

УДК 579.258

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *PHN* ТРАНСПОРТЕРОВ *ACHROMOBACTER INSOLITUS* LCU2

© 2024 г. Е. В. Крючкова^{а, *}, Г. Л. Бурыгин^{а, b, c}

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,
Саратов, 410049, Россия

^бСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,
Саратов, 410012, Россия

^сСаратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова,
Саратов, 410012, Россия

*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

Фосфонаты являются альтернативным источником фосфора для бактерий. Геном *Achromobacter insolitus* LCU2 содержит три предсказанных кластера *phn* транспортеров ABC-типа-переносчиков фосфонатов в клетку. Чтобы понять функциональную, эволюционную и экологическую роль *phn* кластеров, мы провели филогенетический анализ субстрат-связывающих PhnD белков штамма LCU2 с гомологами других видов рода *Achromobacter* и близкородственных родов семейства *Alcaligenaceae*. PhnD транспортеры образовывали три отдельных кластера, что свидетельствует о различии в их структурном строении. PhnD₁ и PhnD₂ у *Achromobacter* присутствовали в геномах всех видов, группировались в основном отдельно от других представителей *Alcaligenaceae*, что говорит о вертикальном наследовании генов *phnD*₁ и *phnD*₂ и их участии в процессах жизнеобеспечения. PhnD₃ найден в геномах у семи видов рода *Achromobacter*. Возможно, ген *phnD*₃ приобретен в процессе горизонтального переноса или дупликации и индуцируется при адаптации к изменяющимся условиям обитания. Поддержание трех структурно разных кластеров *phn* транспортеров, по-видимому, обеспечивает *A. insolitus* LCU2 экологическое преимущество, путем извлечения фосфора не только из фосфонатов, но и других фосфорорганических соединений.

Ключевые слова: фосфонаты, *phn* транспортеры, *Achromobacter insolitus*, филогения, *Alcaligenaceae*

DOI: 10.31857/S0026365624040062

Фосфонаты — органические соединения, содержащие высокостабильную (С—Р) связь, используются бактериями как альтернативный источник фосфора. Дефицит фосфатов в окружающей среде индуцирует у бактерий работу *Pho* регулона и экспрессию генов *phn* оперона, отвечающего за поглощение и расщепление фосфонатов. Гены *phn* оперона кодируют АТФ-зависимый импортер (PhnCE) и периплазматический субстрат-связывающий белок (PhnD) для поглощения фосфонатов, регулятор транскрипции (PhnF), а также белковый комплекс (PhnGHIJKLMNOR), непосредственно участвующий в расщеплении С—Р связи (Amstrup et al., 2023). Однако наличие *phn* оперона не всегда позволяет бактериям утилизировать различные по своей структуре фосфонаты. Так, например, культура *E. coli*, у которой впервые был открыт и описан *phn* оперон, росла на алкил

фосфонатах, но не была способна к росту на глифосате, даже в присутствии ароматических аминокислот (Kertesz et al., 1991). Одной из причин, почему некоторые бактерии, имеющие С—Р лиазу, не утилизируют те или иные фосфонаты, может быть различная субстратная специфичность и степень аффинности транспортных *phn* белков к фосфоновым кислотам и их производным (Hove-Jensen et al., 2014).

Целью данного исследования было проведение сравнительного филогенетического анализа между различными субстрат-связывающими PhnD транспортерами штамма *Achromobacter insolitus* LCU2 и гомологами других видов рода *Achromobacter*, а также некоторых близкородственных представителей семейства *Alcaligenaceae*.

Ризосферный штамм *A. insolitus* LCU2 (IBPPM 631; RCAM 04723) выделен с корней

люцерны посевной, как деструктор глифосата по С–Р лиазному пути. Геном *A. insolitus* LCu2 секвенирован на базе Казанского федерального университета, аннотирован и депонирован в базе данных GenBank под номером CP038034.

Для анализа использовали аминокислотные последовательности, предсказанные как PhnD, экстрагированные из общедоступных в GenBank бактериальных геномов рода *Achromobacter* и семейства *Alcaligenaceae*, включая исследуемый штамм LCu2. Множественное выравнивание последовательностей для филогении осуществляли в Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Филогенетическую реконструкцию проводили в программе MEGA X (Kumar et al., 2018), используя Neighbor-joining анализ и бутстрэп-тест (1000 повторов).

Геном *A. insolitus* LCu2 содержал три кластера предсказанных *phn* транспортеров: первый (*phnC*₁*D*₁*E*₁), расположенный на прямой цепи около *phn* оперона, кодирующего С–Р лиазный ферментный комплекс; второй (*phnD*₂*C*₂*E*₂*E*₂) и третий (*phnD*₃*C*₃*E*₃), размещенные, соответственно, выше и ниже *phn* оперона на обратной цепи ДНК. Таким образом, для работы были отобраны три субстрат-связывающие белка PhnD₁ (QE91627), PhnD₂ (QE91158) и PhnD₃ (QE94759). Попарное выравнивание аминокислотных последовательностей этих белков между собой показало низкую степень идентичности в пределах 25–29% и покрытие менее 70%.

Первоначально мы проанализировали геномы различных видов рода *Achromobacter*, чтобы выяснить количество *phn* транспортеров и гомологию к PhnD белкам штамма LCu2. Поиск осуществляли с помощью BLASTP анализа. Гомологи PhnD1 и PhnD2 транспортеров присутствовали у всех исследуемых видов *Achromobacter*, обладали высокой степенью идентичности (> 95%). PhnD3 был найден только в геномах семи видов – *A. denitrificans*, *A. arsenitoxdans*, *A. deleyi*, *A. aegrifaciens*, *A. insolitus*, *A. pestifer*, *A. agilis* (дополнительные материалы, таблица S1).

Для наглядности в филогенетический анализ были добавлены последовательности Phn транспортеров некоторых бактерий семейства *Alcaligenaceae*, близкородственных роду *Achromobacter*: *Alcaligenes faecalis* (типовой вид для семейства), *Bordetella petrii*, *B. Holmesii*, *B. pertussis*. А также PhnD последовательности *Cupriavidus basilensis*, *C. pampae*, *C. agavae*, демонстрирующие идентичность с белками штамма LCu2 в BLASTP анализе, исключая другие ахромобактерии. Филогенетическая реконструкция показала, что исследуемые PhnD транспортеры штамма LCu2 расходились в три самостоятельных кластера. Кластер фосфонат-связывающих белков PhnD₁ ахромобактерий, из *phn* оперона, был образован тремя обособленными кладами, отстоял отдельно от *B. petrii* и *C. basilensis*. Транспортер PhnD₁ штамма *A. insolitus* LCu2

группировался с белками *A. aegrifaciens*, *A. pestifer*, *A. anxifer* (рис. 1).

Подобная топология говорит о консервативности гена *phnD*₁, который наследовался, вероятно, путем вертикального переноса и является важным для жизнеобеспечения бактерий. Используя множественное выравнивание последовательностей PhnD₁ относительно референсного белка из *E. coli* (3P71), показано наличие консервативных мотивов в белке *A. insolitus* LCu2, а также аминокислотные остатки, потенциально отвечающие за связывание субстрата (дополнительные материалы, рис. S1).

Второй кластер был образован белками PhnD₃ ахромобактерий, а также *Cupriavidus* и *Bordetella*. Несмотря на высокую идентичность (92–98%) между PhnD₃ последовательностями ахромобактерий (дополнительные материалы, таблица S1), белки *A. insolitus* LCu2, *A. agilis*, *A. denitrificans* образовывали самостоятельные клады. Возможно, поддержание в геноме PhnD₃ транспортеров обеспечивает бактериям преимущество в адаптации к изменяющимся условиям местообитаний. Анализ геномного окружения выявил рядом с ABC-кассетой PhnD₃*C*₃*E*₃ ген, кодирующий фосфолипазу C (QE94757), расщепляющую фосфолипид мембраны – фосфатидилхолин до фосфохолина и диацилглицерина. У некоторых почвенных и ризосферных бактерий экспрессия фосфолипазы C увеличивается в десятки раз в условиях фосфорного голодания, а высвободившийся фосфохолин используется на нужды клетки (Krol, Becker, 2004; Zavaleta-Pastor et al., 2010).

В кластере, образованном белками PhnD₂, транспортер штамма LCu2 располагался в общей кладе с *A. aegrifaciens*, *A. pestifer*, *A. anxifer*. Видовой состав соответствовал кладе, образованной белками PhnD₁, но имел иную топологию. Транспортер PhnD₂ *A. insolitus* LCu2 был на одной ветви с *A. anxifer*, а PhnD₁ штамма LCu2 с *A. aegrifaciens*. В остальном PhnD₂ последовательности ахромобактерий преимущественно группировались отдельно от изолятов *Alcaligenaceae*. Исключение составили белки двух видов – *A. xylosoxidans* и *A. spanius*, которые показали филогенетическую близость к *Alcaligenes faecalis*. Общая топология кластера PhnD₂ также свидетельствовала о вертикальном наследовании гена *phnD*₂, и его роли в жизнедеятельности клетки. Вокруг кассеты *phnD*₂*C*₂*E*₂*E*₂ расположены гены биосинтеза витаминов группы В (тиамина, рибофлавина, пантотеновой кислоты), а также гены, продукты которых фосфорилируют витамины до активных коферментов. Можно предположить, что PhnD₂ имеет сродство к фосфорилированным витаминам, или транспортирует источники для фосфорилирования. Безусловно, эта гипотеза нуждается в тщательном исследовании.

Таким образом, биоинформатический и филогенетический анализ показали, что три предсказанных

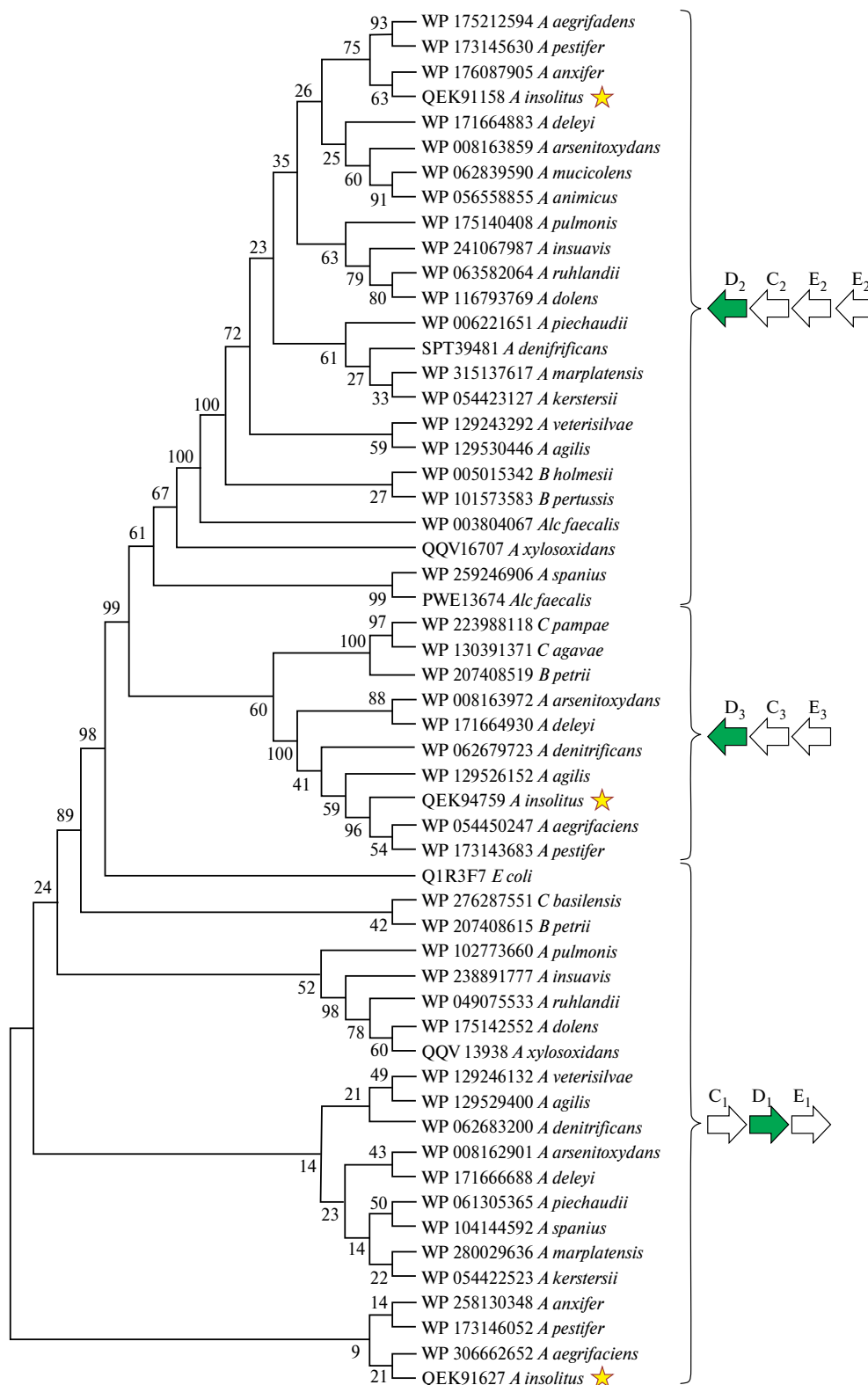


Рис. 1. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей PhnD транспортеров бактерий рода *Achromobacter* и некоторых представителей семейства *Alcaligenaceae*. PhnD последовательности штамма *A. insolitus* LCu2 обозначены звездами; фигурные скобки соответствуют границам кластеров, образованных белками PhnD₁, PhnD₂, PhnD₃; структурные организации ABC-кассет *phn* транспортеров в геномах *Achromobacter*, включая *A. insolitus* LCu2, приведены справа; *phnD* маркированы зеленым.

PhnD субстрат-связывающих транспортера в геномах представителей рода *Achromobacter*, включая последовательности *A. insolitus* LCu2, различаются между собой по степени консервативности, структурному строению, геномному контексту. Выявленные различия могут быть опосредованы сродством PhnD транспортеров к разным источникам фосфора, включая как органофосфонаты, так и соединения с фосфоэфирной связью. Полученные результаты отражают адаптационный потенциал *A. insolitus* LCu2, а также демонстрируют его возможные стратегии в условиях дефицита неорганического фосфора.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы 121031700141-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Amstrup S.K., Ong S.C., Sofos N., Karlsen J.L., Skjerning R.B., Boesen T., Enghold J.J., Hove-Jensen B.,

- Brodersen D.E. Structural remodelling of the carbon-phosphorus lyase machinery by a dual ABC ATPase // Nat. Commun. 2023. V. 14. Art. 1001. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36604-y>
- Hove-Jensen B., Zechel D.L., Jochimsen B. Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2014. V. 78. P. 176–197.
- Kertesz M., Elgorriaga A., Amrhein N. Evidence for two distinct phosphonate-degrading enzymes (C–P lyases) in *Arthrobacter* sp. GLP-1 // Biodegradation. 1991. V. 2. P. 53–59.
- Krol E., Becker A. Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011 // Mol. Genet. Genom. 2004. V. 272. P. 1–17.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Shah B.S., Ford B.A., Varkey D., Mikolajek H., Orr C., Mykhaylyk V., Owens R.J., Paulsen I.T. Marine picocyanobacterial PhnD1 shows specificity for various phosphorus sources but likely represents a constitutive inorganic phosphate transporter // ISME J. 2023. V. 17. P. 1040–1051.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega // Mol. Syst. Biol. 2011. V. 7. Art. 539.
- Zavaleta-Pastor M., Sohlenkamp C., Gao J.L., Guan Z., Zaheer R., Finan T.M., Geiger O. *Sinorhizobium meliloti* phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 302–307.

SHORT COMMUNICATIONS

Phylogenetic Analysis of *phn* Transporters of *Achromobacter insolitus* LCu2

Ye. V. Kryuchkova^{1,*} and G. L. Burygin^{1, 2, 3}

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia

²Saratov State University, Saratov, 410012 Russia

³Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering Named after N.I. Vavilov, Saratov, 410012 Russia
*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Received October 17, 2023, revised December 15, 2023; accepted December 31, 2023

Abstract. Phosphonates are alternative phosphorus sources for bacteria. The genome of *Achromobacter insolitus* strain LCu2 contains three predicted *phn* clusters of ABC-type phosphonate transporters into the cell. To understand the functional, evolutionary, and ecological role of the *phn* clusters, phylogenetic analysis of substrate-binding PhnD proteins from strain LCu2 with their homologs in other *Achromobacter* species and in closely related genera of the family *Alcaligenaceae* was carried out. The PhnD transporters

formed three separate clusters, which indicated the differences in their structural composition. PhnD₁ and PhnD₂ were present in the genomes of all *Achromobacter* species and grouped separately from those of other members of the family *Alcaligenaceae*, which indicated vertical inheritance of the *phnD*₁ and *phnD*₂ genes and their involvement in the life-supporting processes. PhnD₃ was found in the genomes of seven *Achromobacter* species. The *phnD*₃ gene was probably acquired via horizontal transfer or duplication and is induced during adaptation to changing environmental conditions. Maintenance of three structurally different clusters of the *phn* transporters is probably ecologically advantageous to *A. insolitus* LCu2, providing for phosphorus retrieval from synthetic and natural organophosphonates as well as other sources.

Keywords: phosphonates, *phn* transporters, *Achromobacter insolitus*, phylogeny, *Alcaligenaceae*

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ PHN
ТРАНСПОРТЕРОВ АХРОМОВАСТЕР INSOLITUS LCU2

© 2024 г. Е.В. Крючкова^{а, *}, Г.Л. Бурыгин^{а, b, c}

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»,
Саратов, 410049, Россия

^бСаратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского,
Саратов, 410012, Россия

^сСаратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова,
Саратов, 410012, Россия

*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Таблица S1. Наличие и идентичность аминокислотных последовательностей PhnD в геномах бактерий рода *Achromobacter*

No.	Species	Identity, %		
		PhnD ₁	PhnD ₂	PhnD ₃
1	<i>A. xylosoxidans</i>	99.69	91.10	—
2	<i>A. piechaudii</i>	94.19	96.69	—
3	<i>A. denitrificans</i>	95.71	96.39	95.44
4	<i>A. arsenitoxydans</i>	95.06	98.19	93.73
5	<i>A. insuavis</i>	92.33	97.89	—
6	<i>A. deleyi</i>	94.80	97.59	92.23
7	<i>A. aegrifaciens</i>	97.55	98.49	98.70
8	<i>A. mucicolens</i>	22.58*	97.29	—
9	<i>A. marplatensis</i>	95.71	96.39	—
10	<i>A. insolitus</i>	100	100	100
11	<i>A. ruhlandii</i>	91.41	96.12	—
12	<i>A. spanius</i>	95.72	96.39	—
13	<i>A. aestuarii</i>	78.26	48.24	—
14	<i>A. anxifer</i>	96.63	99.70	—
15	<i>A. animicus</i>	—	96.39	—
16	<i>A. pestifer</i>	96.93	98.49	98.39
17	<i>A. kerstersii</i>	95.72	96.08	—
18	<i>A. veterisilvae</i>	95.09	96.08	—
19	<i>A. agilis</i>	95.71	96.69	97.26
20	<i>A. aloeverae</i>	71.91	36.08	—
21	<i>A. dolens</i>	91.10	95.52	—
22	<i>A. pulmonis</i>	92.33	96.39	—

Белками запроса в BLASTP анализе были PhnD транспортеры штамма *A. insolitus* LCu2.

Рис. S1. Множественное выравнивание PhnD, из разных бактерий относительно референсного белка из *E. coli* (3P7I) (3P7I) *E. coli* UTI89; (Q1R3F7) *E. coli* UTI89; (WP_207408615.1) *Bordetella petrii*; (WP_276287551.1) *Cupriavidus basilensis*; (QQV13938.1) *Achromobacter xylosoxidans*; (QEK91627) *Achromobacter insolitus* LCu2; (WP_062683200.1) *Achromobacter denitrificans*. “*” – одинаковые аминокислоты; “:” – аминокислоты одного класса; “.” – часть аминокислот одного класса; консервативные мотивы помечены персиковым; аминокислотные остатки, отвечающие за образование водородных связей между субстратом (2-аминоэтилфосфонатом) и белком из *E. coli* (3P7I), отмечены звездочками (Alicea et al., 2011).

Alicea I., Marvin J. S., Miklos A. E., Ellington A. D., Looger L. L., Schreier E. R. Structure of the *Escherichia coli* phosphonate binding protein PhnD and rationally optimized phosphonate biosensors // J. Mol. Biol. 2011. V. 414. P. 356–369.