{2+}/Fe^{2+} family of transporters (*metT* gene), (ii) transporter of Cation-Diffusion Facilitator family (*metD*), (iii) steroldesaturase (*metY*), (iv) member of MerR family of metal-responsive transcriptional activators/repressors (*metR*), (v) efflux P1-ATPase (*metA*), (vi) putative membrane lipoprotein (*metB*) along with its cognate (vii) prolipoprotein signal peptidase (*metC*). In order to study the metalloresistance phenotype, which would be determined by the individual *met* genes, vectors based on pBla were constructed. These allowed constitutive expression of the individual *met* genes in *E. coli* GG48. The clones expressing the *metA* gene showed increased metalloresistance, as compared with a strain harboring pBla vector alone. Moreover, expression of *metA* reduced the accumulation of Cd^{2+} and Zn^{2+} . Taken together, these data attest that MetA is a functional transporter of CPx-ATPase subfamily. When expressed in *E. coli*, remaining *met* genes did not exert any phenotype that would suggest their functionality in metalloresistance.

Keywords:

Bacterial metalloresistance, protein transportes, heavy metals

Úvod

Bakteriální kmen *Achromobacter xylosoxidans* A8 byl izolován z půd v okolí Žamberka kontaminovaných polychlorovanými bifenoly na základě schopnosti degradovat chlorbenzoáty [1]. Jeho genom kromě chromosomální DNA obsahuje dva plasmidy pA81 (o velikosti 98 192 kb) a pA82. Pro plasmid pA81 byla určena nukleotidová sekvence (NC 006830) [2]. Lokus *met*, který je předmětem zájmu této práce, byl identifikován jako 9 kb úsek se sedmi otevřenými čtecími rámci (ORF) mezi nukleotidy 85 995 a 94 596 anotované sekvence pA81. Organizace kódujících sekvencí v lokusu *met* je patrná z obr. 1.



Obr. 1 Organizace kódujících sekvencí v lokusu *met* na plasmidu pA81 bakterie *A. xylosoxidans* A8

Naznačeny jsou pravděpodobné funkce hypotetických produktů kódujících sekvencí *met*, velikosti hypotetických genů a délky intergenových úseků v pb, lokalizace pravděpodobných promotorových sekvencí, Shine-Dalgarnových sekvencí a operátorových sekvencí rozpoznávaných pravděpodobným regulačním proteinem MetR.

Předpovězené kódující sekvence *met* vykazují sekvenční homologii s některými geny podílejícími se na resistenci k iontům těžkých kovů v mikroorganismech. V tab. I jsou shrnuty pravděpodobné funkce hypotetických produktů kódujících sekvencí *met* určené srovnáním s anotovanými sekvencemi proteinů pomocí algoritmů BLAST a FASTA.

Již dříve bylo zjištěno, že přítomnost plasmidu pA81 v bakterii *A. xylosoxidans* determinuje jistý stupeň resistance k iontům Cd^{2+} [3]. Cílem této práce bylo určit případnou úlohu genů *met* v bakteriální resistenci k iontům těžkých kovů prostřednictvím jejich konstitutivní exprese v *Escherichia coli* GG48. V tomto kmeni jsou inaktivovány geny kódující ATPasu *ZntA* a transportér *ZitB* z rodiny CDF, odpovědné za export Cd^{2+} , Zn^{2+} a Pb^{2+} (Anton a kol., 2004) [4]. Studie byla zaměřena na sledování příspěvku jednotlivých genů *met* k resistenci a celulární akumulaci iontů těžkých kovů v tomto bakteriálním kmeni.

Tab. I Nejblíže paralogy a pravděpodobné funkce hypotetických produktů genů *met*

| Gen <i>met</i> | Paralogní proteiny | Hypotetická funkce |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <i>metT</i> | PbrT z <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (transport Pb^{2+} do cytoplasmy, 72% podobnost) N-konec homologní k cytochrom-c-oxidázám C-konec homologní k permeázám z rodiny FTR1 (transport iontů Fe) | Transport iontů kovů z periplasmy do cytoplasmy |
| <i>metTs</i> | Totéž jako <i>metT</i> ; na N-konci identifikována pravděpodobná signální sekvence pro inkorporaci proteinu do cytoplasmatické membrány | Totéž jako <i>metT</i> |
| <i>metD</i> | Protein CDF z <i>C. metallidurans</i> CH34 (nespecifikovaná funkce, 87 % identity, 91 % podobnosti) | Transportní protein z rodiny CDF |
| <i>metY</i> | Steroidesaturasa z <i>Hahella chejuensis</i> (EC 1.14.21.6, 62% podobnosti) | Steroidesaturasa |
| <i>metR</i> | Transkripční regulátor z rodiny MerR PbrR z <i>C. metallidurans</i> CH34 (75% podobnost) Transkripční regulátor z rodiny MerR CadR z <i>Pseudomonas putida</i> (70 % podobnosti) | Transkripční aktivátor/represor z rodiny MerR |
| <i>metA</i> | P-ATPasa PbrA z <i>C. metallidurans</i> CH34 (70 % identity, 80 % podobnosti) | Exportní CPx-ATPasa |
| <i>metB</i> | PbrB z <i>C. metallidurans</i> CH34 (undekaprenylpyrrofosfatasa, 54 % podobnosti) | Integrální membránový protein, lipidfosfátfosfatasa |
| <i>metC</i> | Signální peptidasa lipoproteinů z <i>C. metallidurans</i> CH34 (62 % podobnosti) | Signální peptidasa lipoproteinu MetB |

Materiály a metody

Jako základ pro konstrukci plasmidů pBla umožňující konstitutivní expresi genů *met* v *E. coli* byl použit plasmid pBla [5]. Plasmidy pBla-*met* nesoucí jednotlivé kódující sekvence *met* pod kontrolou konstitutivního promotoru pro β -laktamasu z *E. coli* byly připraveny standardními molekulárně-biologickými metodami. Takto byly konstruovány plasmidy umožňující konstitutivní expresi genů *metT*, *metA*, *metBC*, *metT*, *metD*, *metY* a předpokládaného operonu *metABC*. Získanými plasmidy pBla-*met* byly transformovány buňky *E. coli* GG48 [4].

Testy resistance buněk *E. coli* GG48 nesoucích jednotlivé plasmidy pBla-*met* k iontům Cd^{2+} a Zn^{2+} byly prováděny v tekutém médiu MJS s 1% přídatkem kyselého hydrolyzátu kaseinu (CAA) [6]. Do řady zkumavek byla napipetována taková množství zásobního roztoku $CdCl_2$ nebo $ZnCl_2$, aby v jednotlivých zkumavkách bylo dosaženo požadované koncentrace iontu kovu v konečném objemu 3 ml. Posléze byly do zkumavek přidány 3 ml startovní bakteriální kultury o $OD_{590} \sim 0,08$. Po 20h kultivaci při teplotě 37 °C byla na přístroji Densilameter-II (EMO) určena optická turbidita bakteriálních kultur ve zkumavkách.

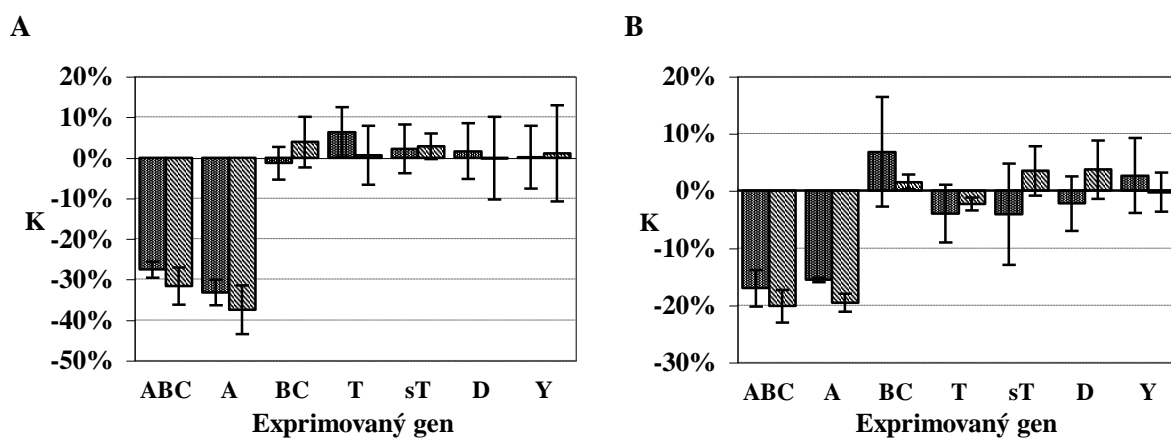
Schopnost buněk *E. coli* GG48 nesoucích jednotlivé plasmidy pBla-met akumulovat těžké kovy byla testována v tekutém médiu MJS s 1% CAA. Do 50ml zkumavek bylo napipetováno takové množství zásobního roztoku soli těžkého kovu, aby bylo dosaženo požadované koncentrace v konečném objemu 40 ml. Posléze bylo přidáno 40 ml bakteriální kultury o $OD_{590} \sim 1$. Po kultivaci byly kultury centrifugovány ($5\ 000 \times g/5\ min$) a pelety buněk byly resuspendovány v 5 ml 50 mM HEPES (pH 7,0). Následovala opět centrifugace ($5\ 000 \times g/5\ min$). Peleta buněk byla resuspendována v 0,5 ml 63% HNO_3 . Buňky byly lyzovány 16 h při laboratorní teplotě. K lyzátu bylo přidáno 4,5 ml deionizované H_2O . Obsah těžkých kovů ve vzniklém roztoku byl určen pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS, Varian Spectr300).

Výsledky

Vliv exprese jednotlivých kódujících sekvencí genů *met* na resistenci k iontům těžkých kovů byl sledován v kmeni *E. coli* GG48, který je hypersensitivní k iontům Cd^{2+} a Zn^{2+} . Příspěvek genů *met* k resistenci *E. coli* GG48 k iontům těžkých kovů byl testován s transformanty nesoucími vektory pBla-metA, pBla-metABC, pBla-metBC, pBla-metT, pBla-metTs, pBla-metD a pBla-metY. Jako kontrola byly použity buňky *E. coli* GG48 nesoucí plasmid pBla bez vloženého insertu. Pro zjištění resistance jednotlivých transformantů byl sledován jejich nárůst v tekutém minimálním médiu s Cd^{2+} v koncentračním rozsahu 0-100 μM a Zn^{2+} v koncentračním rozsahu 0-300 μM .

Resistenci *E. coli* GG48 k iontům těžkých kovů ovlivňovala pouze exprese *metA* a pravděpodobného operonu *metABC*. Koncentrace iontu těžkého kovu inhibujícího růst z 50 % (IC_{50}) byly stanoveny jako 45 μM pro Cd^{2+} a 150 μM pro Zn^{2+} . Ostatní transformaty exprimující *metBC*, *metT*, *metTs*, *metD*, *metY* vykazovaly, stejně jako kontrolní kmen *E. coli* GG48(pBla), hodnoty IC_{50} 1 μM pro Cd^{2+} a 40 μM pro Zn^{2+} (data neuvedena).

Akumulace těžkých kovů buňkami *E. coli* GG48 konstitutivně exprimujícími jednotlivé kódující sekvence *met* byla testována pro koncentrace 20 μM Cd^{2+} a 100 μM Zn^{2+} . Buňky byly v médiích s ionty exponovány 30 min a 1 h. Relativní změna v množství Cd^{2+} a Zn^{2+} akumulovaných transformanty nesoucími plasmidy pBla-met oproti kontrolnímu kmeni byla vyjádřena jako veličina $K = (\text{množství kovu akumulovaného transformantem} - \text{množství akumulované kontrolním kmenem}) / (\text{množství akumulované kontrolním kmenem})$. Výsledné hodnoty pro jednotlivé transformanty ukazují obr. 2A a obr. 2B. Jednofaktorová analýza rozptylů (ANOVA) na hladině významnosti 5 % ukázala, že statisticky významně se v míře akumulace Cd^{2+} a Zn^{2+} od kontrolního kmene odlišují pouze kmeny *E. coli* GG48 exprimující kódující sekvenci *metA* a pravděpodobný operon *metABC*. Na hladině spolehlivosti 5 % bylo oproti kontrole množství akumulovaného Cd^{2+} po 1 h sníženo o $(37 \pm 15) \%$ v *E. coli* GG48 (pBla-metA) a o $(32 \pm 12) \%$ v *E. coli* GG48 (pBla-metABC); v případě Zn^{2+} pak o $(20 \pm 4)\%$ a $(20 \pm 8)\%$, v uvedeném pořadí.



Obr. 2 Vliv konstitutivní exprese kódující sekvencí *met* na akumulaci Cd^{2+} (A) a Zn^{2+} (B) v buňkách *E. coli* GG48

Bakteriální kultury o $OD_{590} \sim 1$ byly inkubovány 0,5 h (tečkované sloupce) a 1 h (šrafované sloupce) v přítomnosti $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ nebo $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$. Veličina K na svlé ose vyjadřuje relativní rozdíl v akumulaci oproti kontrolnímu kmeni: $K = (\text{množství kovu akumulovaného transformantem} - \text{množství akumulované kontrolním kmenem}) / (\text{množství akumulované kontrolním kmenem})$. Hodnoty K byly určeny na základě výsledků tří nezávislých experimentů, chybové úsečky představují směrodatnou výběrovou odchylku.

Diskuse

Aby bylo možno posoudit funkčnost jednotlivých produktů genů *met*, byl studován vliv konstitutivní exprese kódujících sekvencí *met* na resistenci k těžkým kovům a jejich akumulaci pomocí komplementačních experimentů v *E. coli* GG48. Jak vyplývá z výsledků, resistenci k Cd^{2+} a Zn^{2+} v *E. coli* GG48 ovlivnila pouze exprese kódující sekvence *metA* a operonu *metABC*. Zároveň exprese genu *metA* a operonu *metABC* výrazně snižovala akumulaci Cd^{2+} a Zn^{2+} . Tyto poznatky potvrzují hypotézu o exportní aktivitě MetA, jenž snižuje celulórní akumulaci Cd^{2+} a Zn^{2+} tím, že tyto ionty exportuje z buňky. Spolu s faktem, že MetA vykazuje významnou homologii s ATPasami účastnícími se exportu iontů kovů, je možno *metA* označit za gen kódující CPx-ATPasu. Transportéry této skupiny exportují ionty těžkých kovů, včetně Cd^{2+} a Zn^{2+} , přes plasmatickou membránu do periplasmatického prostoru, čímž se podílí na resistenci k těmto iontům [7].

Expres samotného genového klastru *metBC* v *E. coli* GG48 neměla na resistenci ani akumulaci iontů Cd^{2+} a Zn^{2+} vliv. Nejbližším homologem MetB je protein PbrB z *C. metallidurans* CH34, který vykazuje undekaprenylpyrrofosfatasovou aktivitu a v kmeni CH34 přispívá k resistenci vůči iontům Pb^{2+} [8]. Předpokládaným mechanismem je uvolňování anorganického fosfátu defosforylací membránových lipidů a následná bioprecipitace Pb^{2+} ve formě (hydrogen)fosforečnanu. Ačkoli je možné, že stejnou funkci má i produkt genu *metB* v *A. xylosoxidans* A8, příspěvek *metBC* k resistenci vůči Pb^{2+} nebyl prokázán. Analýzy resistance a akumulační experimenty prováděné s Pb^{2+} za standardních podmínek v médiu MJS totiž neposkytovaly dostatečně přesvědčivé výsledky. V médiu MJS ionty Pb^{2+} vytvářely precipitát (patrně ve formě fosfátů dostupných v médiu), čímž se snížila biodostupnost iontů Pb^{2+} pro buňky a vzniklý zákal ani neumožňoval reprodukovatelně sledovat bakteriální nárůst pomocí turbidimetrie. Některé výsledky růstových experimentů v médiu MJS s Pb^{2+} však naznačují možnou účast MetA na resistenci k iontům Pb^{2+} (data neuvedena). Mnoho známých Zn-CPx-ATPas transportuje kromě iontů Cd^{2+} a Zn^{2+} také ionty Pb^{2+} , jako je tomu i v případě nejbližšího známého homologu MetA, P-ATPasu PbrA z *C. metallidurans* CH34 [8].

Hypotetický produkt kódujících sekvencí *metT* a *metTs* vykazuje homologii k proteinu PbrT z *C. metallidurans* CH34, který transportuje ionty těžkých kovů do cytoplasmy [9]. Sekvence *metTs* je variantou *metT*, který je na svém 5'-konci prodloužen o úsek kódující hydrofobní oligopeptid MKRLLLILWVGLCF, který může hrát roli v cílení MetT do cytoplasmatické membrány. Kladně nabitě zbytky na N-konci oligopeptidu následované hydrofobními zbytky splňují požadavky pro signální sekvenci funkční v *E. coli* [10, 11]. V souvislosti se sekvenční podobností s PbrT bylo možno předpokládat, že exprese kódující sekvence *metTs* (popř. *metT*) způsobí v *E. coli* snížení resistance a zvýšení akumulace iontů těžkých kovů. Jak ovšem vyplývá z provedených experimentů, exprese *metTs* a *metT* v *E. coli* GG48 významně neovlivnila resistenci k Cd^{2+} a Zn^{2+} ani celulórní akumulaci těchto toxických iontů.

Vliv na fenotyp neměla ani exprese kódující sekvence *metD*. Přes podobnost MetD s celou řadou hypotetických bakteriálních transportérů anotovaných jako zástupci rodiny CDF nebyl v dostupných databázích nalezen žádný ortolog MetD s anotovanou funkcí. Otázka, zda tato skupina vysoce homologních proteinů představuje skutečně funkční transportéry kovů, tak zůstává stále otevřená.

Použitá literatura

- [1] PAVLŮ L., VOSÁHLOVÁ J., KLIEROVÁ H., PROUZA M., DEMNEROVÁ K., BRENNER V. (1999): Characterization of chlorobenzoate degraders isolated from polychlorinated biphenyl-contaminated soil and sediment in the Czech Republic, *J Appl Microbiol*, 87: 381-386
- [2] JENCOVA V., STRNAD H., CHODORA Z., ULBRICH P., VLCEK C., HICKEY W. J., PACES V. (2008): Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo)aromatic acid catabolic plasmid pA81 from *Achromobacter xylosoxidans*, *Res Microbiol*, 159:118-127
- [3] ŠUMAN J. (2010): Funkční studie genů *met* z plasmidu pA81 kmene *Achromobacter xylosoxidans* A8, VŠCHT Praha
- [4] ANTON A., WELTROWSKI A., HANEY C. J., FRANKE S., GRASS G., RENSING C., NIES D. H. (2004): Characteristics of zinc transport by two bacterial cation diffusion facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 186:7499-7507
- [5] CHODORA Z. (2006): Metabolismus chlorbenzoátů bakterie *Achromobacter xylosoxidans* A8, VŠCHT Praha
- [6] KOTRBA P., DOLECKOVÁ L., DE LORENZO V., RUML T. (1999): Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Appl Environ Microbiol.*, 65:1092-1098
- [7] NIES D. H. (2003): Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes, *FEMS Microbiol Rev*, 27:313-339
- [8] HYNINEN A., TOUZÉ T., PITKÄNEN L., MENGIN-LECREULX D., VIRTA M (2009): An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria, *Mol Microbiol*, 74:384-394
- [9] BORREMANS B., HOBMAN J. L., PROVOOST A., BROWN N. L., VAN DER LELIE D. (2001): Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34, *J Bacteriol*, 183:5651-5658
- [10] VON HEIJNE G. (1985): Signal sequences. The limits of variation, *J Mol Biol*, 184:99-105
- [11] VALENT Q. A., KENDALL D. A., HIGH S., KUSTERS R., OUDEGA B., LUIRINK J. (1995): Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides, *EMBO J*, 14:5494-5505