

Получение и характеристика нокаут-мутантов *Methylobacterium extorquens* DM4 по генам предполагаемых L,D-транспептидаз METDI0480 и METDI3291

Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН; yulhenbisti@mail.ru

Ранее в протеоме клеток метилотрофного деструктора *Methylobacterium extorquens* DM4, выращенных на дихлорметане (CH₂Cl₂, ДХМ), было выявлено повышенное накопление белков, кодируемых генами METDI0480 и METDI3291 (Muller et al., 2011). Предположительно, указанные гены кодируют L,D-транспептидазы, участвующие в создании поперечных сшивок в пептидогликане, упрочняющих конструкцию клеточной стенки и повышающих устойчивость к воздействию растворителей. Поэтому была поставлена задача изучить роль соответствующих белков в адаптации к росту на ДХМ. Гены METDI0480 и METDI3291 расположены на хромосоме и имеют сравнительно небольшие размеры (1095 и 672 п.н., соответственно). Для получения нокаут-мутанта фрагмент гена METDI0480 (795 п.н.) был амплифицирован методом ПЦР из геномной ДНК *M. extorquens* DM4 с помощью пары праймеров 0480for (5'-atcctctagactactgtccaggaactc-3') и 0480rev (5'-tttaagcttgccgcactcaaacgctt-3'), содержащих сайты рестрикции *Xba*I и *Hind*III (подчеркнуты), и клонирован в вектор pK18mob (Schäfer et al., 1994) по этим же сайтам. В полученную плазмиду p0480 по сайту *Sal*I была вставлена кассета устойчивости к гентамицину из вектора p34S-Gm (Dennis, Zylstra, 1998). Для инактивации гена второй предполагаемой транспептидазы в вектор pK18mob был клонирован концевой участок гена METDI3291 с захватом фланкирующей последовательности ДНК (823 п.н.), амплифицированный с помощью праймеров 3291for (5'-ataggtaccgtctacgaccscctatgcca-3') и 3291rev (5'-gttaaagcttaattgcatgctgcaatc-3'), содержащих сайты рестрикции *Acc*65I и *Hind*III (подчеркнуты). В полученную плазмиду p3291 по сайту *Bam*HI была вставлена кассета устойчивости к гентамицину (865 п.н.) из вектора p34S-Gm. Итоговые конструкции p0480-Gm и p3291-Gm содержали мутантный ген METDI0480 или METDI3291 со вставкой маркерного гена антибиотикоустойчивости, области гомологии для рекомбинации составили 394/388 п.н. и 400/398 п.н., соответственно. Мобилизацию плазмид p0480-Gm и p3291-Gm в *M. extorquens* DM4 проводили путем двуродительского скрещивания со штаммом *E. coli* S17-1. Из полученных трансконъюгантов отбирали только двойные рекомбинанты, устойчивые к гентамицину и чувствительные к канамицину.

Установлено, что полученные нокаут-мутанты ΔMETDI0480 и ΔMETDI3291 сохранили способность к росту на сукцинате и C₁-соединениях, однако скорость роста на ДХМ была снижена на 10 и 17%, соответственно, как у клеток, предварительно выращенных на метаноле, так и у преадаптированных к ДХМ (Рис. 1). При сравнительной оценке устойчивости мутантов и исходного штамма DM4wt к воздействию различных типов стрессов обнаружено, что мутанты, выращенные до стационарной фазы роста, более чувствительны к повышенной концентрации NaCl, этанолу и тепловому шоку (55°C, 5 мин) по сравнению с исходным штаммом. В стационарной фазе роста на ДХМ или метаноле мутант ΔMETDI3291 также оказался более чувствителен к воздействию детергента ДСН, а клетки штамма ΔMETDI0480 были существенно менее устойчивы к высушиванию, чем DM4wt. В то же время мутанты практически не отличались от исходного штамма по устойчивости к H₂O₂, метилглиоксалу и формальдегиду. Поскольку предполагаемые транспептидазы METDI0480 и METDI3291 содержат домен YkuD, определяющий устойчивость к β-лактамам антибиотикам, диско-диффузионным методом была

протестирована чувствительность соответствующих мутантов к ампициллину. Штамм ΔMETDI3291 оказался на 26% более чувствителен к этому антибиотику, чем DM4wt.

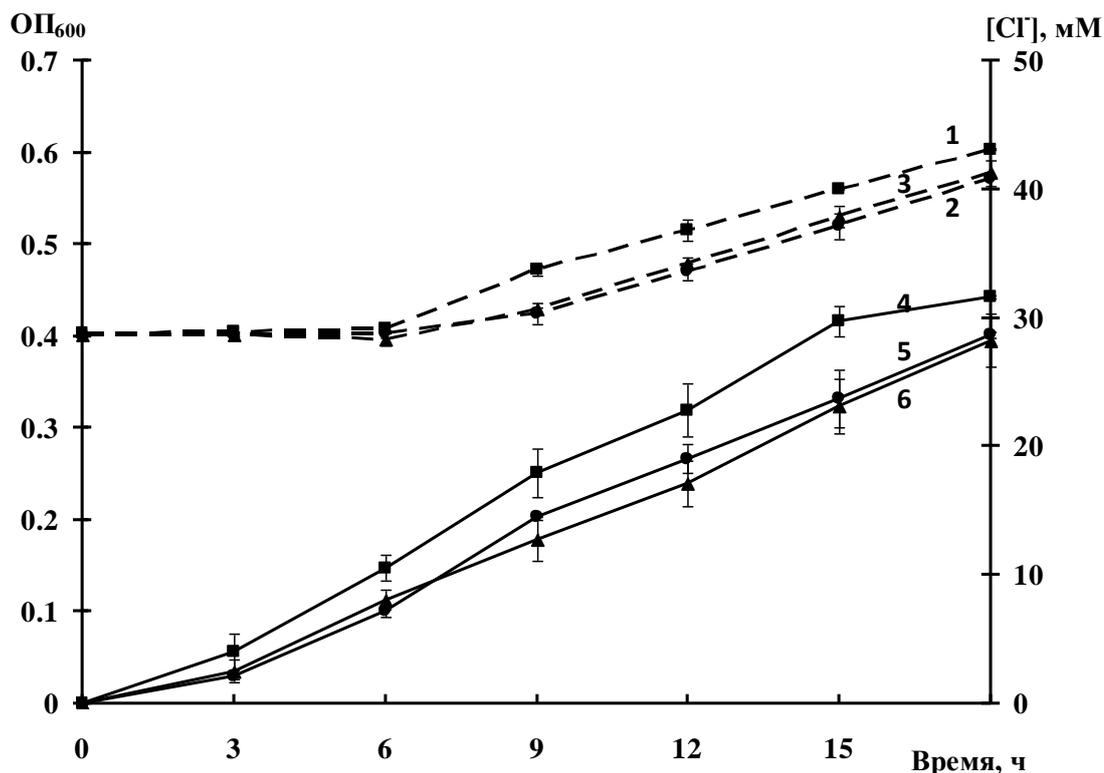


Рис. 1. Динамика роста на ДХМ *M. extorquens* DM4wt (1,4) и мутантов ΔMETDI0480 (2,5) и ΔMETDI3291 (3,6), определенная по показателям оптической плотности суспензии клеток(1-3) и концентрации ионов хлора в среде (4-6), образующихся при разложении ДХМ. Клетки преадаптированы к росту на ДХМ в течение трех пассажей.

Таким образом, инактивация генов предполагаемых L,D-транспептидаз METDI0480 и METDI3291 привела к снижению устойчивости *M. extorquens* DM4 к ряду стрессовых факторов (повышенная соленость, воздействие детергентов, высушивание), что обусловило снижение скорости роста на ДХМ. Относительно небольшой фенотипический эффект мутаций ΔMETDI0480 и ΔMETDI3291, вероятно, объясняется компенсаторной экспрессией генов других транспептидаз, присутствующих в геноме *M. extorquens* DM4.

В дальнейшем для оценки количества 3-3 поперечных сшивок, образуемых L,D-транспептидазами, планируются исследования структуры пептидогликана исходного и мутантных штаммов, включающие получение препарата муреина, обработку N-ацетилмурамидазой, мечение муропептидов флуоресцентным красителем ANTS с последующим разделением методом FACE (Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis) (Li et al., 2004).

Литература

1. Dennis J.J., Zylstra G.J. Plasmids: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 2710–2715.
2. Li S.-Y., Høltje J.-V., Young K.D. Comparison of high-performance liquid chromatography and fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis methods for analyzing peptidoglycan composition of *Escherichia coli* // Anal Biochem. 2004. V. 326. № 1. P. 1–12.

3. Muller E.E., Hourcade E., Louhichi-Jelail Y., Hammann P., Vuilleumier S., Bringel F. Functional genomics of dichloromethane utilization in *Methylobacterium extorquens* DM4 // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. № 9. P. 2518-2535.
2. Schäfer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A.. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. 1994. V. 145. P. 69-73.