

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА Л5 НА БИОГЕНЕЗ
ВНЕШНЕМЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ *LYSOBACTER SP. XL1***

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

ФИЦ «Пуцинский научный центр биологических исследований РАН», Россия
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Россия

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 плазмида, 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 отобранный $Suc^R Tc^R Gm^S$ 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.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Проект № 19–74–0086).

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.