

Влияние мутации в гене бактериолитического фермента Л5 на биогенез внешнемембранных везикул *Lysobacter* sp. XL1

¹Кудрякова И.В., ¹Афошин А.С., ¹Ивашина Т.В., ¹Сузина Н.Е.,
²Серкова А.А., ¹Васильева Н.В.

¹ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН)
²ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»; kudryakovairina@yandex.ru

Бактериолитическая протеаза Л5 *Lysobacter* sp. XL1 является компонентом высокоэффективного антимикробного комплекса Лизоамидаза. Этот белок попадает в окружающую среду посредством внешнемембранных везикул, образуемых клетками *Lysobacter* sp. XL1 [1]. С использованием методов биохимии и электронной иммуноцитохимии были получены результаты, указывающие на то, что белок Л5 принимает участие в биогенезе определённой группы секреторных везикул, содержащих его в своем составе [2-4]. Целью данной работы было подтвердить роль белка Л5 в этом процессе. Для решения поставленной цели был проведен нокаут гена Л5 (*alpB*) и изучено влияние этой мутации на процесс формирования везикул.

Для введения мутации в геном *Lysobacter* sp. XL1 на основе суицидного вектора pJQ200SK сконструирована плазида, содержащая фрагмент ДНК с делеционным вариантом *alpB* (соответствует делеции 40 – 331 а.о в последовательности Л5-протеазы) и фланкирующими ген последовательностями геномной ДНК. Плазмиду вводили в клетки *Lysobacter* sp. XL1 методом электропорации с отбором меродиплоидных клонов. Об интеграции плазмиды в геном *Lysobacter* sp. XL1 свидетельствовала устойчивость трансформантов к гентамицину (маркер плазмиды) и тетрациклину (маркер кассеты, встроенный в участок делеции) и чувствительностью к сахарозе. В результате разрешения меродиплоидов отобраны $\text{Suc}^{\text{R}}\text{Tc}^{\text{R}}\text{Gm}^{\text{S}}$ клоны, в которых произошел двойной обмен между мутантным и диким аллелями гена *alpB*. Наличие делеции в гене *alpB* подтверждено методом ПЦР с использованием специфических праймеров и секвенированием.

Анализ бактериолитической активности отобранных делеционных мутантов выявил, что по сравнению с диким типом литическая активность мутантного штамма была в 1,5 раза меньше. Из равных объемов культуры мутантного штамма *Lysobacter* sp. XL1 и дикого типа были выделены препараты везикул методом дифференциального центрифугирования. Методом электронной микроскопии, а также аналитическими методами установлено, что мутантный штамм образует меньшее количество везикул. Данный результат свидетельствует в пользу того, что бактериолитический белок Л5 действительно принимает участие в процессе формирования везикул *Lysobacter* sp. XL1. Полученные результаты позволяют предложить новый механизм биогенеза везикул у грамотрицательных бактерий.

В целом, успешный нокаут гена *alpB* *Lysobacter* sp. XL1 открывает многие перспективы как в изучении особенностей секреции бактериолитических ферментов и регуляции их генов, так и в создании гомологичной системы экспрессии литических белков, значимых для биомедицины.

Литература

1. Vasilyeva N.V., Tsfasman I.M., Suzina N.E., Stepnaya O.A., Kulaev I.S. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles // *FEBS J.* – 2008. – V.275. – №15. – p.3827 – 3835.

2. Kudryakova I.V., Suzina N.E., Vasilyeva N.V. Biogenesis of *Lysobacter* sp. XL1 vesicles // *FEMS Microbiol Lett.* – 2015. – V.362. – №18. – fmv137.
3. Кудрякова И.В., Сузина Н.Е., Винокурова Н.Г., Шишкова Н.А., Васильева Н.В. Изучение факторов биогенеза везикул *Lysobacter* sp. XL1 // *Биохимия.* – 2017. – Т.82. – №4. – с.677 – 686.
4. Kudryakova I.V., Gabdulkhakov A.G., Tishchenko S.V., Lysanskaya V. Ya., Suzina N.E., Tsfasman I.M., Afoshin A.S., Vasilyeva N.V. Structural and functional properties of antimicrobial protein L5 of *Lysobacter* sp. XL1// *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2018. – V.102. – №23. – p.10043 – 10053.