

Активация серинового цикла у *Methyloviumicrobium alcaliphilum* 20Z при росте на метаноле

Егорова С. В., Бум С. Ю.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;
bohemiahrhapsody12345@gmail.com

Метанотрофы – специализированная группа бактерий, использующих метан или метанол в качестве единственных источников углерода и энергии. Метанотрофы получают энергию, окисляя метан до CO_2 , и ассимилируют углерод на уровне промежуточных продуктов – формальдегида, формиата, а также CO_2 , в трех биохимических путях. Считается, что метанотрофы, относящиеся к Gammaproteobacteria (I тип), используют рибулозомонофосфатный (РМФ) путь, в котором С-С связь образуется за счет конденсации формальдегида и рибулозо-5-фосфата. Метанотрофы класса Alphaproteobacteria (II тип) ассимилируют С1-соединения через сериновый цикл, где в отличие от других метаболических путей, основными метаболитами являются аминокислоты и органические кислоты. Геномный анализ выявил присутствие у всех гаммапротеобактериальных метанотрофов гены, кодирующие ферменты серинового цикла. При этом роль данного метаболического пути у бактерий, реализующих в качестве основного варианта С1-ассимиляции РМФ-путь, остается неясным.

Основной задачей данной работы является определение функций серинового цикла у гаммапротеобактериальных метанотрофов. В качестве объекта исследования использовался облигатный метанотроф *Methyloviumicrobium alcaliphilum* 20Z, являющийся модельным организмом для изучения метанотрофного метаболизма. У данного штамма были определены активности ключевых ферментов серинового пути (серинглиоксилатаминотрансферазы, гидроксипируватредуктазы, глицераткиназы и малил-КоА лиазы) и уровни экспрессии ряда генов центрального и С1-метаболизма, а также их зависимость от условий выращивания.

Для определения потока углерода через сериновый цикл проводили сравнение активностей ключевых генов этого пути у *M. alcaliphilum* 20Z, растущего на различных субстратах: на метане, метаноле, а также на смеси метана и метанола. Клетки последовательно выращивали сначала на метане, по достижении экспоненциальной фазы в среду добавляли метанол 0,2% (об/об), а по истечении 18 ч инкубации клетки разрушали и в бесклеточных экстрактах измеряли активности ферментов. В ходе эксперимента выявлено 4-х кратное возрастание активности гидроксипируватредуктазы в клетках, выращенных на метаноле и смеси метана и метанола, по сравнению с ростом на метане (Рис. 1). При этом активность серинглиоксилатаминотрансферазы увеличивалась незначительно.

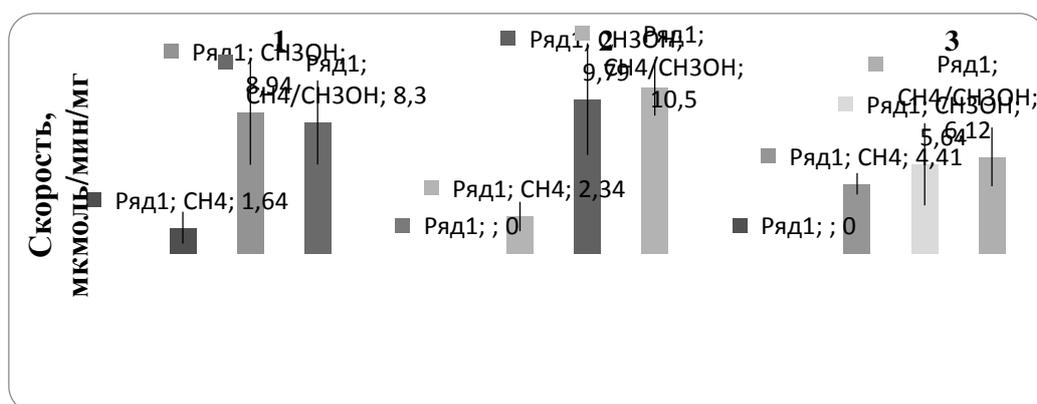


Рис.1. Активность гидроксипируватредуктазы (1,2) и серинглиоксилат-аминотрансферазы (3) у *M. alcaliphilum* 20Z при росте на разных субстратах.

Активность гидроксипируватредуктазы измеряли с НАДН (1) или НАДФН (2).

Ранее нами было предположено, что регуляция серинового цикла у данного метанотрофа происходит на уровне гидроксипируватредуктазы [1,2]. Полученные экспериментальные данные подтверждают выдвинутое предположение.

Изменение уровня экспрессии генов *sga*, *gck* и *mcl*, кодирующих соответственно ферменты серинового пути серинглиоксилатаминотрансферазу, глицераткиназу и малил-КоА лиазу, определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Из клеток, выращенных на метане, метаноле или смеси метан/метанол выделяли РНК методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции. Уровень транскрипции генов серинового пути оценивали относительно уровня транскрипции гена *groB*, кодирующего β -субъединицу РНК полимеразы. Уровень транскрипции каждого гена в клетках, растущих на метане, принимали за 1. В клетках, выращенных на метаноле и смеси метана и метанола, обнаружено повышение уровня транскрипции генов глицераткиназы и малил-КоА лиазы, тогда как экспрессия серинглиоксилатаминотрансферазы уменьшалась в клетках, растущих на смеси метана и метанола (Рис. 2). Повышение уровня экспрессии глицераткиназы и малил-КоА лиазы при росте в присутствии метанола может означать активацию серинового цикла как дополнительного РМФ-циклу ассимиляционного пути в условиях избытка источника углерода, по сравнению с ростом на метане ввиду его ограниченной растворимости. Отсутствие закономерности в экспрессии серинглиоксилатаминотрансферазы может быть обусловлено наличием у метанотрофа неспецифических аминотрансфераз, которые используют глиоксилат в качестве акцептора аминоксипы.

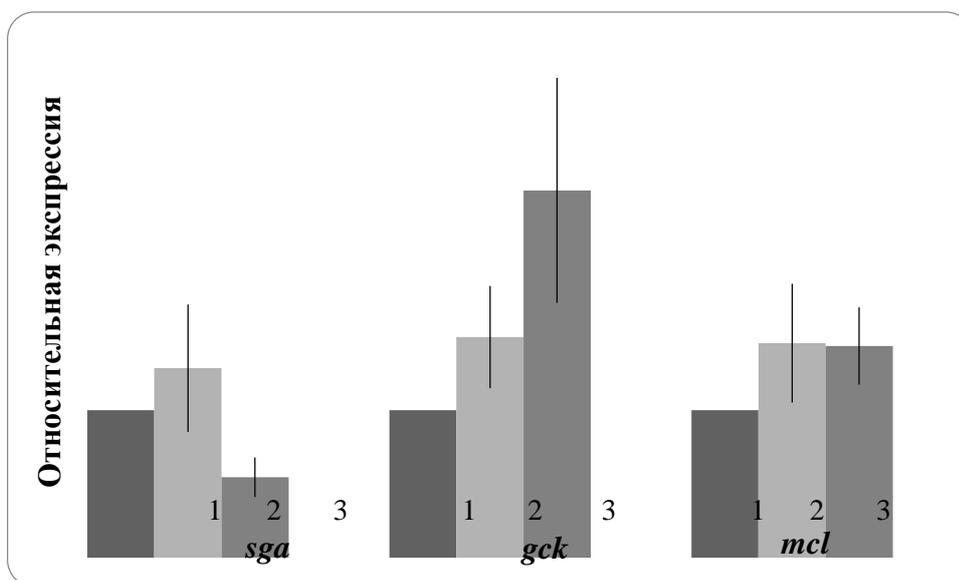


Рис.2. Уровни экспрессии генов *sga*, *gck* и *mcl* у *M. alcaliphilum* 20Z, выращенного на различных субстратах: 1 – метан, 2 – метанол, 3 – смесь метана и метанола.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-01113

Литература

1. Бут С.Ю., Егорова С.В., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Биохимические свойства и филогения гидроксипируватредуктаз метанотрофных бактерий, реализующих различные пути C1-ассимиляции // Биохимия. 2017. Т. 82. № 10. С. 1647-1656.

2. S.Y. But, S.V. Egorova, V.N. Khmelenina, Y.A.Trotsenko. Serine-glyoxylate aminotranferases from methanotrophs using different C1-assimilation pathways // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2019. Volume 112:741–751.