

GENY ZODPOVĚDNÉ ZA SYNTÉZU ENZYMŮ METABOLISMU PCB

SONJA TOTEVOVÁ^a, MAREK PROUZA^a,
VLADIMÍR BRENNER^b a KATEŘINA
DEMNEROVÁ^a

^aÚstav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6, ^bMikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Došlo dne 12. VI. 1997

Obsah

1. Úvod
2. Geny kódující enzymy metabolismu PCB
 - 2.1. Bifenylový operon
 - 2.2. Geny chlorbenzoátového metabolismu
3. Rekombinantní bakteriální kmeny schopné degradace PCB
4. Závěr

1. Úvod

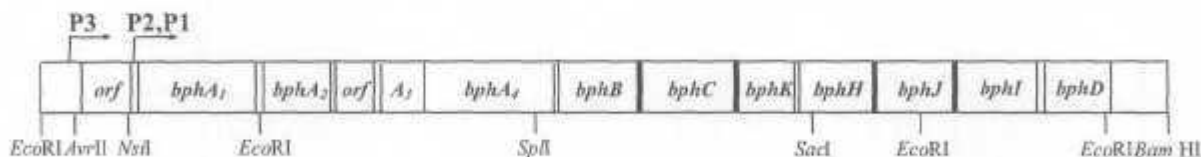
Syntéza enzymů pro biodegradaci PCB je podmíněna přítomností a aktivací genů, které mohou být umístěny jak na chromosomu, tak na plasmidu. Úplná degradace PCB je zajištěna enzymy tří metabolických drah - bifenylové (chlorbifenylové), chlorbenzoátové a pentadienové kyseliny. Řada genů, které souvisejí s těmito metabolickými drahami, byla již izolována a popsána převážně u gramnegativních bakterií. Výsledky získané při sledování homologie genů pro degradaci PCB u různých kmenů bakterií potvrzuje existenci nejméně tří různých skupin genů.

Vzhledem k tomu, že geny kódující enzymy jednotlivých metabolických drah degradace PCB nejsou přítomny v jednom mikroorganismu, může být kompletní degradace realizována buď směsnou kulturou kmenů, které se vzájemně doplňují přítomností genů pro kompletní degradaci PCB, nebo konstrukcí kmenů s komplexním genovým systémem pomocí metod genového inženýrství.

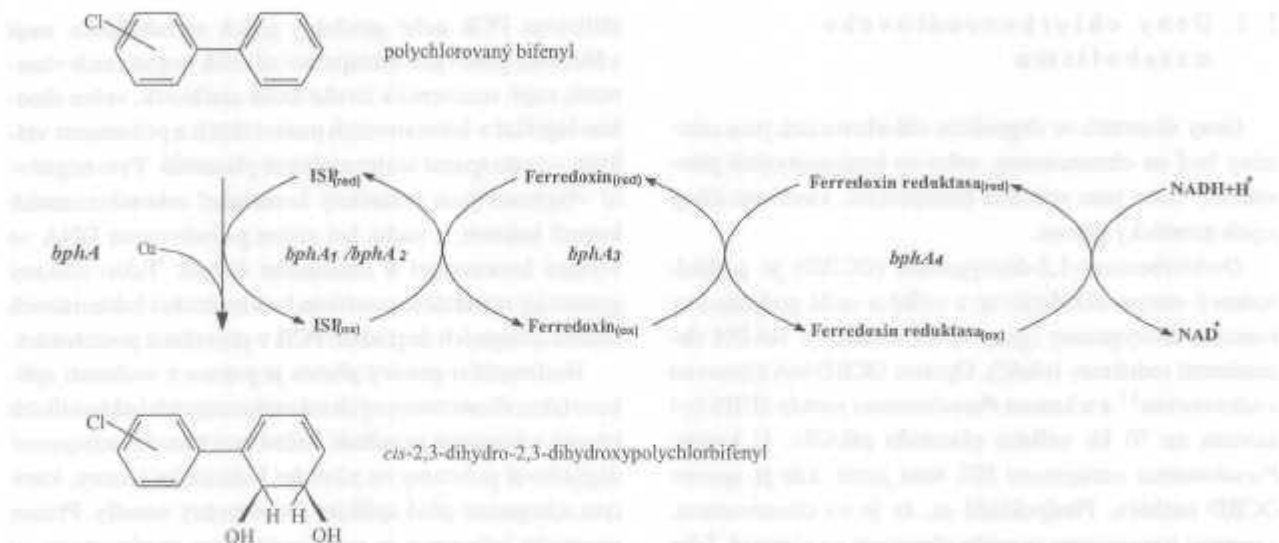
2. Geny kódující enzymy metabolismu PCB

2.1. Bifenylový operon

Bifenylový operon (*bphABCD*) je fragment DNA o velikosti 11,3 kb, který kóduje sadu čtyř enzymů podílejících se na degradaci chlorovaných bifenylyů na chlorbenzoáty a 5-C chloralifatické kyseliny¹. Poprvé byly geny tohoto operonu klonovány z kmene *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (cit.²). Z kmene *Pseudomonas* sp. LB400 byl izolován bifenylový operon o velikosti 12,5 kb, byl geneticky charakterizován restrikční analýzou, subklonován, ověřen biosyntézou proteinů a monitorováním enzymové aktivity, byly určeny jeho sekvence³⁻⁴. Jedná se v tomto případě o fragment DNA obsahující 11 genů *bphA₁A₂A₃A₄BCKHJID* (obr. 1). Iniciačním enzymem celé dráhy je bifenyl-2,3-dioxygenasa (*bphA*). Je to podjednotkový enzym složený ze čtyř proteinů - proteiny velké a malé podjednotky koncové dioxygenasy (geny *bphA₁* a *bphA₂*), ferredoxinu (*bphA₃*) a ferredoxinreduktasy (*bphA₄*). Tyto geny jsou též označovány *bphAEFG* a společně tvoří *bphA* (cit.⁵). Jedná se o řetězec přenosu elektronů od NADH na koncovou dioxygenasu ISP (iron-sulfurprotein) (obr. 2)⁶. Koncová dioxygenasa vnáší molekulu kyslíku do bifenylové kostry. Byla zjištěna značná homologie amino-



Obr. 1. Bifenylový operon bakteriálního kmene *Pseudomonas* sp. LB400



Obr. 2. Přenos elektronů mezi podjednotkami enzymu bifenylyl-2,3-dioxygenasy

kyselinových sekvencí mezi kmeny *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 a *Pseudomonas* sp. LB400 (cit.⁷), a zároveň mezi *Pseudomonas* sp. LB400 a toluendioxygenasou z kmene *Pseudomonas putida* F1 (cit.⁸). Gen *bphB* kóduje enzym bifenyldihydrogendioldehydrogenasu, který však zatím nebyl izolován. 2,3-Dihydroxybifenyldioxygenasa (*bphC*) byla izolována, byla určena její kvarterní struktura⁹ a vlastnosti. Je to enzym skládající se z osmi identických podjednotek o molekulové hmotnosti 250 000 a vyžadující Fe^{2+} ionty¹⁰. Enzym kódovaný genem *bphD* je serinová hydrolasa. Jde o podjednotkový homotetramer. Geny *bphHIIJ* kódují tři enzymy, pomocí nichž je degradována kyselina 2-hydroxy-2,4-pentadienová až na pyruvát a acetylkoenzym A. Produkt genu *bphK* má glutathion *S*-transferasovou aktivitu, jeho role není pro metabolismus bifenylylů zatím zcela známa³. Tento bifenylový operon obsahuje celkem dva otevřené čtecí rámce *orf* (obr. 1) neznámé funkce. Přítomnost ORF lokalizovaného mezi geny *bphA*₂ a *bphA*₃ není nutná pro katabolismus bifenylylu na 2-hydroxy-6-oxo-6-fenylhexa-2,4-dienoát¹¹. Počátek transkripce, který je pozitivně regulován přítomností bifenylylu, je vzdálen 0,9 kb od genu *bphA*₁ proti směru transkripce⁸.

Bifenylový operon byl u všech identifikovaných bakterií lokalizován na chromozomu, nejčastěji se vyskytuje u gramnegativních pseudomonád. Značná podobnost chromozomálně kódovaných genů mezi vývojově odlišnými kmeny vyvolává hypotézu o existenci mechanismu přenosu operonu *bph* mezi bakteriemi¹². Kmeny izolované přímo z přírodního prostředí vyžadují bifenylyl k indukci *bph* genů

v růstovém médiu. Naopak mnoho rekombinantních kmenů konstitutivně exprimuje *bph* geny a bifenylyl nevyžaduje. Nicméně například rekombinantní kmen *Pseudomonas testosteroni* B-356 má větší aktivitu enzymů bifenylového operonu v přítomnosti 4-chlorbifenylylu než při jeho absenci¹³.

U dvou zatím nejlépe degradujících bakteriálních kmenů *Alcaligenes eutrophus* H850 a *Pseudomonas* sp. LB400 byla zjištěna podobnost restričních míst chromozomální DNA v oblasti kódující metabolismus PCB, a pomocí hybridizace DNA silná sekvenční homologie těchto genů, a to i přes rodovou odlišnost obou bakteriálních kmenů. Žádná jiná sekvenční homologie genomů nebyla prokázána¹⁴. Těchto poznatků bylo využito při genetické charakterizaci dvou gramnegativních bakteriálních kmenů izolovaných z půdy, která pocházela z lokalit kontaminovaných PCB v České republice. Tyto kmeny degradovaly Delor 103 (směs kongenerů obsahující průměrně 3 chloridové substituenty na molekulu) během dvou týdnů na 20–30 % původního množství. Pro porovnání metabolismů degradace PCB byla použita metoda hybridizace DNA¹⁵, DNA-sondy obsahovaly geny *bphA*₁*A*₂*A*₃*BEGFa* *bphA*₃*A*₄*BCKHJI*. Bakteriální kmeny H850 a LB400 nevykázaly k těmto sondám stejnou homologii, podobně se chovaly i totální DNA obou izolovaných bakteriálních kmenů, jeden reagoval pozitivně jako H850, druhý negativně jako LB400 (cit.¹⁶). V souvislosti s tím, že H850 a LB400 vykazují určitou podobnost svých *bph* genů a oba izoláty podávaly rozdílnou odpověď, byla prokázána existence minimálně tří geneticky různých skupin bakterií degradujících PCB.

2.2. Geny chlorbenzoátového metabolismu

Geny účastnící se degradace chlorbenzoátů jsou umístěny buď na chromozomu, nebo na konjugativních plasmidech, často jsou součástí transposonů, které umožňují jejich genetický přenos.

O-chlorbenzoát-1,2-dioxygenasa (OCBD) je podjednotkový enzym skládající se z velké a malé podjednotky koncové dioxygenasy (geny *cbdA* a *cbdB*) a NADH dependentní reduktasy (*cbdC*). Operon OCBD byl klonován a sekvencován¹⁷ a u kmene *Pseudomonas putida* 2CBS byl nalezen na 70 kb velkém plasmidu pBAH1. U kmene *Pseudomonas aeruginosa* JB2 není jasné, kde je operon OCBD umístěn. Předpokládá se, že je na chromozomu, a pomocí transposonu se může přesunout na plasmid. Této hypotéze by pak odpovídal velký počet mutací *ortho*-chlorbenzoátové aktivity¹⁸. Kmen *Pseudomonas putida* P111 má OCBD operon lokalizován na 75 kb velkém plasmidu pPB111 (cit.¹⁹). Udržení tohoto plasmidu je závislé na přítomnosti *ortho*-chlorbenzoátů v růstovém médiu.

Benzoát-1,2-dioxygenasa, enzym realizující modifikovanou *ortho* dráhu, vykazuje přibližně 50 %-ní homologii k *ortho*-chlorbenzoát-1,2-dioxygenase. Nachází se také na chromozomu nebo na plasmidech. Kmen *Pseudomonas aeruginosa* JB2 má geny modifikované *ortho* dráhy umístěny na chromozomu. Geny *clcABC* kódující enzymy chlor-1,2-benzendiol-1,2-dioxygenasu a chlormukonátcykloisomerasu převádějí chlorovaný benzendiol na izomer laktonu, který je hydrolyzován dienlaktonhydrolasou na maleylacetát. Maleylacetát je poté redukován za současné oxidace NADH na 3-oxoadipát. *Pseudomonas putida* P111 má *clc* operon na chromozomu. U varianty kmene P111, P111D, která vznikla opakovanou kultivací P111 na 3,5-dichlorbenzoátu, se vytvořil nový 120 kb velký plasmid, na který přešel *clc* operon z chromozomu¹⁹.

Pozoruhodná homologie enzymů katalyzujících podobné reakce nahrává teorii, že se jedná o evolučně značně staré enzymové systémy. Pravděpodobně se u určitého mikroorganismu vyvinul enzymový aparát, který se pak rozšířil do dalších organismů.

3. Rekombinantní bakteriální kmeny schopné degradace PCB

Divoké bakteriální kmeny izolované z půd kontaminovaných PCB, u nichž byla prokázána značná schopnost

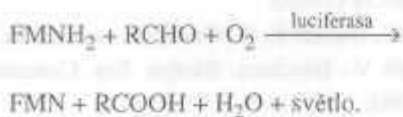
utilizovat PCB nebo produkty jejich metabolismu, mají z hlediska genových manipulací několik negativních vlastností, např. rezistenci k široké škále antibiotik, velmi dlouhou lag-fázi v laboratorních podmínkách a přítomnost velkých - často špatně izolovatelných plasmidů. Tyto negativní vlastnosti jsou potlačeny konstrukcí rekombinantních kmenů bakterií, z nichž lze získat požadovanou DNA ve vhodné koncentraci a maximální čistotě. Takto získaný genetický materiál je používán ke konstrukci bakteriálních kmenů schopných degradace PCB v přírodních podmínkách.

Horizontální genový přenos je jednou z možností aplikace takto zkonstruovaných rekombinantních bakteriálních kmenů v životním prostředí. Jedná se o transfer schopnosti degradovat polutanty na původní bakteriální kmeny, které tyto schopnosti před aplikací s konstrukty neměly. Přenos genetické informace je realizován třemi mechanismy: a) transformací, b) transdukcí, c) konjugací. Konjugace je uplatňována nejvíce, její úspěšnost závisí na mnoha faktorech, především na charakteru donorového a recipientního kmene, na vlastnostech samotného plasmidu a na podmínkách kultivace. Důkazem horizontálního přenosu velkých katabolických plasmidů v půdě je úspěšná konjugace 80 kb plasmidu pJP4 kmene *Alcaligenes eutrophus* JMP134, který degraduje 2,4-dichlorfenoxyoctovou kyselinu do recipientních organismů v nesterilní půdě v mikrokosmu, které tuto degradační schopnost nemají. Přenos byl ověřen v tomto případě rezistencí ke rtuti nesené plasmidem pJP4, kterou původní kultura získala a která u ní před přenosem nebyla zjištěna. Díky horizontálnímu přenosu plasmidu pJP4 stoupla v mikrokosmu rychlost degradace 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny²⁰.

Hybridizace DNA nebo kultivace na selektivních médiích jsou metody běžné pro detekci přenosu DNA. Tyto metody jsou však limitovány průměrným určením frekvence transferu v mikrobiálním společenství a nemohou poskytnout *in situ* informaci o stavu konjugativních plasmidů rozptýlených do prostředí. Také proto je pro detekci bakteriálních kmenů vyšetých do mikrokosmu zvlášť výhodné použít bioluminiscenčních markerů obsahujících geny pro emisi světla. Spojení obou vlastností - degradačních a detekčních je možné dvěma způsoby, a to buď vnesením bioluminiscenčních markerů do bakteriálních kmenů s degradačními schopnostmi, nebo vnesením katabolických konjugativních plasmidů s geny pro biodegradaci do bakteriálních kmenů.

Do chromozomu bakteriálního kmene *Pseudomonas fluorescens* byl klonován *lux* operon s geny *luxABCDE* kódujícími bakteriální luciferasu (geny *luxAB*) a reduksový komplex mastných kyselin (geny *luxCDE*), nutný pro

syntézu substrátu bioluminiscenční reakce²¹. Tento rekombinantní kmen byl využit pro oba typy spojení degradačních a detekčních vlastností. Chemická reakce, při níž je emitováno světlo, je intracelulární oxidací redukované formy flavinmononukleotidu (FMNH₂) a dlouhého nasyceného alifatického aldehydu (např. dodekanalu), katalyzovanou luciferasou a molekulárním kyslíkem:



Bakteriální luciferasa je heterodimerní enzym (izolovaný z organismů: *Vibrio fischeri*^{22,23}, *Photobacterium leiognati*^{23,24}, *Vibrio harveyi*²⁵ a *Xenorhabdus luminescens*²⁶), jehož podjednotky α (≈ 40 kDa) a β (≈ 37 kDa) jsou kódovány geny *luxA* a *luxB* resp. Geny *luxAB* byly vneseny do bakteriálního kmene *Alcaligenes eutrophus* H850 (recipientní kmen je označen H850Lr), který byl aplikován při studiu přenosu *bph* genů mezi půdními bakteriemi vyšetými do mikrokosmu. Byl pozorován vliv typu půdy na horizontální přenos *bph* genů a na přežití H850Lr (cit.²⁷). Opačným příkladem využití *lux* genů jako markeru je vnesení katabolického konjugativního plasmidu pPB 111 z kmene *Pseudomonas putida* P111 nesoucího geny pro chlorbenzoát-1,2-dioxygenasu do recipientního kmene *Pseudomonas fluorescens*, do kterého byl předtím transformací přenesen *Tn7-luxCDABE* marker. Bioluminiscenční aktivita rekombinantního kmene *Pseudomonas fluorescens* 2-79 RLD, míra jeho vitální schopnosti a fyziologického stavu v půdě, byla monitorována měřením produkce světla vzorků půdy mikrokosmu²⁸. Dalším typem markeru vhodného pro značení gramnegativních bakteriálních kmenů je „green fluorescent protein“ (GFP), izolovaný z organismu *Aequorea victoria*, se silnou viditelnou absorpcí a fluorescencí z *p*-hydroxybenzylidenimidazolidinonového chromoforu, který je generován cyklizací a oxidací Ser-Tyr-Gly sekvence v pozici 65-67. GFP, protein, složený z 238 aminokyselin absorbuje modré světlo (maximum při 395 nm s minoritním pikem 470 nm) a emituje zelené světlo (maximum při 509 nm)²⁹. Tento protein má mimořádný význam při monitorování genové exprese a lokalizaci proteinů v žijících buňkách, protože detekce intracelulárního GFP vyžaduje expozici pouze v blízkosti UV nebo modrého světla, není tedy limitována použitím žádného bioluminiscenčního substrátu. Protože nebyla objevena interference s buněčným růstem a funkcí, může být GFP použit jako indikátor transformace, a také být jedním

z markerů, který umožňuje selekci buněk na základě fluorescenční aktivity. GFP je vitálním markerem, takže vypovídá i o pohybu a buněčném růstu *in situ*.

Výhodný a jednoduchý prostředek pro klonování a stabilní inzerci cizích genů do chromosomální DNA gramnegativních bakterií je použití mnohostranného vektoru pUT - tzv. transposonové kazety, která je odvozena od plasmidu R6K schopného replikovat se pouze v recipientech obsahujících *pir* geny pro syntézu proteinu *n*. Vektor pUT se tudíž téměř ve všech hostitelích (kromě kmenů zkonstruovaných speciálně pro příjem a replikaci těchto vektorů) chová jako sebevražedný vektor obsahující modifikovaný mini-Tn5 transposon s unikátními *NotI* nebo *SfiI* místy pro pohodlné klonování a transponovatelnými geny umístěnými vně inverzních sekvencí transposonu³⁰. Pomocí této kazety lze klonovat do gramnegativních bakterií různé vlastnosti, selektivní markery např. pro produkci melaninového barviva, geny *lux* operonu nebo geny pro green fluorescent protein. Pomocí sebevražedného vektoru pUTTc v kmeni *E. coli* MT102::*pir*, do kterého byl klonován inzert z plasmidu pJBA27 s *gfp* geny, se podařilo přenést tento marker do chromozomu bakteriálního kmene *Pseudomonas putida* P111 (cit.³¹). Tento rekombinantní kmen by mohl pomoci při studiu všech aspektů horizontálního přenosu, protože by mohl být pro svou dobrou biodegradační schopnost použit přímo při bioremediaci kontaminovaných lokalit.

Pomocí transposonové kazety byl do kmene *Pseudomonas putida* P111 s genovým vybavením pro degradaci širokého spektra chlorbenzoových kyselin lokalizovaným na plasmidu pPB 111 vnesen bifenylový operon z kmene *Pseudomonas* sp. LB400 (obr. 1) a jeho jednotlivé části³². Bylo zjištěno, že v případě integrace celého operonu do genomu recipientní P111 je možné udržet stabilitu a funkčnost celé dráhy pro degradaci 2,2'-dichlorbifenyly a 2,4'-dichlorbifenyly v laboratorních podmínkách.

4. Závěr

Byl sestaven rekombinantní bakteriální kmen, který obsahuje geny pro teoreticky všechny enzymy degradační dráhy PCB. Jeho schopnost degradace PCB (tzn. směsi několika kongenerů) bude muset být ještě prověřena vzhledem k tomu, že intermediáty jedné degradační dráhy mohou interferovat s produkty druhé, a mít tak zásadní vliv na inhibici degradace³³⁻³⁴.

Další studie, které by mohly odpovědět na otázku, jak vyřešit dekontaminaci životního prostředí, povedou ke kon-

strukci nových rekombinantních kmenů, k pozorování jejich přežívání např. pomocí GFP a studiu vlivů původní půdní kultury na stabilitu geneticky modifikovaných organismů.

LITERATURA

1. Abramowicz D. A.: CRC Crit. Rev. Biotechnol. 10, 241 (1990).
2. Furukawa K., Miyazaki T.: J. Bacteriol. 166, 392 (1986).
3. Hofer B., Backhaus S., Timmis K. N.: Gene 144, 9 (1994).
4. Hofer B., Eltis D., Dowling D. N., Timmis K. N.: Gene 130, 47 (1993).
5. Bergeron J., Ahmad D., Barriault D., Larose A., Sylvestre M.: Can. J. Microbiol. 40, 743 (1994).
6. Taira K., Hirose J., Hayashida S., Furukawa K.: J. Biol. Chem. 267, 4844 (1992).
7. Ahmed M., Focht D. D.: Can. J. Microbiol. 19, 41 (1973).
8. Erickson B. D., Mondello F. J.: J. Bacteriol. 174, 2903 (1992).
9. Sugiyama K., a spol.: Proteins 22, 284 (1995).
10. Furukawa K., Arimura N.: J. Bacteriol. 169, 924 (1987).
11. Furukawa K., Hayashida S., Taira K., v knize: *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology* (Galii E., Silver S., Witholt B., ed.) str. 259. Am. Soc. for Microbiol., Washington, D.C. 1992.
12. Furukawa K., Hayase N., Taira K., Tomizuka N.: J. Bacteriol. 171, 5467 (1989).
13. Brenner V., Arensdorf J. I., Focht D. D.: Biodegradation 5, 359 (1994).
14. Yates J. R., Mondello F. J.: J. Bacteriol. 171, 1733 (1989).
15. Southern E. M.: J. Mol. Biol. 98, 503 (1975).
16. Totevová S., Prouza M., Brenner V., Pazlarová J., Burkhard J., Macková M., Demnerová K.: *Genetic Characterisation of PCBs Degrading Indigenous Soil Bacteria, Posters* (Book of Abstracts s. 267) ISEB, Oostende Belgium, 21-23. 4. 1997.
17. Haak B., Fetzner S., Lingens F.: J. Bacteriol. 177, 667 (1995).
18. Hickey W. J., Brenner V., Focht D. D.: FEMS Microbiol. Lett. 98, 175 (1992).
19. Brenner V., Hernandez B. S., Focht D. D.: Appl. Environ. Microbiol. 59, 2790 (1993).
20. DiGiovanni G. D., Neilson J. W., Pepper I. L., Sinclair N. A.: Appl. Environ. Microbiol. 62, 2521 (1996).
21. Hill P. J., Rees C. E. D., Winson M. K., Stewart G. S. A. B.: Biotechnol. Appl. Biochem. 17, 3 (1993).
22. Foran D. R., Brown W. M.: Nucleic Acids Res. 16, 777 (1988).
23. Baldwin T. O., Devine J. H., Heckel R. C., Lin R. C., Shadel J. W.: J. Biolumin. Chemilumin. 4, 326 (1989).
24. Illarionov B. A., Blinov V., Donchenko A. P., Protopopova M. V., Karginov V. A., Mertvetson N. P., Getilson J. I.: Gene 86, 89 (1990).
25. Cohn D. H., Mileham A. J., Simon M. L., Nelson K. H., Raush S. K., Bonam D., Baldwin T. O.: J. Biol. Chem. 260, 6139 (1985).
26. Johnston T. C., Rucker E. B., Cochrum L., Hruska K. S., Vandegrift V.: Biochem. Biofiz. Res. Commun. 770, 407 (1990).
27. Van Dyke M. I., Hung Lee, Trevors J. T.: J. Chem. Tech. Biotechnol. 65, 115 (1996).
28. Crowley D. E., Brennerová M. V., Irwing C., Brenner V., Focht D. D.: FEMS Microbiol. Ecology 20, 271 (1996).
29. Chalfie M.: Photoch. Photobiol. 62, 651 (1995).
30. Herrero M., de Lorenzo V., Timmis K. N.: J. Bacteriol. 172, 6557 (1990).
31. Totevová S.: Nepublikované výsledky.
32. Hofer B., Blasco R., Megharaj M., Seeger M., McKay D., Wittich R. M., Pieper D. H., Timmis K. N., v knize: *Molecular Biology of Pseudomonads* (Nakazawa T., ed.), str. 121. ASM Press, Washington, D.C. 1996.
33. Guilbeault B., Sondossi M., Ahmad D., Sylvestre M.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 33, 73 (1994).
34. Lloyd-Jones G. C., de Jong C., Ogden R. C., Duetz W. A., Williams P. A.: Appl. Environ. Microbiol. 60, 691 (1994).

S. Totevová^a, M. Prouza^a, V. Brenner^b, and K. Demnerová^a (^aDepartment of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague); **Genes Responsible for the Synthesis of Enzymes Metabolizing PCB**

The review is focused on genes involved in bacterial degraders of PCBs. According to the published results, they belong to three different groups. The genes could be located on chromosome or plasmid. Microorganisms which carry all genes necessary for the complete degradation of PCBs have not been yet described. This could be achieved using either co-culture of individual strains or a strain carrying all responsible genes. The possibility of constructing such a strain by means of genetic engineering methods is discussed.