

Галофильный облигатный метилотроф *Methylobacterium halotolerans* C2 экспрессирует три изоформы PQQ-зависимых метанолдегидрогеназ

Торгонская М.Л., Фирсова Ю.Е., Канаруллина Е.Н.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН;
torgonskaya@ibpm.ru

Аэробные метилотрофные бактерии, использующие C₁-соединения в качестве источников углерода и энергии, окисляют метанол с помощью специализированных ферментов – метанолдегидрогеназ (МДГ). Грамположительные метилотрофы обладают цитоплазматической НАД(Ф)⁺-зависимой МДГ, тогда как у грамотрицательных бактерий функционируют периплазматические ферменты, использующие в качестве кофактора пирролохинолинхинон (PQQ). Классическая PQQ-МДГ содержит в активном центре Ca²⁺ и представляет собой $\alpha_2\beta_2$ -гетеротетрамер из больших (MxaF) и малых (MxaI) субъединиц. У некоторых представителей порядков *Burkholderiales* и *Rhodocyclales* выявлена менее распространенная PQQ-алкоголдегидрогеназа MDH2 с низким сродством к метанолу [Троценко и соавт., 2010 для обзора]. Еще один необычный тип PQQ-МДГ – ХохF был выявлен недавно при секвенировании геномов метилотрофных бактерий. Белок ХохF демонстрирует <50% сходства с белками MxaF и для каталитической активности требует присутствия ионов лантаноидов (Ln³⁺) [Chistoserdova, 2016]. В отличие от генов *mxa* и *mdh2*, ген *хоxF* присутствует у всех известных грамотрицательных метилотрофов, а также у ряда организмов, для которых не описана способность к росту на метаноле. При этом в геномах многих бактерий присутствуют множественные, иногда дивергентные копии ХохF, что в настоящее время рассматривается как свидетельство распространения соответствующих генов путем горизонтального переноса [Taubert et al., 2015].

Недавнее секвенирование генома галофильного облигатного метилотрофа *Methylobacterium halotolerans* C2 [Vasilenko et al., 2016] выявило наличие у него трех детерминант, кодирующих PQQ-МДГ – кластера генов *mxa* (локус A7A08_02427-A7A08_02437) и двух кластеров генов *хоxF* (A7A08_02420-A7A08_02423 и A7A08_02537-A7A08_02539), первый из которых содержал разрыв рамки считывания *хоxF*. Проведенная нами проверка данного участка с помощью специально сконструированных пар праймеров продемонстрировала, что в структуре гена и непосредственно перед ним были ошибочно пропущены два нуклеотида. Следовательно, оба гена *хоxF* у штамма C2 полноразмерны и могут быть функциональными.

Известные белки ХохF филогенетически разнообразны и условно подразделяются на, как минимум, пять групп (ХохF1-5), причем идентичность их последовательностей в пределах одной группы составляет >65-70%, тогда как между ними – ниже 50% [Chistoserdova, 2016]. Филогенетический анализ транслированных аминокислотных последовательностей детерминант *хоxF* у штамма C2 показал, что белок, кодируемый локусом A7A08_02420-A7A08_02421, принадлежит к группе ХохF1, тогда как продукт гена A7A08_02537 является представителем группы ХохF3. Следует отметить, что, в отличие от распространенных белков типа ХохF3, детерминанты ХохF1-группы были найдены пока лишь у небольшого числа микроорганизмов – анаэробного метанотрофа '*Candidatus Methylobacterium mirabilis oyuferi*', патогенов растений из рода *Xanthomonas*, представителей семейства *Beijerinckiaceae*, а также близкородственного *M. halotolerans* C2 факультативного морского метилотрофа *Methyloceanibacter caenitepidi* [Taubert et al., 2015 для обзора]. Таким образом, изучение МДГ ХохF1-типа у *M. halotolerans* C2 представляет большой интерес.

Для оценки активности экспрессии выявленных генов PQQ-МДГ в *M. halotolerans* C2 на основе беспромоторного зонд-вектора широкого круга хозяев pCMgfp [Firsova,

Torgonskaya, 2019] нами были сконструированы репортерные плазмиды, несущие ген зеленого флуоресцирующего белка (GFP) под контролем промоторов генов *txaF*, *хоxF1* и *хоxF3* – pCMgfp:C2PmxaF, pCMgfp:C2PхоxF1 и pCMgfp:C2PхоxF3. Конструкции переносили в клетки штамма C2 методом двуродительского скрещивания с использованием *E. coli* S17-1 λ pir, и в клетках полученных репортерных штаммов измеряли флуоресценцию GFP на флуориметре FLUOstar OPTIMA (“BMG Labtech”, Германия), при длинах волн: возбуждения – 485 нм, эмиссии – 510 нм. В результате установлено, что при росте *Ml. halotolerans* C2 на минеральной среде MAMS с метанолом происходит активная экспрессия всех трех генов PQQ-МДГ (Рис. 1). Кроме того, в отличие от промоторов генов *txaF* и *хоxF3*, промотор гена *хоxF1* оказался способен функционировать и в гетерологичном хозяине – *E. coli* S17-1 λ pir.

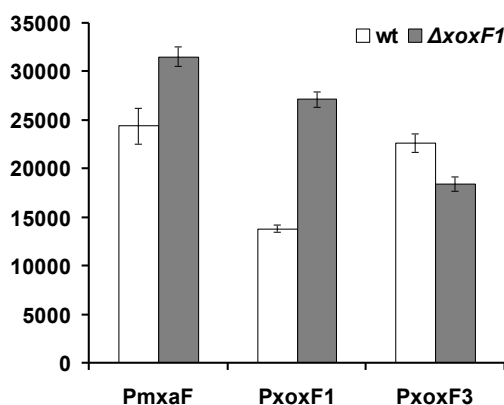


Рис. 1. Флуоресценция клеток (тыс. ед./ОП₆₀₀) трансконъюгантов *Ml. halotolerans* C2 дикого типа (wt) и нокаут-мутанта по гену *хоxF1* (Δ хоxF1), несущих плазмиды pCMgfp:C2PmxaF, pCMgfp:C2PхоxF1 и pCMgfp:C2PхоxF3, при росте на среде MAMS с 3% NaCl и 120 мМ метанола (ОП₆₀₀=0.5). В качестве базового уровня (581.1) использован показатель для штамма с беспромоторным вектором pCMgfp.

Полученный нами методом сайт-специфической гомологичной рекомбинации нокаут-мутант штамма C2 с разрывом гена *хоxF1* кассетой устойчивости к гентамицину (C2 Δ хоxF1, Gm^R) сохранил способность к росту на метаноле в среде MAMS, однако на среде «К» рост отсутствовал. Мы предполагаем, что этот эффект объясняется различием указанных сред по содержанию кальция (152 и 0 мкМ, соответственно), присутствие которого может стимулировать экспрессию классической PQQ-МДГ. Анализ активности промоторов генов МДГ у мутанта C2 Δ хоxF1, проведенный с помощью вышеописанных репортерных конструкций, подтверждает предположение о компенсаторной активации синтеза классической PQQ-МДГ в отсутствие функционального ХохF1 при росте на среде MAMS с метанолом, а также демонстрирует усиление экспрессии с промотора разрушенного гена (Рис.1). Разрушение гена *хоxF1* у штамма C2 не привело к блокировке экспрессии гена *txaF*.

Итак, нами показано, что галофильный облигатный метилотроф *Ml. halotolerans* C2 экспрессирует гены всех трех закодированных в геноме PQQ-зависимых МДГ, однако для выяснения механизмов регуляции их синтеза требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-04-01148-а.

Литература

1. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии // Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН. 2010. 325 с.
2. Chistoserdova L. Lantides: new life metals // World J. Microbiol. Biotechnol. 2016. V.32. P.138.

3. Taubert M., Grob C., Howat A.M., Burns O.J., Dixon J.L., Chen Y., Murrell J.C. XoxF encoding an alternative methanol dehydrogenase is widespread in coastal marine environments // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. P. 3937–3948.
4. Vasilenko O.V., Doronina N.V., Shmareva M.N., Tarlachkov S.V., Trotsenko Yu.A. Draft genome sequence of *Methylobacillus halotolerans* C2^T, a new halotolerant methylotroph, accumulating poly-3-hydroxybutyrate and ectoine // *Genome Announcements*. 2016. V. 4(5). P. e01189-16.
5. Firsova Y.E., Torgonskaya M.L. Different roles of two *groEL* homologues in methylotrophic utiliser of dichloromethane *Methylorubrum extorquens* DM4 // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2019. DOI: 10.1007/s10482-019-01320-5.

