

На правах рукописи

ЕКИМОВА ГАЛИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
1-АМИНОЦИКЛОПРОПАН-1-КАРБОКСИЛАТДЕЗАМИНАЗ И
D-ЦИСТЕИНДЕСУЛЬФОГИДРАЗ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
РОДА *METHYLOBACTERIUM***

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2019

Работа выполнена в лаборатории радиоактивных изотопов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН) в рамках учебной программы аспирантуры 03.02.03 «Микробиология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Пушинский государственный естественно-научный институт (ПушГЕНИ)

Научный руководитель: **Доронина Нина Васильевна,**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФИЦ ПНЦБИ РАН, профессор ПушГЕНИ, г. Пушкино

Официальные оппоненты: **Рукавцова Елена Борисовна,**
доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Филиал Института Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН), г. Пушкино

Нетрусов Александр Иванович,
доктор биологических наук, профессор кафедры Микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ), г. Москва

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ИЭГМ УрО РАН), г. Пермь

Защита состоится «6» февраля 2019 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ РАН и ИБФМ РАН. Автореферат размещен на сайтах <http://vak.ed.gov.ru> и <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Аэробные метилотрофные бактерии – обширная группа метилотрофных прокариот, использующих окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии. В настоящее время известно, что многие аэробные метиловобактерии симбиотически связаны с растениями, колонизируя с высокой плотностью листовую поверхность, присутствуют в ризосфере и в семенах (Corpe, Rheem 1989; Holland 1997; Доронина 1999; Доронина с соавт., 2004; Троценко с соавт., 2010; Федоров с соавт., 2011; Vorholt, 2012). Взаимосвязь растений с метилотрофами обусловлена, с одной стороны, тем, что растения выделяют в окружающую среду метанол, формальдегид, формиат, метилированные амины, метилсернистые соединения и галометаны (Galbally, Kirstine, 2002; Keppler et al., 2006), которые активно потребляют метилотрофы. С другой стороны, метилотрофные бактерии стимулируют рост и развитие растений за счет биосинтеза фитогормонов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов), витаминов, повышают фотосинтетическую активность и устойчивость к фитопатогенам и тяжелым металлам, а также фиксируют молекулярный азот (Sy et al., 2001; Иванова с соавт., 2000; Cervantes-Martí, López-Dí 2004; Федоров с соавт., 2010; Агафонова с соавт., 2016, 2018).

Кроме того, при росте на поверхности и внутри тканей растений бактерии могут использовать в качестве источников питания различные метаболиты растений, такие как аминокислоты. Особую роль в фитосимбиозе занимает деградация бактериями 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) – предшественника в биосинтезе этилена растениями. Этилен – один из основных фитогормонов, он играет важную роль в развитии корневой системы, созревании плодов, а также в передаче стрессового сигнала. В неблагоприятных условиях, таких как температурный, солевой и другие стрессы, концентрация этилена в тканях растений увеличивается. Как часть стрессовой реакции он ингибирует удлинение корня, нодуляцию и транспорт ауксинов, ускоряет старение тканей и вызывает дефолиацию (Arshad, Frankenberger, 2002). Бактерии, обладающие ферментом АЦК-деаминазой, который деградирует АЦК до неактивных α -кетобутирата и ионов аммония, способствуют снижению концентрации этилена и повышению устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам (Glick et al., 2007a).

Помимо этого, у растений и ряда бактерий обнаружен фермент, отличающийся высоким уровнем сходства аминокислотной последовательности с АЦК-деаминазой – D-цистеиндесульфогидаза, который катализирует деградацию D-цистеина до пирувата, сероводорода и аммиака. Активность этого фермента определяет устойчивость бактерий к токсичному для них D-цистеину, а выделяющийся при его деградации сероводород обладает фунгицидными свойствами и по последним данным регулирует множество физиологических процессов у растений (Soutourina et al. 2001; Wang, 2012; Li, 2013; Li, Zhu, 2014; Li et al., 2014). Предполагается, что по этим причинам D-цистеиндесульфогидаза также принимает участие в формировании ассоциаций бактерий с растениями.

Несмотря на интенсивное изучение метаболических основ фитосимбиоза метилотрофов, остаются неизвестными многие вопросы относительно ферментов, определяющих взаимодействие бактерий с растениями, в том числе регуляции генов, кодирующих эти белки.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – изучение распространения генов АЦК-дезаминаз и D-цистеиндесульфогидаз, биохимических свойств, а также транскрипционной регуляции экспрессии генов этих ферментов у аэробных метилотрофных бактерий.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать систему вырожденных олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-амплификации генов 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазы (*acdS*) и D-цистеиндесульфогидазы (*dcyD*), ферментов катаболизма растительных аминокислот, и проанализировать их распространение среди аэробных метилотрофных бактерий.

2. Клонировать гены *acdS*, выделить и охарактеризовать рекомбинантные АЦК-дезаминазы из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amycolatopsis methanolica* 239.

3. Получить и охарактеризовать мутантные штаммы *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831 с делециями в генах *acdS* и *acdR*, а также их комплементированные варианты.

4. Клонировать ген *acdR*, очистить предполагаемый транскрипционный белок-регулятор из *M. radiotolerans* JCM 2831 и выяснить его роль в регуляции гена *acdS* *M. radiotolerans*.

Научная новизна работы. У метилотрофов различного таксономического положения проведен скрининг на наличие генов ферментов катаболизма растительных аминокислот – 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и D-цистеина – АЦК-дезаминазы и D-цистеиндесульфогидазы, а также филогенетический анализ транслированных аминокислотных последовательностей этих генов.

Клонированы гены и охарактеризованы рекомбинантные АЦК-дезаминазы из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и факультативно метилотрофной актинобактерии *Amycolatopsis methanolica* 239.

Впервые для метилотрофов получены делеционные мутанты эпифитной метилотрофной бактерии *M. radiotolerans* по структурному (*acdS*) и регуляторному (*acdR*) генам АЦК-дезаминазы, а также их комплементированные варианты, проанализирована их способность к деградации АЦК.

Впервые для альфапротеобактерий клонирован и очищен регуляторный белок AcdR, относящийся в Lrp-семейству, а также выявлена его роль в регуляции АЦК-дезаминазы у *M. radiotolerans*.

Научно-практическое значение работы. Данная работа расширяет и углубляет знания о механизмах симбиоза метилотрофов с растениями, что позволяет лучше реализовать их биотехнологический потенциал, разработать новые биопрепараты-стимуляторы роста и развития растений с заданными свойствами, повышающие продуктивность и устойчивость растений к стрессовым воздействиям и фитопатогенам.

Разработанные системы вырожденных олигонуклеотидных праймеров для детекции и амплификации генов АЦК-дезаминаз (*acdS*) и D-цистеиндесульфогидаз (*dcyD*) позволяют в дальнейшем оценить способность бактерий различного таксономического положения в чистых культурах и сообществах к деградации растительных аминокислот.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на 15-18, 20-й международных школах-конференциях «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2011–2016 гг.); на VIII Молодёжной конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2011 г.); V Всероссийском с

международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012 г.); Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014 г.); на конференциях «Экотоксикология» (Тула, 2011, 2013 гг.); отчетных конференциях ИБФМ РАН (Пушино, 2011, 2014, 2012 и 2017 гг.), симпозиуме «Биоразнообразие: геномика и эволюция» (Новосибирск, 2018 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 3 статьи – в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы данных.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Текст работы занимает 107 страниц, содержит 38 рисунков и 8 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 226 ссылок.

Благодарности. Автор глубоко признателен д.б.н., Дорониной Н.В., зав. лабораторией радиоактивных изотопов, д.б.н., проф. Троценко Ю.А. и к.б.н. Федорову Д.Н. за ценное руководство в проведении работы, постоянное внимание и поддержку на всех этапах работы. При выполнении диссертационной работы автор пользовался советами и помощью к.б.н. Мустахимова И.И. и Панкратовой К.М. и выражает им искреннюю благодарность. Автор благодарен Akio Tani (Institute of Plant Science and Resources, Okayama University) за предоставление для работы ряда типовых штаммов аэробных метилотрофных бактерий, Глухову А. С. (Институт белка РАН) за проведение беспленочной радиоавтографии.

Работа поддержана грантами: РФФИ №№ 12-04-31373-мол_а, 14-04-32202-мол_а, 16-04-00381-а, 18-34-00998 мол_а, РФФИ №14-14-01045, ГЗ №6.749.2014/к.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили штаммы аэробных метилотрофных бактерий из коллекции лаборатории радиоактивных изотопов ИБФМ РАН и типовые культуры, предоставленные А. Tani (Institute of Plant Science and Resources, Okayama University). Метилобактерий выращивали при 28°C на минеральной среде «К» с 0,5% (об/об) метанола (Доронина, 1999). В работе использовали штаммы *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) и XL1-Blue (Stratagene) для рутинных операций с плазмидами, *Rosetta* (Novagen) для сверх-продукции рекомбинантных белков AcdS и AcdR, S17-1 (Simon et al., 1983) для конъюгативного переноса векторов. *E. coli* выращивали на среде «LB» с добавлением при необходимости селективных антибиотиков (Sambrook, Russell 2001).

Молекулярно-генетические методы. Выделение геномной и плазмидной ДНК, эндонуклеазные реакции, лигирование фрагментов ДНК, получение компетентных клеток *E. coli* и их трансформацию проводили стандартными методами (Sambrook, Russell 2001). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на амплификаторе BIO-RAD MJ Mini (США). Секвенирование ДНК выполнено в Межинститутском центре «ГЕНОМ» ИМБ РАН. Анализ нуклеотидных последовательностей, их трансляцию в аминокислотные последовательности, определение сайтов рестрикции и открытых рамок считывания (ОРС) осуществляли при помощи программ GeneRunner 6.1 и Vector NTI Suite 9.1 (Invitrogen).

Конструирование и подбор праймеров для ПЦР-скрининга генов *acdS* и *dcyD* производили на основе имеющихся в базе данных GenBank известных нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей. Олигонуклеотидные праймеры спроектированы комплементарно участкам, кодирующим наиболее консервативные аминокислотные последовательности, выравненные при помощи программы AlignX из пакета Vector NTI Suite 9.1 (Invitrogen).

Филогенетический анализ проводили с помощью пакетов программ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), CLUSTAL W (Thompson et al., 1997), MEGA 6 (Tamura et al., 2013) методами UPGMA (unweighted-pair group method with average linkages), для тестирования надежности построенного дерева использовали значения bootstrap для 1000 повторностей. В случае нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий применяли метод ближайших соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 6. Надежность построенного дерева была проверена значением bootstrap для 1000 деревьев.

Мутантные штаммы *M. radiotolerans* с делециями в генах *acdS* и *acdR* получали путем гомологичной рекомбинации с мутантными аллелями генов, введенных при помощи конъюгативного переноса в суицидальном векторе pK18mob (Schäfer et al., 1994). **Комплементацию мутаций** в *M. radiotolerans* осуществляли клонированием ОРС соответствующих генов в векторе p7A-29, производной вектора pCM160 (Marx, Lidstrom, 2001) с последующим переносом в клетки мутантов посредством конъюгации.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков. Векторы для сверхэкспрессии рекомбинантных белков получали клонированием ОРС соответствующих генов в векторе pHUE (Catanzariti et al., 2004). Использовали штаммы *E. coli* Rosetta трансформированные полученными плазмидами p7A-126, p7A-127 и p7A-129. Синтез белков индуцировали добавлением 0,2 mM изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозида (ИПТГ). Рекомбинантные белки выделяли Ni²⁺-хелатной хроматографией из суперпродуцентов *E. coli* в соответствии с методиками фирмы Qiagen с небольшими изменениями (Henco, 1992). Белковые фракции анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (Laemmli, 1970) Концентрацию белков определяли спектрофотометрически (Bradford, 1976).

Характеристики рекомбинантных белков определяли, исследуя ферментативные активности в зависимости от температуры, pH и концентрации субстратов. Значения K_m и k_{cat} получали путем аппроксимации данных, используя модуль Enzyme Kinetics 1.3 программы SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc.). Молекулярные массы холоферментов определяли гельпроникающей хроматографией и электрофорезом в полиакриламидном геле в нативных условиях, согласно рекомендациям фирмы Pharmacia.

Анализ образования комплексов AcdR - ДНК проводили методом задержки в геле. В качестве ДНК-субстратов использовали ПЦР-фрагмент, амплифицированный из геномной ДНК *M. radiotolerans*, используя [γ -³²P] АТФ меченые праймеры Mrad-acdR-68r и P-acdS-R. Мечение праймеров проводили с использованием полинуклеотидкиназы фага T4 («Fermentas», Литва) и [γ -³²P] АТФ согласно рекомендациям производителя. Уровень радиоактивности в образцах определяли с помощью сцинтилляционного счётчика Beckman Coulter LS6500 Multipurpose Scintillation Counter. Комплексообразование проводили в 20 mM Трис-НСl буфере

(рН 8,0), содержащем 10 мМ MgCl₂, в присутствии конкурирующей ДНК спермы сельди в концентрации 200 мкг/мл. Образование комплексов анализировали электрофорезом в ПААГ, гели высушивали и визуализировали с использованием системы «Cyclone Storage Phosphor System» («Packard Instruments Co», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. ПЦР-скрининг генов АЦК-дезаминазы и D-цистеиндесульфогидразы у аэробных метилотрофных бактерий.

При помощи нуклеотидных последовательностей *acdS*-генов, кодирующих АЦК-дезаминазы различных видов бактерий, и *dcyD*-генов, кодирующих D-цистеиндесульфогидразы, представленных в GenBank, разработаны наборы вырожденных олигонуклеотидных праймеров. С помощью этих пар праймеров проведен ПЦР-скрининг среди 28 типовых штаммов различных видов рода *Methylobacterium*.

Представители рода *Methylobacterium* – грамотрицательные, строго аэробные бактерии, способные расти как на одноуглеродных субстратах, таких как метанол, формиат, так и на многих других органических соединениях. Многие типовые штаммы выделены с поверхности и из тканей растений, например, *M. platani* из листьев платана (Kang et al., 2007), *M. radiotolerans* – из семян риса (Ito, Iizuka 1971), *M. gossipiicola* из листьев хлопка (Madhaiyan et al., 2012). Наличие у большинства из них каротиноидного пигмента придает дополнительную устойчивость к УФ-излучению при росте в филлосфере.

С использованием пары праймеров *acdS*-AF и *acdS*-AR специфический продукт размером 776 п.н. обнаружен в реакциях с ДНК *M. mesophilicum* JCM2829, *M. fujisawaense* O-31 и *R. leguminosarum* bv. *vicia* VF39, а также ДНК культур *B. Japonicum* В-1967 и *M. nodulans* ORS 2060, служившими положительными контролями (рис.1). Кроме того, специфический продукт той же длины обнаружен в реакциях с ДНК *M. gregans* NBRC 103626, *M. longum* DSM 23933, *M. brachiatum* NBRC 103629, *M. tardum* NBRC 103632, *M. phyllosphaerae* DSM 19779, *M. marchantiae* DSM 21328 (рис.2).

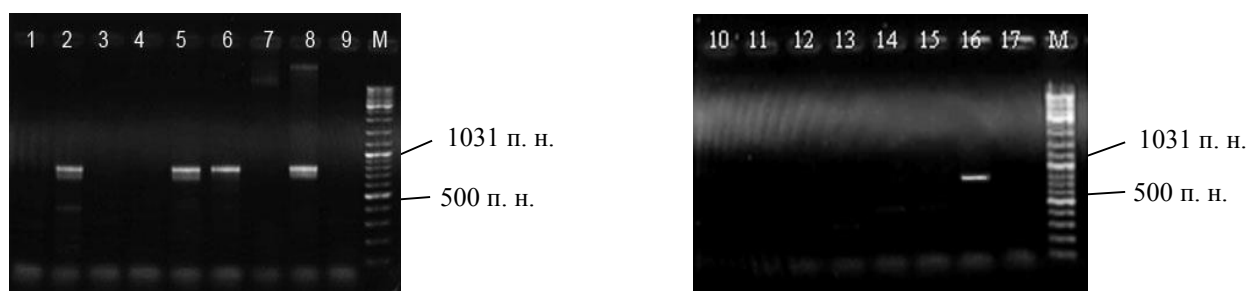


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с праймерами *acdS*-AF – *acdS*-AR. 1 – *Azospirillum brasilense* Sp7; 2 – *Bradyrhizobium japonicum* VKM В-1967; 3 – *Hansschlegelia plantiphila* S1; 4 – *Methylosinus trichosporium* OB3b; 5 – *Methylobacterium mesophilicum* JCM 2829; 6 – *Methylobacterium nodulans* ORS 2060; 7 – *Methylopila* sp. 1G; 8 – *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* VF 39; 9 – *Xanthobacter autotrophicus* ATCC 35674; 10 – *Methylobacterium suomiense* A20; 11 – *Methylobacterium thiocyanatum* JCM 10893; 12 – *Methylobacterium rhodesianum* JCM 10891; 13 – *Methylobacterium rhodinum* JCM 2811; 14 – *Methylobacterium organophilum* JCM 2833; 15 – *Methylobacterium zatmanii* JCM 10892; 16 – *Methylobacterium fujisawaense* O-31; 17 – *Methylobacterium aminovorans* JCM 2840; М – ДНК-маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix («Fermentas»).

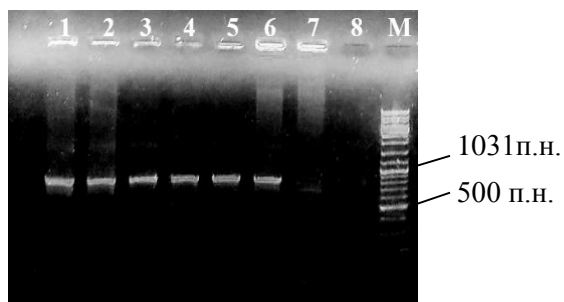


Рисунок 2. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с праймерами *acdS*-AF – *acdS*-AR. 1 – *Methylobacterium gregans* NBRC 103626; 2 – *Methylobacterium longum* DSM 23933; 3 – *Methylobacterium brachiatum* NBRC 103629, 4 – *Methylobacterium tardum* NBRC 103632, 5 – *Methylobacterium phyllosphaerae* DSM 19779, 6 – *Methylobacterium marchantiae* DSM 21328; 7 – *Methylobacterium isbiliense* DSM 17168, 8 – *Methylobacterium iners* DSM 19015, М – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

В ПЦР с праймерами *acdS*-BGF и *acdS*-BGR, разработанными с учетом последовательностей генов *acdS* β - и γ -протеобактерий, продукт, сходный по размеру со специфическим, обнаружен у *M. glycogenes*, *M. pratensis* F-31, *M. luteus* Mim, *M. gramineus* Lap (рис. 3). Однако в результате секвенирования этих продуктов выяснено, что это результат неспецифического связывания праймеров с ДНК. Таким образом, в реакциях с ДНК аэробных метиловобактерий, относящихся к β - и γ -*Proteobacteria*, ген *acdS* не был обнаружен.

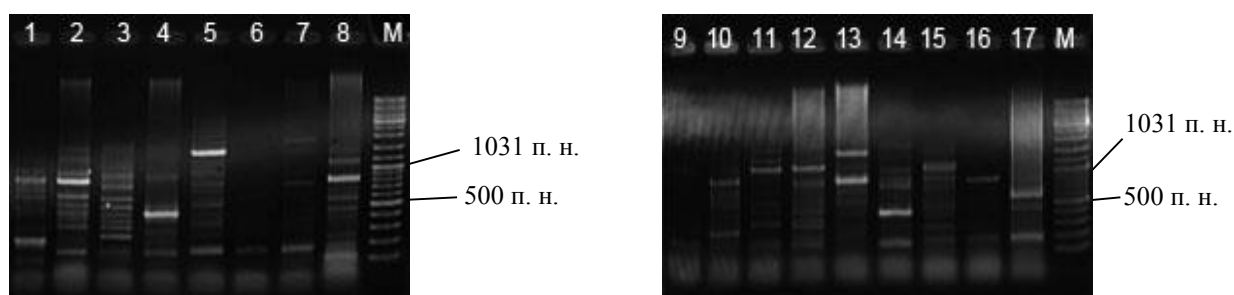


Рисунок 3. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с праймерами *acdS*-BGF – *acdS*-BGR. 1 – *Methylobacillus glycogenes* ТК 0113; 2 – *Methylobacillus pratensis* F31; 3 – *Methylomonas methanica* VKM B-2110; 4 – *Methylovorus glucosotrophus* 6B1; 5 – *Methylovorus mays* BV; 6 – *Methylophilus quaylei* VKM B-2338; 7 – *Methylophaga muralis* VKM B-2303; 8 – *Pseudomonas putida* ATCC 12633; 9 – *Methylophilus flavus* Ship, 10 – *Methylophilus luteus* Mim; 11 – *Methylophilus methylotrophus* AS1; 12 – *Methylobacillus arboreus* VKM B-2590; 13 – *Methylobacillus gramineus* VKM B-2590; 14 – *Methylovorus menthalis* VKM B-2663; 15 – *Delftia* sp. LP 1; 16 – *Methylopila musalis* VKM B-2646; 17 – *Methyloversatilis universalis* FAM5; М – ДНК-маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

С использованием пары праймеров *dcyD*-161F и *dcyD*-971R специфический продукт размером 810 п.н. обнаружен в реакциях с ДНК *M. suomiense* F 20; *M. thiocyanatum* JCM 10893; *M. rhodinum* JCM 2811; *M. rhodesianum* JCM 10891; *M. organophilum* JCM 2833; *M. zatmanii* JCM 10892; *M. aminovorans* JCM 2840; *M. trifolii* TA73, *M. gnaphalii* DSM 24027, а также ДНК штамма *M. extorquens* G10, служившего положительным контролем (рис. 4).

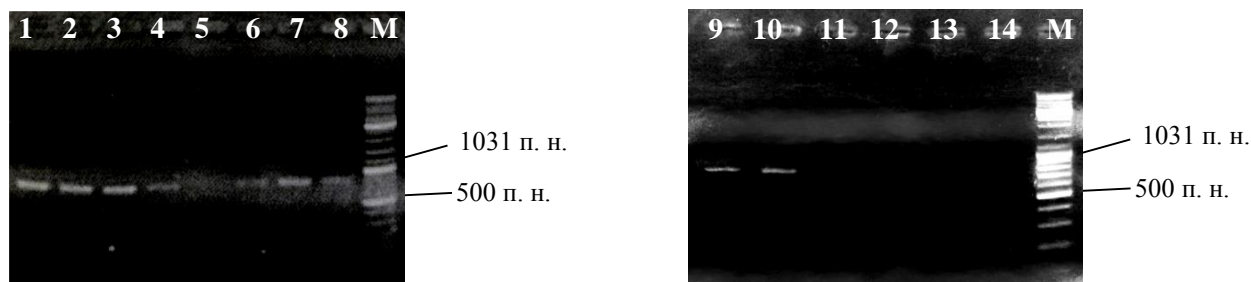


Рисунок 4. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с праймерами *dcyD*-161F–*dcyD*-971R. 1 – *Methylobacterium suomiense* F 20; 2 – *Methylobacterium thiocyanatum* JCM 10893; 3 – *Methylobacterium rhodinum* JCM 2811; 4 – *Methylobacterium rhodesianum* JCM 10891; 5 – *Methylobacterium organophilum* JCM 2833; 6 – *Methylobacterium zatmanii* JCM 10892; 7 – *Methylobacterium aminovorans* JCM 2840; 8 – *Methylobacterium extorquens* G10, 9 – *Methylobacterium trifolii* TA73, 10 – *Methylobacterium gnaphalii* DSM 24027, 11 – *Methylobacterium salsuginis* NCCB100140, 12 – *Methylobacterium haplocladii* DSM 24195, 13 – *Methylobacterium podarium* DSM 15083, 14 – *Methylobacterium brachythecii* DSM 24105, М – ДНК-маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

Все полученные ПЦР-продукты были секвенированы. Кроме того, был проведен анализ *in silico* имеющихся в GenBank геномных последовательностей метиловобактерий. Из 48 типовых штаммов различных видов рода *Methylobacterium* у 29 найдены и/или секвенированы гены *acdS* и *dcyD*. Из них у 18 штаммов обнаружен ген *acdS*, у 13 – *dcyD*, причем два вида обладают двумя генами одновременно.

2. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей АЦК-дезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз.

Аминокислотные последовательности АЦК-дезаминаз бактерий различного таксономического положения довольно консервативны и уровень их идентичности составляет более 60% для наиболее филогенетически удаленных последовательностей. В настоящий момент считают, что эволюция белка *AcdS* идет вертикально, и, хотя известны случаи горизонтального переноса, они довольно редки (Nascimento et al., 2014).

Аминокислотные последовательности АЦК-дезаминаз метиловобактерий проявляют очень высокий уровень идентичности между собой – 86-100%, что свидетельствует о высокой консервативности белка *AcdS* у представителей рода *Methylobacterium*. Однако, несмотря на это, можно выделить несколько филогенетических кластеров последовательностей белка *AcdS* метиловобактерий. Первую группу образуют белки *AcdS* из *M. nodulans* ORS2060 и *Methylobacterium* sp. 4-46, кластеризующиеся с АЦК-дезаминазами различных ризобий. Это неудивительно, поскольку штаммы ORS2060 и 4-46, несмотря на то, что принадлежат к роду *Methylobacterium*, очень близки по своим свойствам к ризобиям и являются настоящими клубеньковыми симбионтами бобовых растений (Sy et al., 2001). Тем не менее, согласно филогенетическому дереву, построенному по последовательностям гена 16S рРНК, эти виды обособлены в кластере с *M. isbiliense* (рис. 5 и 7). Вторую группу последовательностей белков составляют *AcdS* из *M. variabile*, *M. platani*, *M. aquaticum* и *M. tarhaniae*, которые также образуют единый кластер на дереве, построенном по гену 16S рРНК (рис. 5 и 7). В третью, весьма обширную группу, объединены последовательности *AcdS* близкородственных видов *M. fujisawaense*, *M. oryzae*, *M. phyllosphaerae*, *M. phyllostachyos*, *M. radiotolerans*, *M. longum*, *M. brachiatum*,

M. mesophilicum, *M. tardum*, *M. pseudosasicola* (рис. 5 и 7). Исключением из этой группы можно считать *M. gregans*, который, несмотря на присутствие гена *acdS*, похожего на таковой у представителей этой группы, филогенетически достаточно удален от нее. На филогенетическом дереве АЦК-дезаминаз видно, что аминокислотные последовательности ферментов метиловобактерий образуют совместный кластер с белками других α -протеобактерий и отделены от последовательностей АЦК-дезаминаз β - и γ -протеобактерий (рис. 5).

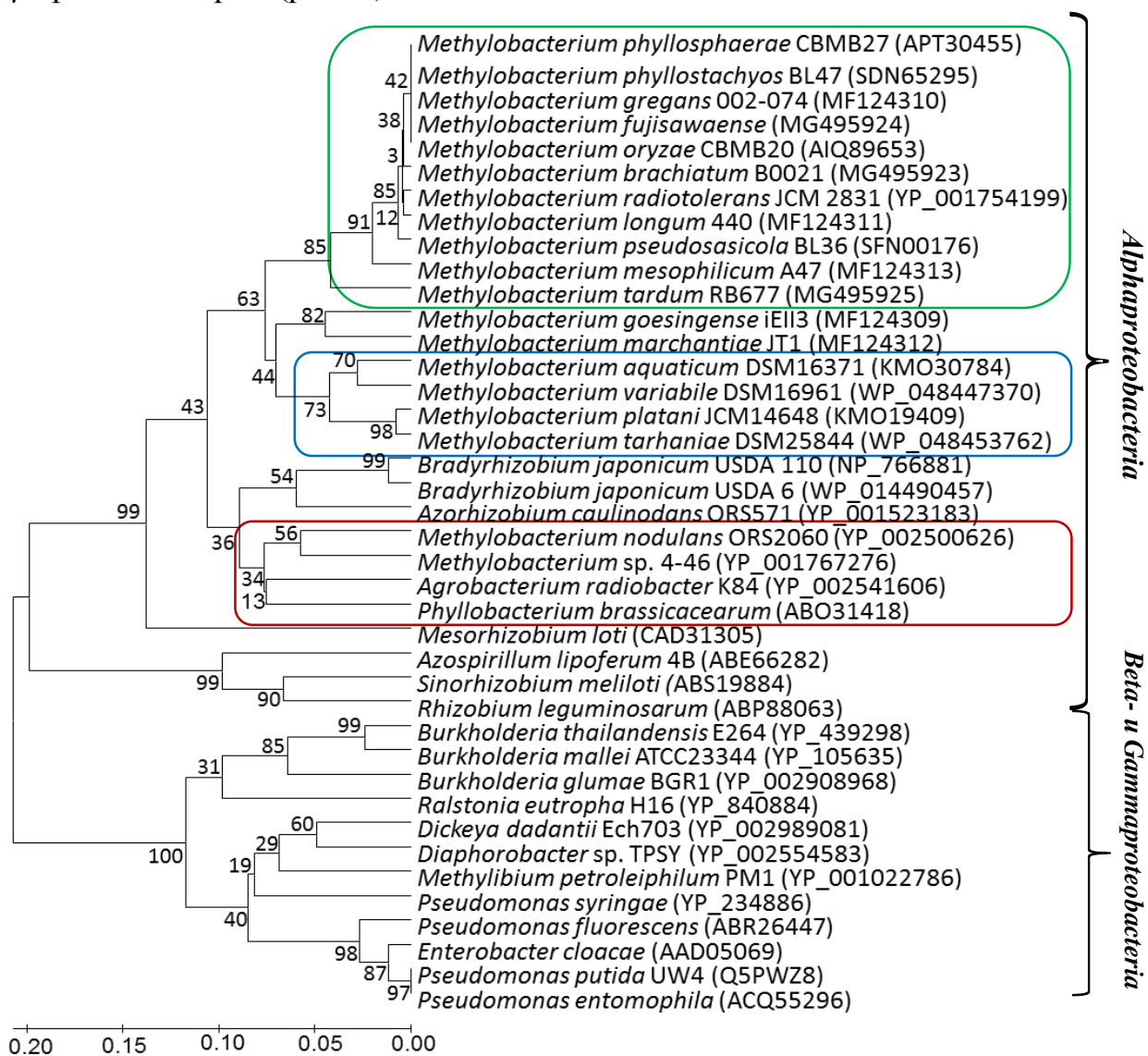


Рисунок 5. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей *AcdS* различных бактерий.

Анализ последовательностей D-цистеиндисульфогидраз метиловобактерий показал, что все последовательности метиловобактерий образуют единый кластер на филогенетическом дереве (рис. 6) и характеризуются довольно высоким уровнем идентичности (>65%). Уровень идентичности аминокислотных последовательностей с ферментом из *E. coli*, который филогенетически удален, составляет менее 44%.

На филогенетическом дереве D-цистеиндисульфогидраз можно выделить большой кластер, объединяющий белки представителей рода *Methylobacterium*, образующих также отдельную группу на дереве, построенном по последовательности гена 16S рНК (рис. 7). Эту группу составляют *M. extorquens*, *M. rhodesianum*,

M. aminovorans, *M. thiocyanatum*, *M. populi*, *M. zatmanii*, *M. suomiense*, *M. salsuginis*. Кроме того, белки из этой группы характеризуются очень высоким уровнем идентичности аминокислотных последовательностей (83-100%). Интересно, что два близкородственных вида *M. phyllostachyos* и *M. pseudosasicola*, выделенные из филлосферы бамбука и обладающие похожими белками DcyD, имеют в своих геномах ген *acdS*.

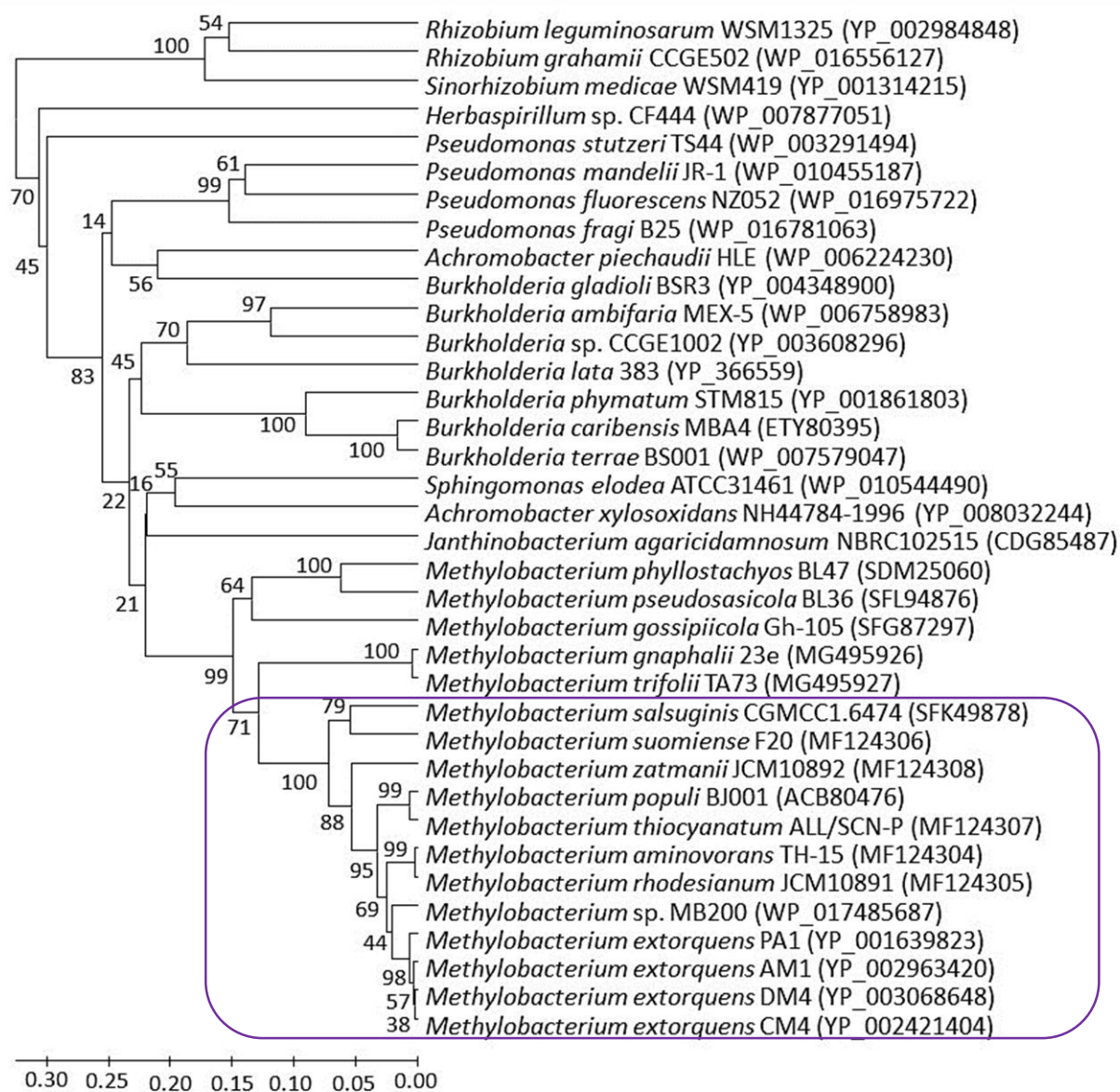


Рисунок 6. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей DcyD различных бактерий.

Таким образом, анализируя распределение генов *acdS* и *dcyD* на филогенетическом дереве гена 16S рРНК, можно выделить три большие группы видов, которые составляют более половины известных видов *Methylobacterium*. Группа, которую можно назвать «*M. nodulans*» для большинства видов которой секвенированы геномы, содержит в них исключительно ген *acdS*. Группа «*M. extorquens*», в геномах которой обнаружены гены *dcyD*, и группа «*M. radiotolerans*», представители которой содержат, в основном, гены *acdS*, однако в геномах двух видов обнаружен также и ген *dcyD* (рис. 7). Следует отметить, что совсем недавно появилось предложение реклассифицировать виды, обозначенные здесь как группа «*M. extorquens*», в новый род *Methylorubrum* (Green, Ardley 2018).

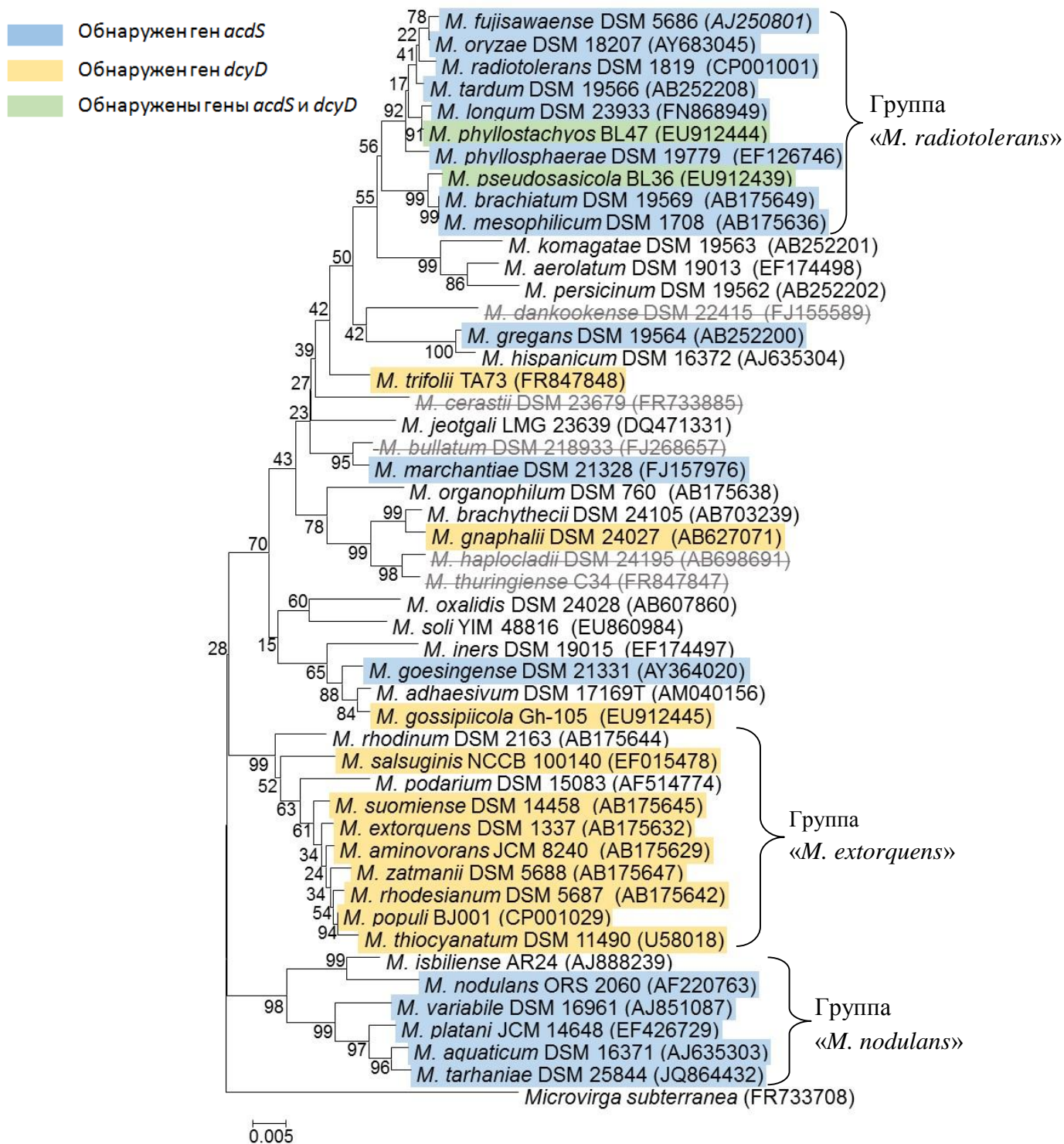


Рисунок 7. Распределение генов АЦК-деаминазы (*acdS*) и D-цистеиндесульфогидазы (*dcyD*) у представителей рода *Methylobacterium*. Филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей гена 16S рРНК. Зачеркивание – наличие генов не определяли.

Несмотря на то, что у представителей 5 видов не проводили поиск генов *acdS* и *dcyD*, очевидно, что эти гены достаточно широко распространены среди представителей рода *Methylobacterium*. В то же время, существуют группы близкородственных видов, у которых эти гены отсутствуют. На это указывает, например, отсутствие исследуемых генов в предварительном геноме *M. komagatae*, у которого и ближайших его родственников методом ПЦР гены также не были обнаружены. С другой стороны, нам удалось амплифицировать и секвенировать ген

dcyD у *M. thiocyanatum*, для которого известна неполная геномная последовательность, но изученный ген пока отсутствует.

В целом, наличие гена АЦК-дезаминазы характерно для бактерий, ассоциированных с растениями, поскольку образование АЦК доказано только для растений (Van de Poel, Van Der Straeten 2014). Бактерии, обладающие АЦК-дезаминазой, могут использовать АЦК в качестве источника азота и углерода. Кроме того, деградируя АЦК, бактерии снижают уровень этилена в растениях, тем самым повышая их устойчивость к различным видам стресса (Glick, 2014). При этом метиловобактерии-фитосимбионты способны поглощать часть триптофана, выделяемого растениями, превращая его в индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), которая затем секретируется бактерией и потребляется растением (Glick, 2014; Федоров с соавт., 2010). Повышение концентрации ИУК способствует росту растений и в тоже время активирует транскрипцию фермента АЦК-синтазы, что приводит к увеличению уровня АЦК и, следовательно, этилена. Таким образом, бактерии, синтезирующие ИУК из растительного триптофана, могут способствовать росту растений и затем ингибировать его (посредством воздействия произведенного в результате этилена). Однако бактерии, которые содержат АЦК-дезаминазу, уменьшают уровень вновь образованного АЦК в растениях, что позволяет бактериальной ИУК стимулировать рост растений без значительного ингибирования (Olanrewaju et al., 2017). Наличие АЦК-дезаминазы у растений дополнительно свидетельствует о важности регуляции внутриклеточной концентрации АЦК (McDonnell et al., 2009).

Филогенетический анализ белков AcdS и гена 16S рРНК выявил, что, как минимум, две группы *Methylobacterium* – «*M. nodulans*» и «*M. radiotolerans*» разделились и унаследовали от общего предка ген АЦК-дезаминазы, что коррелирует с филогенией по гену 16S рРНК. Наличие генов *acdS* у двух достаточно обширных групп метиловобактерий может свидетельствовать об эволюционной адаптации к их тесной ассоциации с растениями.

Нами обнаружено, что за исключением двух видов *M. phyllostachyos* и *M. pseudosasicola*, в геномах некоторых метиловобактерий присутствует ген D-цистеиндесульфогидразы, а ген АЦК-дезаминазы отсутствует. Несмотря на то, что D-цистеиндесульфогидраза обнаружена у многих растений, физиологическая роль, функции и метаболические пути биосинтеза D-цистеина неизвестны (Parenbrock et al., 2007). В отличие от растений активность D-цистеиндесульфогидразы позволяет бактериям использовать эту аминокислоту в качестве источника серы и углерода, а также бороться с цитотоксичным эффектом D-цистеина (Soutuogina et al., 2001). Пока не ясна роль бактериальных D-цистеиндесульфогидраз в растительно-микробных ассоциациях, однако, очевидно, что катализируемая ферментом реакция является источником сероводорода. В последнее десятилетие во многих работах показана значительная роль сероводорода в стимуляции роста и развития, а также его участие в защите растений от различных видов стрессов (Guo et al., 2016; Zhang et al., 2011).

Важно отметить, что активность АЦК-дезаминазы и эмиссия сероводорода приводят к одинаковому эффекту – повышению устойчивости растений к стрессу. Поэтому, вероятно, бактерии приспособились использовать два близкородственных фермента, АЦК-дезаминазу и D-цистеиндесульфогидразу, для адаптации к жизни в ассоциации с растениями. Можно предположить, что виды, обладающие АЦК-дезаминазной активностью, теснее связаны с растениями, проникая внутрь тканей

и используя помимо метанола доступные им метаболиты, такие как аминокислоты. Напротив, виды, несущие ген D-цистеиндесульфогидразы, обитают на поверхности растений и в основном потребляют метанол и другие C₁-соединения. Однако доказательство этого предположения требует масштабных исследований колонизации органов и тканей растений различными метиловыми бактериями и анализа наличия у них генов утилизации органических кислот, сахаров, аминокислот.

3. Клонирование и характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amuocolatopsis methanolica* 239.

Для более детального изучения биохимических свойств АЦК-дезаминаз были выбраны два вида, обитатели ризосферы – *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amuocolatopsis methanolica* 239. *M. nodulans* – единственный клубеньковый симбионт среди представителей рода *Methylobacterium*, образующий клубеньки у бобовых растений родов *Crotalaria* и *Lotononis* (Sy et al., 2001). Факультативно метилотрофный актиномицет *A. methanolica* способен использовать метанол в качестве ростового субстрата через рибулозомонофосфатный путь (De Voer et al., 1990). Актиномицеты являются типичными почвенными бактериями, многие из них стимулируют развитие растений обладая АЦК-дезаминазной активностью и синтезируя ауксины (Nascimento et al. 2014).

Анализ геномов *M. nodulans* и *A. methanolica* 239 выявил присутствие генов Mnod_5479 и AMETH_2787 соответственно, проявляющих наибольшее сходство с бактериальными АЦК-дезаминазами. Выявлено, что АЦК-дезаминазы представителей филума *Actinobacteria* образуют отдельный филогенетический кластер. AcdS из *A. methanolica* проявлял наибольшее сходство (83% идентичности) с AcdS из *Streptomyces acidiscabies* 84–104 (рис. 8).

ОРС генов Mnod_5479 и AMETH_2787 клонировали в экспрессионном векторе рНУЕ. Гетерологичной экспрессией в клетках *E. coli* с последующей металл-хелатной хроматографией получены электрофоретически гомогенные препараты рекомбинантных белков AcdS, слитых на N-конце с убиквитином и 6 гистидиновыми остатками (рис. 9 а и б). После протеолиза были получены ферменты AcdS с аминокислотной последовательностью, полностью соответствующей закодированной в геномах *M. nodulans* и *A. methanolica*. В обоих случаях молекулярная масса субъединицы AcdS составляла примерно 36 кДа, что соответствовало теоретически рассчитанной (рис. 9 а и б).

Методом нативного электрофореза в полиакриламидном геле установлено, что молекулярная масса активного холофермента AcdS из обоих видов составляет 117 кДа, что больше массы гомотримера (108 кДа), но значительно меньше, чем у гомотетрамера (144 кДа) (рис. 10 а и б). Однако методом гель-фильтрации доказано, что молекулярная масса холоферментов составляет 144 кДа, что соответствует массе гомотетрамера.

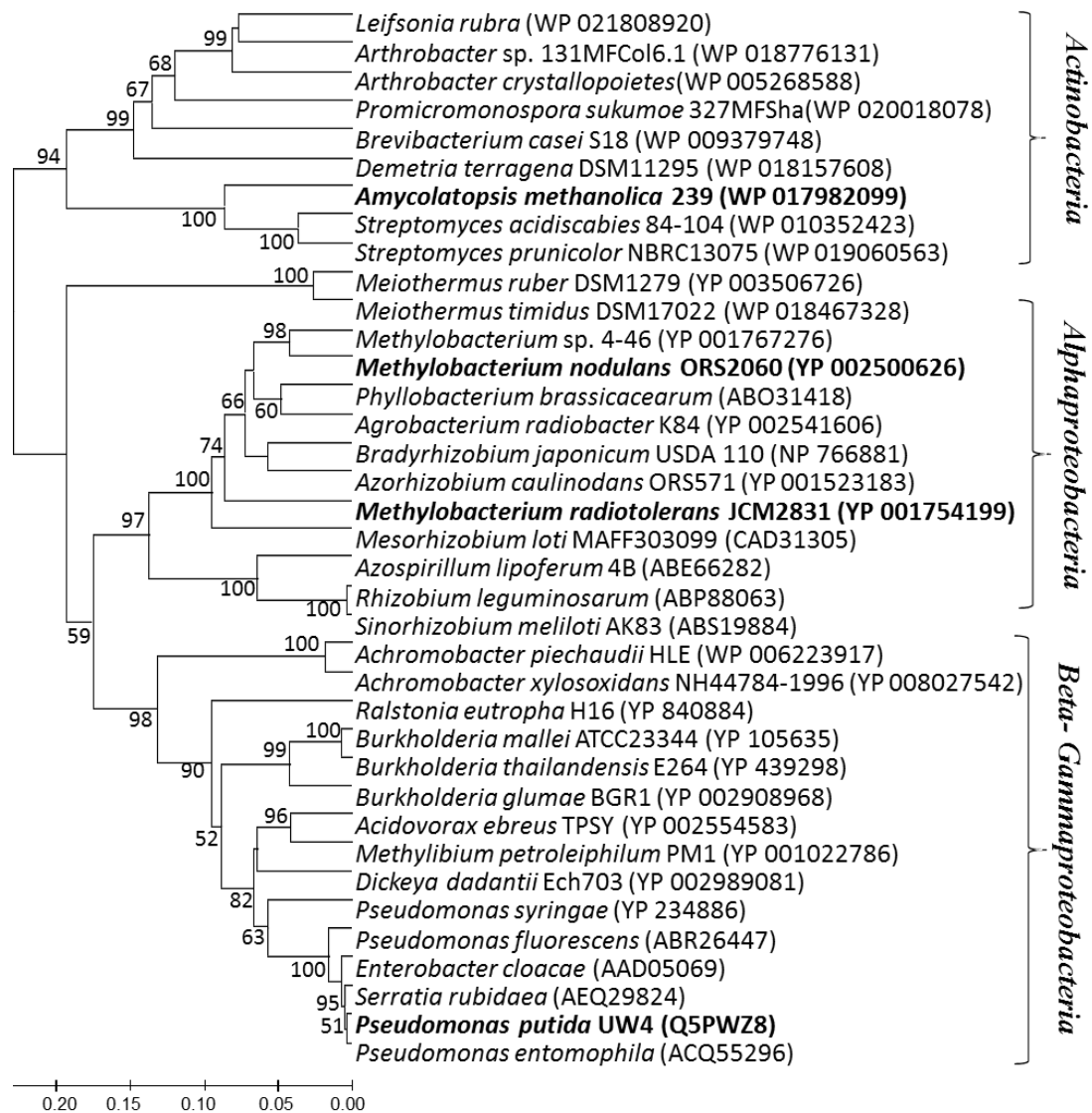


Рисунок 8. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей AcdS. Охарактеризованные ферменты выделены жирным шрифтом.

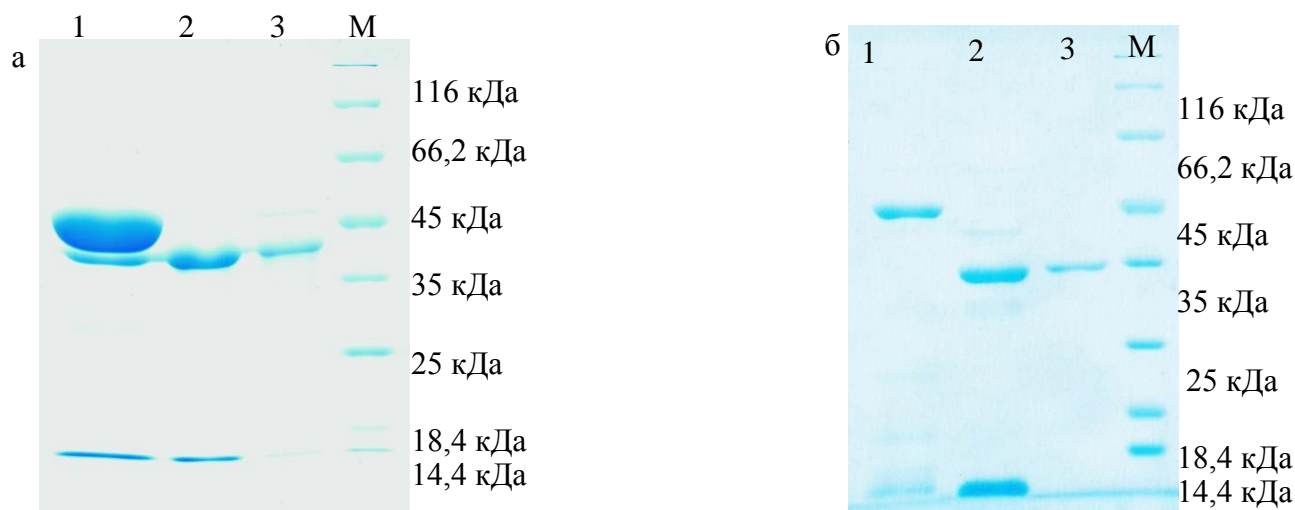


Рисунок 9. ДСН-ПААГЭ препаратов рекомбинантных белков AcдS **а** – AcдS из *M. nodulans* ORS2060, **б** – AcдS из *A. methanolica* 239, после очистки при помощи металл-хелатной хроматографии (1), после обработки деубиквитинирующей протеазой Usp2-cc (2), очищенного процессированного белка (3) и маркеров молекулярной массы (M, «Хеликон», Россия).

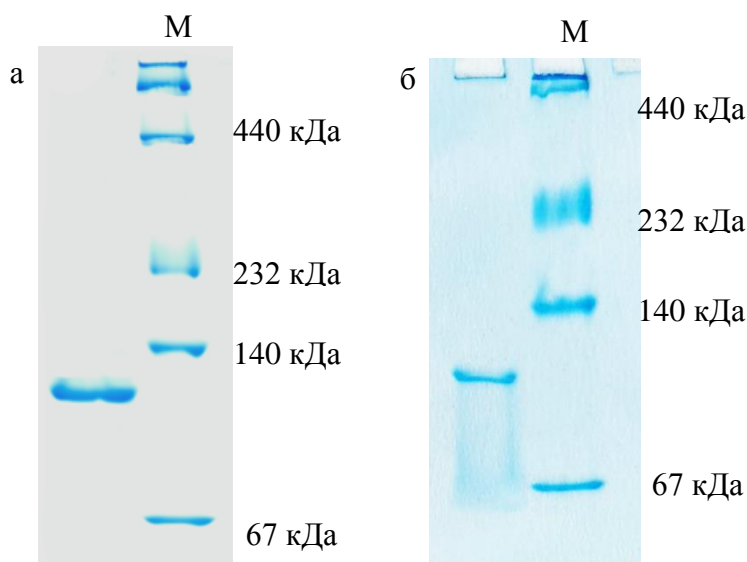


Рисунок. 10. ПААГ-электрофорез препаратов AcdS в нативных условиях. **а** – препарат AcdS из *M. nodulans*, **б** – препарат AcdS из *A. methanolica* и маркеры молекулярной массы (М, «Pharmacia», Швеция).

При дезаминировании АЦК оба фермента подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен. Значение K_m фермента из *A. methanolica* составило $1,7 \pm 0,2$ мМ, что практически соответствует этому значению для АЦК-дезаминазы из *M. radiotolerans* JCM 2831 ($K_m = 1,8 \pm 0,3$ мМ) (табл. 1). Для АЦК-дезаминазы из *M. nodulans* это значение самое низкое ($K_m = 0,80 \pm 0,04$ мМ), следовательно, данный фермент проявляет наиболее высокую субстратную специфичность к АЦК среди всех охарактеризованных ферментов. Каталитическая константа фермента из *A. methanolica* ($k_{cat} = 5,1$ мин⁻¹) значительно ниже, чем у всех ранее охарактеризованных ферментов, в то время как каталитическая константа фермента из *M. nodulans* ($k_{cat} = 111,8$ мин⁻¹) более чем в 2 раза превышает это значение для фермента из *M. radiotolerans* ($k_{cat} = 53,3$ мин⁻¹). (табл. 1).

Таблица 1.

Сравнительная характеристика бактериальных 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз.

Параметры	<i>A. methanolica</i> 239	<i>M. nodulans</i> ORS2060	<i>M. radiotolerans</i> JCM2831	<i>Pseudomonas putida</i> UW4	<i>Cyberlindera saturnus</i>
K_m , мМ	$1,7 \pm 0,2$	$0,80 \pm 0,04$	$1,8 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,2$	2,6
k_{cat} , мин ⁻¹	$5,1 \pm 0,2$	$111,8 \pm 0,2$	$65,8 \pm 2,8$	146 ± 5	-
k_{cat}/K_m	3	139,8	36,5	42,9	-
рН-оптимум	8,5	8,0	8,0	8,0	9,0
Температурный оптимум, °С	55	50	45	37	-
Молекулярная масса	Гомотетрамер 144 кДа	Гомотетрамер 144 кДа	Гомотетрамер 144 кДа	Гомотетрамер 168 кДа	Мономер 69 кДа
Кофактор	П и р и д о к с а л ь ф о с ф а т				
Ссылка	Данная работа	Данная работа	(Fedorov et al., 2013)	(Hontzeas et al., 2004)	(Honma, Shimomura, 1978)

Такие различия в кинетических характеристиках могут быть связаны с различными местами обитания этих бактерий: *M. nodulans* является клубеньковым фитосимбионтом, имеющим большой доступ к АЦК, тогда как *M. radiotolerans* – филлосферная бактерия, а *A. methanolica* – свободноживущая почвенная бактерия, по-видимому, не связанная с поверхностью растений непосредственно. Помимо этого, есть свидетельства о влиянии АЦК-деаминазной активности на нодуляцию *Sinorhizobium meliloti*, поскольку, в опытах с трансконоьюгантами, несущими ген *acdS* в составе плазмиды, показано увеличение клубеньков на корнях люцерны на 40% (Ma et al., 2004).

4. Клонирование гена и очистка белка-регулятора экспрессии АЦК-деаминазы из *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831.

У всех штаммов рода *Methylobacterium*, обладающих структурным геном АЦК-деаминазы, на расстоянии примерно 230 п.н. от стартового кодона гена *acdS* находится ОРС, расположенная дивергентно по отношению к гену *acdS* (рис. 11). У *M. radiotolerans* эта ОРС размером 486 п.н. кодирует белок, состоящий из 161 аминокислотного остатка, с рассчитанной молекулярной массой 17,8 кДа. Сравнение этой аминокислотной последовательности, закодированной в ОРС, с последовательностями белков из базы данных GenBank показало, что белок проявляет сходство с известными транскрипционными регуляторами Lrp-семейства (Leucine responsive protein).

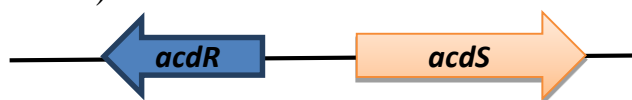


Рисунок 11. Карта генов *acdS* и *acdR* *M. radiotolerans*.

Нами предположено, что обнаруженная у *M. radiotolerans* полноразмерная ОРС является геном *acdR*, кодирующим белок-регулятор транскрипции гена АЦК-деаминазы. Недавние исследования показали, что AcdR является распространённым вероятным регулятором экспрессии АЦК-деаминазы у протеобактерий, так как в результате анализа полных геномных последовательностей в 166 из 261 случаях гены *acdR* и *acdS* обнаружены одновременно (Nascimento, et al., 2014). С другой стороны, по-видимому, существуют и альтернативные механизмы регуляции *acdS* поскольку, по крайней мере, у 17 полностью секвенированных видов, при наличии гена *acdS*, ген *acdR* обнаружить не удалось (Nascimento et al., 2014).

Для изучения функций регуляторного белка ген *acdR* *M. radiotolerans* был клонирован в экспрессионном векторе рНУЕ. При помощи гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* и последующей металл-хелатной хроматографии получили электрофоретически гомогенный препарат рекомбинантного белка AcdR, несущего на N-конце убиквитин и 6 гистидиновых остатков. После обработки деубиквитирующей протеазой получен препарат регуляторного белка AcdR с аминокислотной последовательностью, соответствующей закодированной в геноме *M. radiotolerans*. Молекулярная масса субъединицы AcdR составила примерно 18 кДа, что совпало с теоретически рассчитанной (рис. 12).

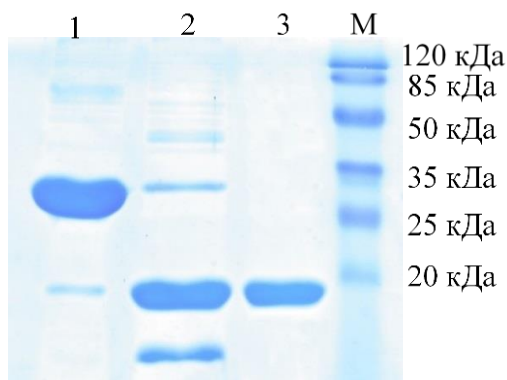


Рисунок 12. ДСН-ПААГЭ препарата рекомбинантного белка AcdR из *M. radiotolerans* (1) после обработки деубиквитирующей протеазой Usp2-cc (2), очищенного процессированного белка (3) и маркеров молекулярной массы (M, «Хеликон», Россия).

5. Условия связывания AcdR с ДНК-фрагментом.

С использованием ^{32}P – меченых праймеров Mrad-acdR-68r и P-acdS-R, комплементарных фрагментам ДНК, находящимся на расстоянии, соответственно, 278-298 п. н. и 124-142 п. н. выше стартового кодона гена *acdS*, получили ПЦР-фрагмент, содержащий регуляторный участок гена *acdS*. Установлено, что добавление рекомбинантного белка AcdR приводит к уменьшению электрофоретической подвижности специфического ПЦР-фрагмента в присутствии гетерологичной ДНК и АЦК. Для связывания 1 пкмоль ДНК *in vitro* требуется от 23 пкмоль регуляторного белка при максимальном количестве АЦК 1000 нмоль (рис. 13).

АЦК (нмоль)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
AcdR из <i>M. radiotolerans</i> (пкмоль)	0	370	185	93	46	23	12	6	3
Меченый фрагмент ДНК (пкмоль)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

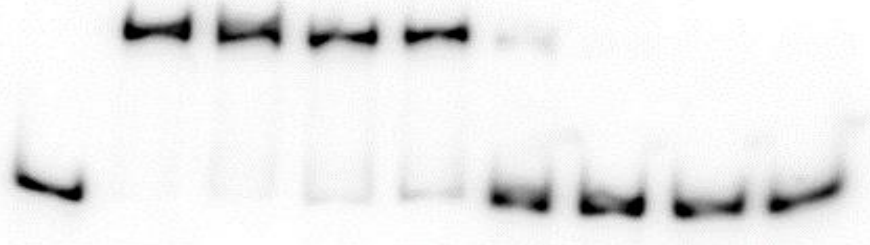


Рисунок 13. Анализ комплексов AcdR-ДНК методом задержки в геле.

Исследование зависимости связывания AcdR от концентрации АЦК показало, что связывание 1 пкмоль ДНК с 23 пкмоль AcdR начинается в присутствии не менее чем 12 нмоль АЦК (рис. 14). Очевидно, АЦК является низкомолекулярным эффектором белка-регулятора, связывание с которым вызывает конформационные изменения в молекуле белка, в результате чего увеличивается аффинность AcdR к операторному участку ДНК. Следует обратить внимание на неполное связывание при низких концентрациях АЦК, свидетельствующее о том, что AcdR является мультимерным белком, подобно Lrp *E. coli* и, следовательно, связывание AcdR с ДНК происходит с кооперативным эффектом. По-видимому, постепенное заполнение сайтов связывания эффектором в молекуле регулятора приводит к увеличению его аффинности к операторному участку ДНК.

АЦК (нмоль)	1000	0	0,4	1,3	4	12	37	111	333	1000
AcdR из <i>M. radiotolerans</i> (пкмоль)	0	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Меченый фрагмент ДНК (пкмоль)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

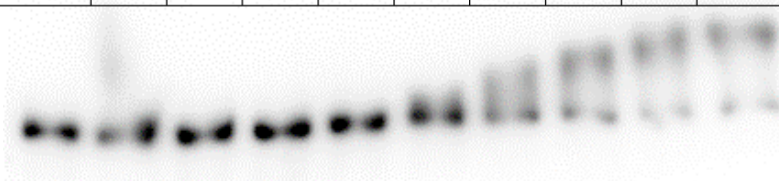


Рисунок 14. Анализ образования комплексов AcdR-ДНК в зависимости от концентрации 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата методом задержки в геле.

Для определения обратимости связывания белка AcdR с ДНК к образованному после 15 минут инкубации комплексу AcdR-ДНК добавляли немеченый ПЦР-продукт. Методом задержки в геле показано, что рекомбинантный белок AcdR *M. radiotolerans* специфично и обратимо связывается с регуляторной областью структурного гена *acdS*. Образованный комплекс ДНК-белок характеризуется довольно высокой стабильностью, поскольку он не разрушался в течение 30 минут, а время полураспада составило 1 час. (рис. 15).

АЦК (пкмоль)	0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
AcdR из <i>M. radiotolerans</i> (пкмоль)	39	39	39	39	39	39	39	39
Меченый фрагмент ДНК (пкмоль)	1	1	1	1	1	1	1	1
Немеченый фрагмент ДНК (пкмоль)	0	0	10	10	10	10	10	10
Время (час)	0,25	0,25	0,5	1	2	4	6	12



Рисунок 15. Анализ стабильности комплексов AcdR-ДНК методом задержки в геле.

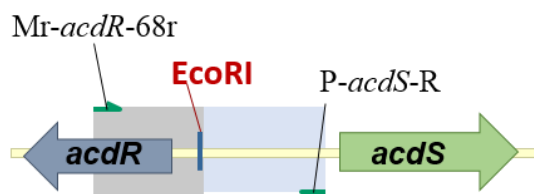


Рисунок 16. Карта локуса *acdS-acdR* *M. radiotolerans* с указанием праймеров и сайта рестрикции *EcoRI*.

ПЦР-фрагменты, содержащие регуляторный участок гена *acdS* и меченые по 5'-концу верхней или нижней цепи обработали рестриктазой *EcoRI* (рис. 16). Показано, что после рестрикции ПЦР-фрагмента AcdR полностью утрачивает способность связываться с фрагментами ДНК, что указывает на присутствие в этой области сайта связывания AcdR (рис. 17).

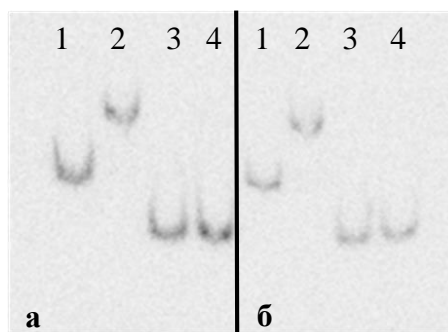


Рисунок 17. Эксперимент: **а** – с ПЦР-фрагментом, ^{32}P – меченым по верхней цепи, **б** – с ПЦР-фрагментом, ^{32}P – меченым по нижней цепи. 1 – контроль, 2. ПЦР-фрагмент, связанный белком *AcdR* *M. radiotolerans*, 3. после обработки фрагмента рестриктазой *EcoRI*, 4. ПЦР-фрагмент, обработанный рестриктазой *EcoRI* после добавления *AcdR*, связывание не происходит.

6. Получение и характеристика мутантов *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*.

При помощи гомологичной рекомбинации были получены мутанты *M. radiotolerans* с делециями в гене *acdS* и *acdR*. Мутантов комплементировали как исходным вектором p7A-29, служившим отрицательным контролем, так и плазмидами, несущими нокаутированный ген (p7A-36 для гена *acdS* и p7A-136 для гена *acdR*). Мутантов и комплементированных мутантов тестировали на наличие АЦК-дезаминазной активности при росте либо в присутствии, либо без индуктора – 2-аминоизобутирата, более дешевого аналога АЦК (рис. 18).

Мутанты *M. radiotolerans* Δ *acdS* и Δ *acdR* не обладали активностью АЦК-дезаминазы как с индуктором, так и без него, в отличие от исходного штамма, в котором активность фермента проявлялась в присутствии индуктора. Комплементированные исходным вектором мутанты Δ *acdS*/p7A-29 и Δ *acdR*/p7A-29 не обладали активностью АЦК-дезаминазы, аналогично бесплазмидным мутантам. Комплементированный мутант Δ *acdR*/p7A-136 в присутствии индуктора проявлял активность АЦК-дезаминазы на уровне штамма дикого типа, однако, в отсутствие индуктора, в отличие от исходного штамма JCM2831, также наблюдали активность фермента. Это связано, по-видимому, с избыточной концентрацией регуляторного белка в клетках комплементированного штамма, что облегчает инициацию транскрипции с промотора *acdS* даже в отсутствие индуктора. Комплементированный мутант Δ *acdS*/p7A-36 проявлял очень высокую ферментативную активность независимо от индуктора, так как ген *acdS* в нём находится под контролем сильного конститутивного промотора метанолдегидрогеназы *mxaF* (табл. 2 и рис. 18).

Таблица 2. Значения активности АЦК-дезаминазы нмоль/мин/мг белка (\pm стандартное отклонение) у дикого штамма, мутантов и комплементированных мутантов *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*.

	JCM2831	Δ <i>acdS</i>	Δ <i>acdR</i>	Δ <i>acdS</i> / p7A-29	Δ <i>acdR</i> / p7A-29	Δ <i>acdS</i> / p7A-36	Δ <i>acdR</i> / p7A-136
С индукцией	0,56 (\pm 0,7)	0,11 (\pm 0,4)	0,15 (\pm 0,02)	0,07 (\pm 0,03)	0,05 (\pm 0,06)	3,1 (\pm 0,01)	0,6 (\pm 0,08)
Без индукции	0,13 (\pm 0,05)	0,07 (\pm 0,02)	0,09 (\pm 0,02)	0,06 (\pm 0,01)	0,011 (\pm 0,03)	2,8 (\pm 0,07)	0,31 (\pm 0,08)

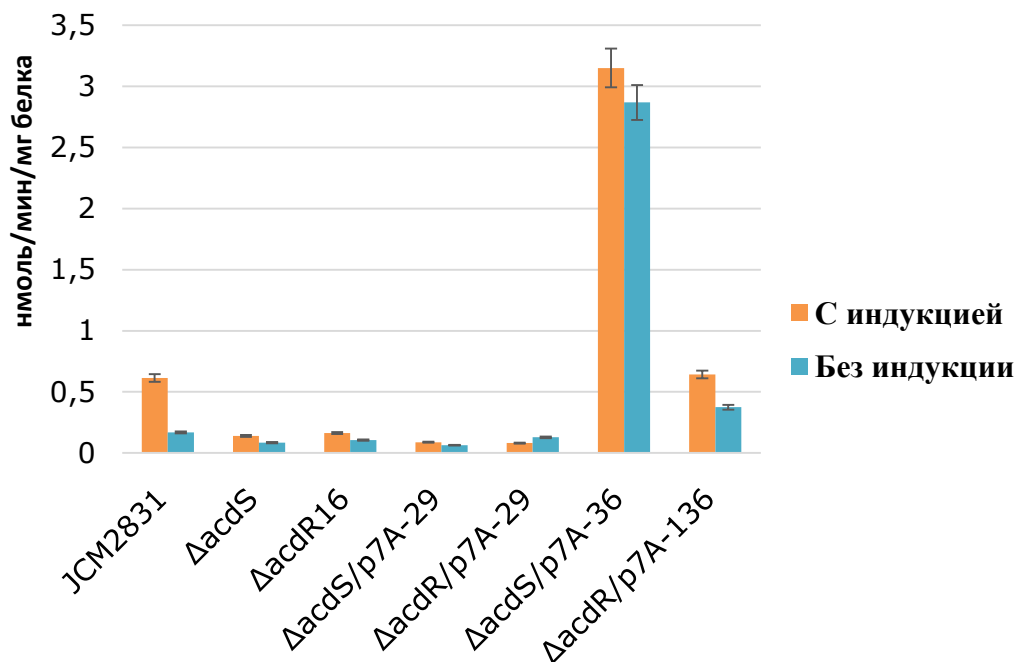


Рисунок 18. Определение активности AcdS у дикого штамма, мутантов и комплементированных мутантов *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*.

7. Определение функциональной активности AcdR в клетках *E. coli*.

Для исследования функциональной активности AcdR использовали модифицированный метод определения промоторных областей (Novakova et al., 1998; Rezuchova, Kormanec, 2001). Ген *acdR* *M. radiotolerans* клонировали в плазмиде pAC5mut2 под контролем ИПТГ-индуцибельного промотора P_{trc} . Промоторную область гена *acdS* *M. radiotolerans* клонировали в плазмиде pSB40N, совместимой с pAC5mut2 и несущей *lacZα* в качестве репортерного гена. Этими векторами трансформировали клетки *E. coli* XL1-Blue. В качестве контроля использовали трансформанты, содержащие плазмиды pSB40N:*PacdS* и pAC5mut2 (рис. 19).

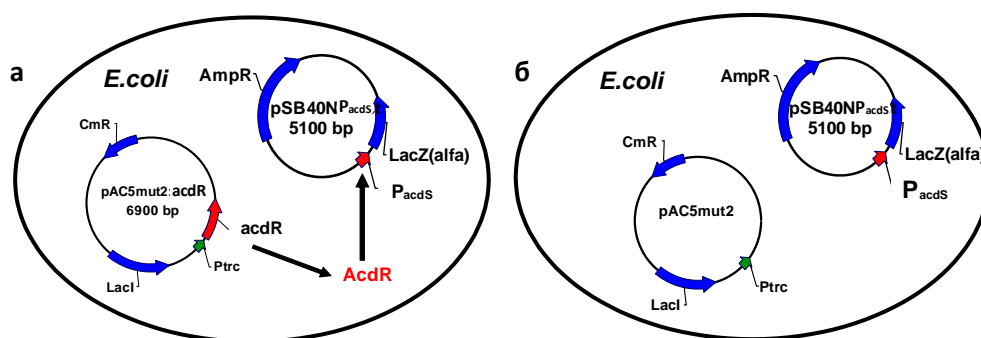


Рисунок 19. Схема эксперимента по определению функциональной активности AcdR *M. radiotolerans*, **а** – эксперимент, **б** – контроль.

Обнаружено, что при росте на среде LB в присутствии хромогенного красителя X-gal клетки не окрашивались в синий цвет (рис. 20 а, б). Это указывает на то, что ген *lacZα* не транскрибировался с промоторной области гена *acdS* РНК-полимеразой *E. coli*.

Добавление в среду ИПТГ привело к появлению окраски у клеток *E. coli* XL1-Blue, содержащих векторы pAC5mut2: *acdR* и pSB40N:*PacdS* (рис. 20, в). Это объясняется тем, что ИПТГ индуцирует экспрессию гена *acdR*, продукт которого

связывается с последовательностью промотора *acdS* гена *M. radiotolerans*, что приводит к активации транскрипции гена *lacZα*. Кроме того, клетки окрашивались только при росте на среде с добавлением нециклического аналога АЦК – 2-аминоизобутирата.

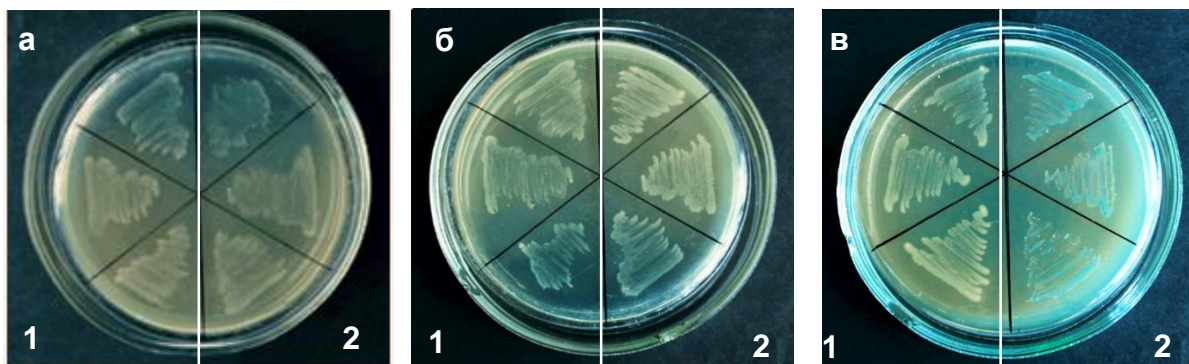


Рисунок 20. Клетки *E. coli* XL1, содержащие плазмиды pAC5mut2/pSB40N:*P_{acdS}* (1) и AC5mut2:*acdR*/pSB40N:*P_{acdS}* (2), в присутствии X-gal (а), в присутствии X-gal и 2-аминоизобутирата (б), X-gal/ИПТГ и 2-аминоизобутирата (в).

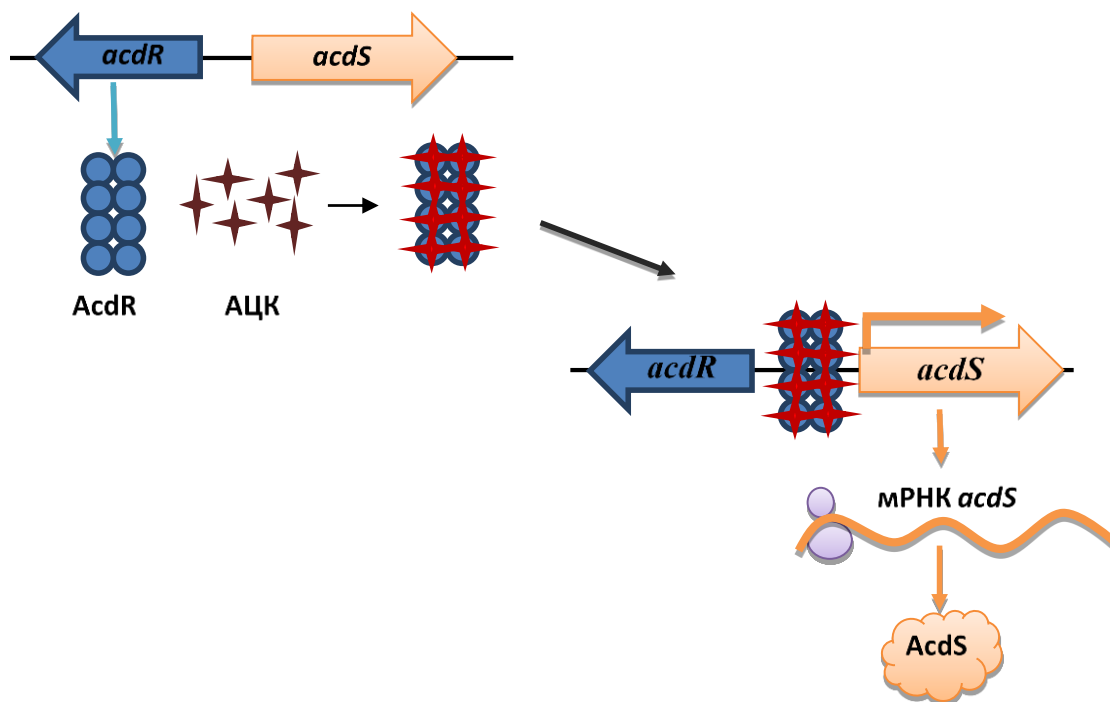


Рисунок 21. Гипотетическая модель регуляции транскрипции *acdS* у *M. radiotolerans*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что регуляторный белок AcdR *M. radiotolerans* является активатором транскрипции гена *acdS* в присутствии индукторов (АЦК или 2-аминоизобутирата). На рисунке 21 показана модель транскрипционной регуляции гена *acdS*, заметно отличающаяся от изученной к настоящему моменту регуляции транскрипции *acdS* у *P. putida* UW4 (Cheng et al., 2008).

Основное отличие предложенной модели регуляции транскрипции АЦК-деаминазы от ранее исследованной в том, что AcdR у *M. radiotolerans*, по-видимому, является единственным регуляторным белком, участвующим в связывании промотора *acdS* и его активации. Напротив, у *P. putida* UW4 два белка AcdR и AcdB координированно регулируют экспрессию гена АЦК-деаминазы. Несмотря на то, что показано, что AcdR и AcdB связываются с операторным участком гена *acdS* *P. putida*,

точные сайты связывания этих белков неизвестны, поэтому остаются неясными детали регуляции этого гена у псевдомонад. Интересно, что у псевдомонад АЦК не влияет на связывание AcdR с ДНК, тогда как этот комплекс диссоциирует в присутствии лейцина. AcdB, принадлежащий к группе фосфодиэстераз, напротив, связывается исключительно при наличии АЦК в реакционной смеси, а добавление лейцина не приводит к распаду образовавшегося AcdB-ДНК. Однако в присутствии лейцина комплекс AcdR-AcdB-ДНК разрушается, останавливая транскрипцию гена, кодирующего АЦК-дезаминазу (Cheng et al. 2008).

В случае регуляции транскрипции гена *acdS* *M. radiotolerans* нами установлено, что белок AcdR, в присутствии АЦК, по-видимому, является достаточным для активации транскрипции *acdS*. Кроме того, показано, что активность АЦК-дезаминазы у нокаут-мутантов по гену *acdR* утрачивалась, полностью восстанавливаясь при комплементации данной мутации, что полностью согласуется с ранее полученным данными для *Rhizobium leguminosarum* (Ma et al., 2003). Помимо этого, добавление восьмикратного избытка лейцина в реакционную смесь ингибирующего влияния на связывание AcdR с ДНК, в отличие от псевдомонад, не оказывает. Дополнительное значение исследованиям транскрипционной регуляции гена *acdS* придаёт тот факт, что для регуляторных белков Lrp-семейства характерна плеiotропия. В связи с тем, что АЦК синтезируется только растениями и секретируется в межклеточное пространство, где может проникать внутрь клеток бактерий-фитосимбионтов, связываясь с регуляторными белками AcdR, вполне вероятно существование механизма влияния растений на метаболизм симбиотических бактерий посредством секреции АЦК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие виды аэробных метилотрофных бактерий являются фитосимбионтами, способными использовать не только выделяемый растениями метанол, но и 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту за счет активности фермента АЦК-дезаминазы. Деаминарование АЦК, предшественника стрессового фитогормона этилена, приводит к снижению концентрации последнего в растениях, что повышает их устойчивость к биотическим стрессам, увеличивает толерантность к абиотическим неблагоприятным факторам, а также стимулирует рост и развитие (Glick, 2014). Несмотря на очевидную роль АЦК-дезаминазы для симбиоза бактерий и растений, этот фермент исследован слабо, а его транскрипционная регуляция для альфапротеобактерий ранее не изучалась. Кроме того, изучение АЦК-дезаминаз затруднено высоким уровнем сходства их аминокислотных последовательностей с ферментом катаболизма растительной аминокислоты D-цистеина – D-цистеиндесульфогидразой, которая тоже участвует в формировании ассоциации с растениями, приводя к образованию сероводорода. Как показано в последнее время, сероводород индуцирует многие протекторные системы растений (Wang et al., 2012; Li, 2013; Li, Zhu, 2014; Li et al., 2014), а также действует как фунгицид, повышая устойчивость к фитопатогенам (Soutourina et al., 2001).

У типовых штаммов аэробных метилотрофных бактерий из рода *Methylobacterium* проведен детальный анализ распространения генов АЦК-дезаминазы и D-цистеиндесульфогидразы. Наличие этих ферментов является конкурентным преимуществом бактерий-фитосимбионтов и свидетельствует об их потенциальной способности стимулировать рост и развитие растений. Показано, что распределение

генов *acdS* и *dcyD* среди бактерий рода *Methylobacterium* подчиняются определенным филогенетическим закономерностям, так как обнаружены две группы видов, содержащих ген *acdS* и одна – ген *dcyD*. Разработанная нами система ПЦР-детекции генов АЦК-дезаминазы и D-цистеиндесульфогидразы позволит проводить анализ новых изолятов и расширить спектр метилотрофов-фитосимбионтов.

В данной работе изучены рекомбинантные АЦК-дезаминазы из *M. nodulans* и *A. methanolica*. Проведен сравнительный анализ их биохимических свойств, в результате которого было выдвинуто предположение о том, что наличие АЦК-дезаминазы является одним из адаптационных механизмов ассоциации бактерий с растениями и ее активность обусловлена экологической нишей, занимаемой бактерией. *M. nodulans* является клубеньковым фитосимбионтом, имеющим большой доступ к АЦК, соответственно, имеет наибольшую активность АЦК-дезаминазы, тогда как *A. methanolica* – свободноживущая почвенная бактерия, не связанная с поверхностью растений непосредственно, по-видимому, обладает значительно более низкой активностью этого фермента.

Итак, нами охарактеризован транскрипционный регулятор AcdR гена АЦК-дезаминазы *M. radiotolerans* JCM 2831. Установлено, что аминокислотные последовательности белков AcdR метиловых бактерий кластеризуются совместно с белками альфапротеобактерий и филогенетически значительно отличаются от охарактеризованного AcdR из гаммапротеобактерии *P. putida* UW4. Показано, что белок AcdR из *M. radiotolerans* JCM2831 связывает фрагмент ДНК, содержащий промоторно-операторный участок гена *acdS*, и в присутствии эффектора 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата является активатором транскрипции гена АЦК-дезаминазы. Отличие предлагаемой модели транскрипционной регуляции гена *acdS* от ранее исследованной у *P. putida* UW4, возможно, связано с тем, что метиловых бактерий легко проникают в ткани растений, где им доступны различные метаболиты, тогда как *P. putida* обитает в ризосфере. Помимо этого, разнообразие моделей может быть связано с плеiotропной природой регулятора AcdR.

Для подтверждения участия *acdR* в регуляции *acdS* получены делеционные и комплементированные мутанты по этим генам. Выявлено, что активность АЦК-дезаминазы у нокаут-мутантов отсутствует, тогда как комплементация мутации приводит к восстановлению её функции. Кроме того, функция AcdR как активатора транскрипции гена *acdS* показана в гетерологичной системе на основе *E. coli*.

Таким образом, исследование свойств АЦК-дезаминазы, а также регуляции экспрессии этого фермента позволило получить новые данные о механизмах воздействия метилотрофных бактерий на растения. Проведенная работа является основой для дальнейших молекулярно-биохимических исследований организации и регуляции фитосимбиоза у аэробных метиловых бактерий.

Следует отметить, что аэробные метилотрофные бактерии не патогенны для человека, животных и растений, что делает перспективным их практическое использование в качестве экологически безопасного средства для стимуляции роста растений, повышения их устойчивости к патогенам, удлинения срока хранения плодов и цветов, а также в процессах фиторемедиации.

ВЫВОДЫ

1. В результате ПЦР-скрининга с помощью вырожденных олигонуклеотидных праймеров 28 штаммов аэробных метиловобактерий гены АЦК-дезаминаз (*acdS*) обнаружены у типовых штаммов видов *Methylobacterium brachiatum*, *M. fujisawaense*, *M. goesingense*, *M. gregans*, *M. longum*, *M. marchantiae*, *M. phyllosphaerae*, *M. tardum*, гены D-цистеиндесульфогидраз (*dcyD*) – у *M. aminovorans*, *M. gnaphalii*, *M. gossipiicola*, *M. rhodesianum*, *M. salsuginis*, *M. suomiense*, *M. thiocyanatum*, *M. trifolii*, *M. zatmanii*.

2. Анализ секвенированных и представленных в GenBank аминокислотных последовательностей белков AcdS и DcyD метиловобактерий выявил, что из 48 видов *Methylobacterium* в геноме 29 видов присутствуют гены *acdS* и *dcyD*. Ген *acdS* обнаружен у 18 видов, *dcyD* – у 13, при этом два вида обладают обоими генами. В геномах 17 видов исследуемые гены не найдены. Филогенетический анализ показал, что аминокислотные последовательности AcdS образуют два кластера, а аминокислотные последовательности DcyD – один, что коррелирует с филогенией гена 16S рРНК соответствующих видов.

3. Клонированы гены *acdS* и охарактеризованы рекомбинантные 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазы из клубенькового симбионта *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и факультативно метилотрофной актинобактерии *Amycolatopsis methanolica* 239. Определены основные свойства этих ферментов: AcdS *M. nodulans* – гомотетрамер с молекулярной массой 144 кДа, K_m $0,8 \pm 0,04$ мМ, k_{cat} $111,8 \pm 0,02$ мин⁻¹, оптимумы рН 8,0 и температуры 50°C. AcdS *A. methanolica* гомотетрамер с молекулярной массой 144 кДа, K_m $1,7 \pm 0,2$ мМ, k_{cat} $5,1 \pm 0,2$ мин⁻¹, оптимумы рН 8,5 и температуры 55°C.

4. Впервые получены делеционные и комплементированные мутанты *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*. Установлено, что в отличие от исходного штамма JCM 2831, делеционные мутанты не обладают активностью АЦК-дезаминазы, тогда как у мутантов, комплементированных плазмидами, несущими соответствующие гены, активность восстановилась.

5. Клонирован ген *acdR* *M. radiotolerans* JCM 2831 и получен препарат рекомбинантного белка AcdR. Впервые для альфапротеобактерий показано, что AcdR из *M. radiotolerans* JCM 2831 специфически и обратимо в присутствии эффектора 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата связывает фрагмент ДНК, содержащий промоторно-операторный участок гена *acdS* и является активатором транскрипции гена АЦК-дезаминазы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Fedorov D.N., **Ekimova G.A.**, Doronina N.V., Trotsenko Yu.A. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and *Methylobacterium nodulans* with higher specificity for ACC // FEMS Microbiology Letters. 2013. V. 343. P. 70-76.

2. **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминаза аэробного факультативно метилотрофного актиномицета *Amycolatopsis methanolica* 239 // Микробиология. 2015. Т. 84. № 4. С. 493-495.

3. **Ekimova G.A.**, Fedorov D.N., Tani A., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. Distribution of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and D-cysteine desulhydrase genes among type species of the genus *Methylobacterium*. // Antonie van Leeuwenhoek 2018. P. 1-12. DOI: 10.1007/s10482-018-1061-5

Тезисы:

1. **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н. Характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-деаминаз у аэробных метиловых бактерий // Сборник тезисов 15-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века». Пущино. 2011. С. 355-356.

2. **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н. 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы аэробных метилотрофных бактерий: биохимические и филогенетические аспекты. // Сборник тезисов VII Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». ИНМИ РАН. Москва: МАКС Пресс. 2011. С. 19-21.

3. **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н., Доронина Н.В. Аэробные метилотрофные бактерии-фитосимбионты, стимуляторы роста и развития растений. // Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2011». Тула: ТулГУ. 2011. С. 27.

4. Замахаева С.А., **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н. Получение делеционных мутантов *Methylobacterium radiotolerans* по генам биосинтеза фитогормонов // Сборник тезисов 16-й Пущинской международной школы - конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино. 2012. С. 123-124.

5. Замахаева С.А., **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н. Получение делеционных мутантов *Methylobacterium radiotolerans* по генам, обуславливающим фитосимбиоз // Симбиоз-Россия 2012: материалы V Всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых. Тверь: «Заповедник времени». 2012. С. 314-315.

6. **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н. Получение делеционных мутантов метиловых бактерий-фитосимбионтов по структурным и регуляторным генам 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы // Сборник тезисов 17-ой Пущинской международной школы - конференции молодых ученых. Пущино. 2013. С. 15-16.

7. **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н. Изучение роли белка AcdR в регуляции биосинтеза 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы метиловых бактерий-фитосимбионтов // Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология – 2013». Тула. 2013. С.62.

8. **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н. Новые данные о транскрипционной регуляции экспрессии гена АЦК-деаминазы у *Methylobacterium radiotolerans* // Сборник тезисов 18-ой Международной Пущинской школы - конференции молодых ученых. Пущино. 2014. С. 202-203.

9. **Екимова Г.А.**, Федоров Д.Н. Клонирование и характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы из *Amycolatopsis methanolica* 239 // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». МГУ имени М.В. Ломоносова. Москва: МАКС Пресс, 2014. С. 85.

10. **Екимова Г.А.** Транскрипционная регуляция гена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы у *Methylobacterium radiotolerans* // Материалы IV Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». ИБФМ РАН. Пущино. 2017. С. 46-47.

11. M. Krohaleva, D. Fedorov, G. **Ekimova**. Phylogenetic analysis of genes encoding the enzymes of plant amino acids catabolism in representatives of the genus *Methylobacterium*. Biodiversity: Genomics and Evolution (BioGenEvo-2018) Symposium; Abstracts / A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, Russian Academy of Sciences; Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. p. 25