

УДК 579.841:577.214/215

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ФРАГМЕНТА, УЧАСТВУЮЩЕГО В АЭРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ДИХЛОРМЕТАНА *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4

© 2012 г. Ю. Е. Фирсова, Д. Н. Фёдоров, Ю. А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино, Московская обл., 142290

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 14.01.2012 г.

Исследованы гипотетические гены *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 METDI 2671 (*bioD*₂) и METDI 2680 в составе хромосомного фрагмента (126 т.п.н.), связанного с деградацией дихлорметана (ДХМ). Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) показано, что в клетках, выращенных как на ДХМ, так и на метаноле, присутствуют транскрипты обоих генов. С использованием мобилизуемого суицидного вектора рK18mob получены нокаут-мутанты по этим генам. Мутант **БИО** (с инсерцией в гене *bioD*₂) после культивирования на метаноле характеризовался пониженной скоростью роста на ДХМ по сравнению со штаммом ДМ4 дикого типа, в то время как мутант **МТ** (с инсерцией в гене METDI 2680) не отличался по этим показателям от исходного штамма. Результаты свидетельствуют об участии гена *bioD*₂ в биосинтезе биотина, сопряженном с деградацией ДХМ.

В последние годы активно разрабатываются методы очистки промышленных сточных вод и газовых выбросов, содержащих дихлорметан (СН₂Сl₂, ДХМ), с использованием биофильтров на основе аэробных метиловых бактерий, использующих этот персистентный, канцерогенный и мутагенный поллютант в качестве источника углерода и энергии [1]. Установлено, что при росте метиловых бактерий на ДХМ индуцируется дихлорметандегалогеназа DcmA (КФ 4.5.1.3) – цитоплазматический фермент – гомогексамер, катализирующий трансформацию СН₂Сl₂ до формальдегида и двух молекул НСl в реакции, зависимой от восстановленного глутатиона [2]. Однако до сих пор не идентифицированы дополнительные ферменты и гены, участвующие в процессе деградации ДХМ наряду с DcmA [3, 4]. Секвенирование генома *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 выявило уникальный для этого штамма участок бактериальной хромосомы (“ДХМ-остров”), связанный с деградацией данного поллютанта [5–7]. В пределах этого обширного фрагмента ДНК (126 т.п.н.) обнаружены 129 кодирующих белки нуклеотидных последовательностей, отсутствующих у метилотрофа *Methylobacterium extorquens* AM1, наиболее генетически близкого штамму ДМ4, но не способного расти на ДХМ. Сравнение этого фрагмента ДНК с известными геномами деструкторов галометанов *Methylobacterium chloromethanicum* СМ4 и *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC 51888 выявило внутри “ДХМ-острова” штамма ДМ4 несколько кодирующих белки нуклеотидных последовательностей, участие которых в про-

цессе разложения ДХМ вполне вероятно, но нуждается в экспериментальной проверке [7]. Так, продукт гена METDI 2680 предположительно является метилтрансферазой, имеющей 83 и 56% сходства с белками деструктора хлорметана *M. chloromethanicum* СМ4 (MCHL_5330) и *H. denitrificans* ATCC 51888 (Hden_0265) соответственно. В то же время этот ген отсутствует у не использующих ДХМ представителей рода *Methylobacterium*.

В пределах “ДХМ-острова” обнаружены гены биосинтеза биотина. Ген *bioD*₂ (METDI 2671) предположительно кодирует гомолог детиобиотинсинтетазы, предпоследнего фермента в цепи биосинтеза биотина. Этот ген весьма существенно отличается от своего паралога *bioD*₁ (METDI 3114), расположенного за пределами “ДХМ-острова” у штамма ДМ4, и от *bioD* других штаммов рода *Methylobacterium* (уровень аминокислотной идентичности 27%). Напротив, гены детиобиотинсинтетаз *M. dichloromethanicum* ДМ4 (из “ДХМ-острова”) и *H. denitrificans* ATCC 51888 весьма похожи и являются смежными с генами *bioA*, по-видимому, кодирующими еще один фермент биосинтеза биотина. Потенциальная связь между функциями биотина и метаболизмом С₁-соединений может заключаться в роли биотина как кофактора реакций карбоксилирования и декарбоксилирования [8, 9].

Цель работы – исследование транскрипции генов METDI 2680 и *bioD*₂ (METDI 2671) у *M. dichloromethanicum* ДМ4 и их участия в деградации ДХМ.

Таблица 1. Штаммы бактерий и плазмиды

Штамм или плаزمида	Характеристика	Ссылка или источник
Штаммы:		
<i>Methylobacterium dichloromethanicum</i> ДМ4	Деструктор ДХМ, штамм дикого типа	DSM 6343 [10]
БИО	Производный ДМ4, <i>bioD₂::aacC1</i> , Gm ^r	Данная работа
МТ	Производный ДМ4, METDI 2680:: <i>aacC1</i> , Gm ^r	Данная работа [4]
<i>Methylobacterium extorquens</i> ДМ17	Деструктор ДХМ	[4]
<i>Methylohabdus multivorans</i> ДМ13	Деструктор ДХМ, типовой штамм	BKM В-2030 [4]
<i>Methylohabdus multivorans</i> ДМ15	Деструктор ДХМ	DSM 21470 [4]
<i>Methylophila helvetica</i> ДМ9	Деструктор ДХМ, типовой штамм	BKM В-2189 [4]
<i>Albibacter methylovorans</i> ДМ10	Деструктор ДХМ, типовой штамм	DSM 22840 [4]
<i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> ДМ16	Деструктор ДХМ, типовой штамм	DSM 21507 [4]
<i>E. coli</i> S17-1	F ⁻ <i>thi pro recA hsdR</i> [RP4-2Tc::Mu-Km::Tn7] Tr ^r Sm ^r	[11]
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1 nupG</i> λ-	Invitrogen
Плазмиды:		
pK18mob	Мобилизуемый многоцелевой вектор, Km ^r	[12]
p34S-Gm	Источник Gm ^r -кассеты, Ap ^r , Gm ^r	[13]
pBIOf-01	pK18mob, содержащий 542 п.н. <i>XbaI/HindIII</i> – фрагмент гена METDI 2671 (<i>bioD₂</i>) из штамма ДМ4	Данная работа
pBIOf-02	pBIOf-01, содержащий Gm ^r -касsetу, клонированную по сайтам <i>PstI</i> из p34S-Gm, в обратной ориентации	Данная работа
pMT-01	pK18mob, содержащий 702 п.н. <i>XbaI/HindIII</i> – фрагмент мутантного гена METDI 2680 из штамма ДМ4	Данная работа
pMT-02	pMT-01, содержащий Gm ^r -касsetу, клонированную по сайтам <i>SalI</i> из p34S-Gm, в прямой ориентации	Данная работа

МЕТОДИКА

Культивирование бактерий и использованные векторы. Штаммы бактерий и плазмиды представлены в табл. 1. Динамику роста на ДХМ и метаноле исходного штамма *M. dichloromethanicum* ДМ4 и полученных на его основе мутантов БИО и МТ изучали с использованием жидкой минимальной среды “ММ” [14], как описано ранее [4]. В других экспериментах метиловобактерии культивировали на минеральной среде “К” с метанолом, мутантные штаммы – с добавлением соответствующих антибиотиков [4].

Филогенетический анализ. Построение укорененного филогенетического дерева на основе анализа аминокислотных последовательностей BioD представителей *Proteobacteria*, доступных в базе данных NCBI Database Project, производили методом Neighbor-Joining, реализованным в пакете программ TREECON [15].

Изучение экспрессии генов “ДХМ-острова” методом ОТ-ПЦР. Тотальную РНК из клеток *M. dichloromethanicum* ДМ4, выращенных без добавления биотина на минеральной среде “К”, содержащей CH₂Cl₂ или CH₃OH, выделяли с помо-

щью реагента TRIzol (“Invitrogen”, США) и обрабатывали ДНКазой (“Fermentas”, Литва) согласно инструкциям фирм-производителей. Для контроля отсутствия ДНК в препарате РНК проводили ПЦР с использованием праймеров DRTfог и DRTrev на ген *dcmA* [4]. При отсутствии амплификации фрагментов ожидаемой длины препарат считали свободным от примеси ДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи обратной транскриптазы RevertAid™ M-Mulv (“Fermentas”, Литва) по протоколу фирмы-производителя с использованием специфических праймеров на гены METDI 2680, METDI 2671 (табл. 2). Условия ОТ-ПЦР аналогичны опубликованным ранее [4], за исключением температур отжига праймеров (61°C).

Получение нокаут-мутантов *M. dichloromethanicum* ДМ4 с выключенными генами METDI 2680 и *bioD₂*. Выделение геномной и плазмидной ДНК, клонирование ДНК и трансформацию компетентных клеток осуществляли согласно стандартным методикам [16].

Для получения инсерционного варианта гена *bioD₂* (METDI 2671) посредством гомологичной

Таблица 2. Праймеры, использованные в данной работе*

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3') и сайт рестрикции	Целевой ген	Назначение
1MTf	CGGCTCTAGAAATGGACGCATTCTCCGATCC <i>XbaI</i>	METDI 2680	ПЦР-мутагенез и клонирование мутантного гена (702 п.н.) в рК18mob; анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР; детекция методом ПЦР
2MTg*	ATTCGACTTATATTGTAGTCGACGAAGCCCTCGTGCAACTG <i>SalI</i>		
3MTf*	GTCGACTACAATATAAGTCGAATAGCGCGCCGGAAGGCCCATTT <i>SalI</i>		
4MTg	GCCAAAGCTTTCAGGCGTAGGGCGACCC <i>HindIII</i>		
BIOf	AGGTCTCTAGAGCTCGCGGATTCGATATCCGT <i>XbaI</i>	<i>bioD</i> ₂ (METDI 2671)	Клонирование 542 п.н. фрагмента гена в рК18mob
BIOg	TACTAAGCTTCGCACAAAGCACGATCGGCA <i>HindIII</i>		
2671f	GAGATCGGGAAGTCGGTCTTCTCT	<i>bioD</i> ₂ (METDI 2671)	Анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР, продукт – 311 п.н.
2671g	TAAAGCGTGCTGCGACTAAGCG		

* Комплементарные участки выделены курсивом.

рекомбинации амплифицировали фрагмент размером 542 п.н. (содержащий 5'-концевой участок последовательности гена *bioD*₂ размером 393 п.н. и часть соседнего гена METDI 2672 размером 149 п.н.), используя праймеры BIOf и BIOg, содержащие сайты эндонуклеаз *XbaI* и *HindIII* соответственно (табл. 2). Амплификацию данного фрагмента с использованием Pfu-ДНК-полимеразы ("Fermentas", Литва) и его очистку проводили, как описано ранее [4]. Полученный фрагмент, обработанный рестриктазами *XbaI* и *HindIII*, клонировали в мобилизуемом суицидном векторе рК18mob по тем же сайтам, в результате была получена плазида рBIOf-01 (табл. 1). Далее *PstI*-фрагмент (895 п.н.) из вектора р34S-Gm, содержащий ген устойчивости к гентамицину, клонировали в векторе рBIOf-01, который имел единственный сайт рестрикции *PstI* приблизительно в середине клонированного фрагмента длиной 542 п.н. Сайт рестрикции *PstI* располагался на участке гена *bioD*₂ на расстоянии 58 п.н. от его начала. Полученный таким образом вектор рBIOf-02 содержал мутантный фрагмент гена *bioD*₂ со встроенной Gm^r-кассетой в обратной ориентации, а также небольшой участок соседнего гена METDI 2672, который в процессе гомологичной рекомбинации оставался неизменным.

Аналогично был получен инсерционный вариант гена METDI 2680, при этом необходимый для вставки Gm^r-касеты сайт рестрикции *SalI* вводили методом ПЦР-мутагенеза. С использованием разработанных нами пар праймеров 1MTf и 2MTg, а также 3MTf и 4MTg (табл. 2) были получены ампликоны, соответствующие правой и левой половинам гена METDI 2680 (325 п.н. и 397 п.н.). Ампликоны очищали на колонках Quantum Prep[®] PCR Kleen Spin Columns ("Bio-Rad", США) и раз-

бавляли в 50 раз. Праймеры 2MTg и 3MTf содержали сайт рестрикции *SalI*, а также взаимно комплементарные участки. В дальнейшем в качестве матрицы ПЦР использовали смесь обоих ампликонов и проводили первый цикл амплификации без добавления праймеров, а последующие циклы – с использованием фланкирующих праймеров 1MTf и 4MTg. ПЦР проводили в стандартном режиме, указанном для фрагмента гена *bioD*₂. Полученный ПЦР-фрагмент размером 702 п.н., соответствующий мутантному гену METDI 2680 с введенным сайтом рестрикции *SalI*, после очистки на колонках фирмы "Bio-Rad" клонировали в мобилизуемом суицидном векторе рК18mob по сайтам *XbaI* и *HindIII*. В результате была получена плазида рMT-01. Далее *SalI*-фрагмент (895 п.н.) из вектора р34S-Gm, содержащий ген устойчивости к гентамицину, клонировали в векторе рMT-01. Полученный таким образом вектор рMT-02 содержал ген METDI 2680, нуклеотидная последовательность которого была прервана вставкой Gm^r-касеты в прямой ориентации.

Плазмиды рBIOf-02 и рMT-02 мобилизовали путем двуродительского скрещивания *M. dichloromethanicum* ДМ4 и *E. coli* S17-1 (рBIOf-02 или рMT-02), как описано ранее [4]. Потенциальные трансконъюганты очищали двукратным пересевом из единичных колоний на селективной среде "К", содержащей 2% метанола и 20 мкг/мл гентамицина. Все рекомбинанты дополнительно проверяли посредством ПЦР на наличие мутантного аллеля со вставкой Gm^r-касеты.

Аналитические методы. Концентрацию ионов Cl^- в супернатанте после центрифугирования (8000 g, 5 мин) суспензии клеток определяли по описанному методу [17]. Оптическую плотность

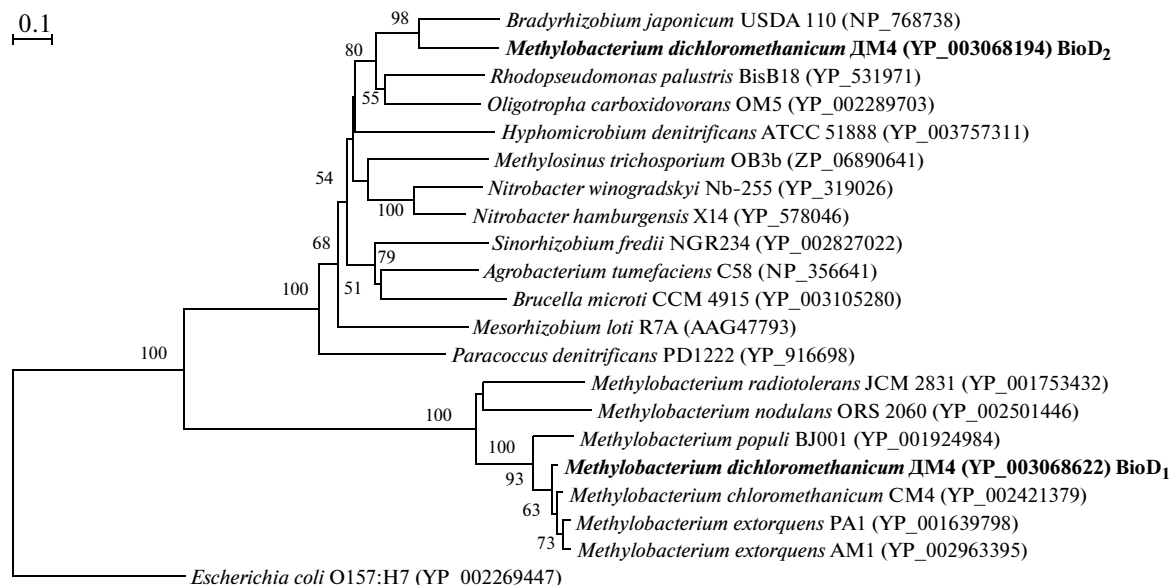


Рис. 1. Филограмма, построенная на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей детио-биотинсинтетаз (BioD) метилотрофных и немилотрофных представителей Proteobacteria. Корень определен включением последовательности BioD *Escherichia coli* O157:H7 в качестве внешней группы. Масштаб соответствует 10 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот. Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap-анализа” 100 альтернативных деревьев.

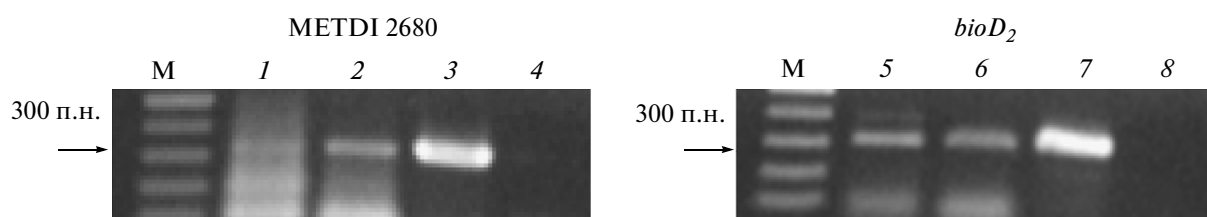


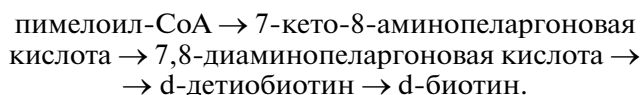
Рис. 2. ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов METDI 2680 и *bioD*₂ в клетках штамма ДМ4, выращенных на метаноле (1, 5) и ДХМ (2, 6).

М – маркер молекулярной массы; 1, 2 – ПЦР с кДНК METDI 2680; 5, 6 – ПЦР с кДНК *bioD*₂; 3, 7 – ПЦР с геномной ДНК штамма ДМ4 (положительный контроль) с праймерами на перечисленные гены; 4, 8 – ПЦР без матрицы (отрицательный контроль).

измеряли при 340 нм на регистрирующем спектрофотометре “Shimadzu UV-160” (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных анализа генома предположили, что синтез биотина у штамма ДМ4 осуществляется через следующие интермедиаты:



В этот процесс последовательно вовлечены гены *bioF*, *bioA*, *bioD* и *bioB*; гомологичные им последовательности имеются в геноме штамма ДМ4, причем две (*bioD*₂, *bioA*₂) находятся внутри “ДХМ-острова”.

На рис. 1 показано филогенетическое положение детиобиотинсинтетаз BioD *M. dichloromethanicum* ДМ4 среди метилотрофных и немети-

лотрофных протеобактерий. Видно, что транслированная аминокислотная последовательность BioD₂ штамма ДМ4, кодируемая геном из “ДХМ-острова”, близка соответствующим ферментам ризобий, тогда как BioD₁ является общей для представителей рода *Methylobacterium*.

Методом ПЦР с использованием специфических праймеров на ген детиобиотинсинтетазы *bioD*₂ штамма ДМ4 соответствующий данному гену фрагмент был найден нами у деструкторов ДХМ с сериновым (*M. helvetica* ДМ9, *M. multivorans* ДМ13 и ДМ15, *M. extorquens* ДМ17) и рибуллозобисфосфатным (*A. methylovorans* ДМ10, *A. dichloromethanicus* ДМ16) путями. Факт наличия одинакового варианта гена у метилобактерий, принадлежащих к различным родам и реализующих разные пути первичной C₁-ассимиляции, весьма интересен и может быть обусловлен латеральным переносом этого гена. В дальнейшем пла-

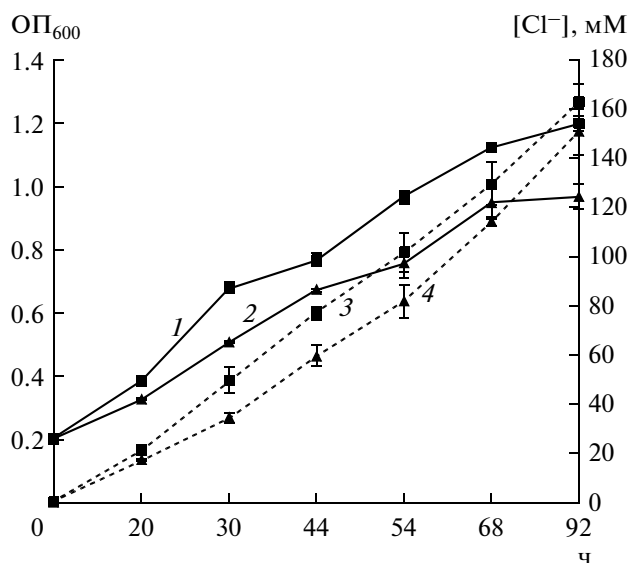


Рис. 3. Динамика роста на ДХМ штамма ДМ4 (1, 3) и нокаут-мутанта БИО (2, 4). 1, 2 – ОП суспензии клеток; 3, 4 – концентрация ионов хлора в среде.

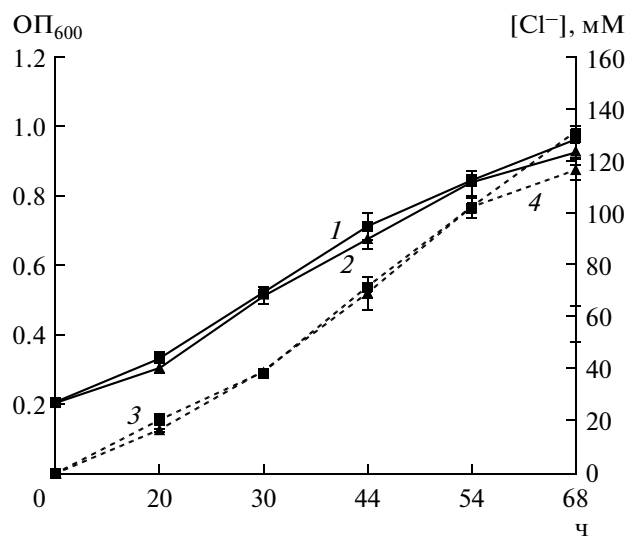


Рис. 4. Динамика роста на ДХМ штамма ДМ4 (1, 3) и нокаут-мутанта МТ (2, 4). 1, 2 – ОП суспензии клеток; 3, 4 – концентрация ионов хлора в среде.

нируется определить полную нуклеотидную последовательность *bioD* генов у этих деструкторов ДХМ.

В то же время ген-ортолог предполагаемой метилтрансферазы METDI 2680 штамма ДМ4 методом ПЦР обнаружен только у близко родственного деструктора ДХМ *M. extorquens* ДМ17.

Транскрипционный анализ экспрессии генов *bioD*₂ и METDI 2680 методом ОТ-ПЦР показал, что в клетках *M. dichloromethanicum* ДМ4, выращенных как на ДХМ, так и на метаноле, присутствуют РНК-транскрипты указанных генов (рис. 2). Экспрессия этих генов на уровне транскрипции ниже, по сравнению с геном дихлорметандегалогеназы *dcmA*, на что указывает относительно невысокий выход продукта в параллельных реакциях при использовании одного и того же препарата РНК. Результаты ПЦР с кДНК METDI 2680 свидетельствуют о необходимости экспериментальной проверки гипотезы об индукции транскрипции этого гена в клетках, выращенных на ДХМ.

Далее, используя мобилизуемый суицидный вектор рK18mob, получили нокаут-мутанты МТ и БИО с выключенными генами METDI 2680 и *bioD*₂, нуклеотидная последовательность которых была прервана инсерцией Gm^r-кассеты. Установлено, что мутанты МТ и БИО сохранили способность к росту на ДХМ как в жидких, так и на агаризованных средах. Не выявлены различия в динамике роста обоих мутантов в жидкой среде “ММ” с метанолом по сравнению со штаммом ДМ4 дикого типа. Однако при переходе от культивирования на метаноле к росту на ДХМ наблюдали статистически достоверное снижение скорости роста мутанта БИО по сравнению с исходным штам-

мом, что отражено на графиках изменения оптической плотности бактериальной суспензии и концентрации в среде хлор-ионов, экскретируемых клетками при деградации ДХМ (рис. 3). Так, в разных точках отбора проб ОП₆₀₀ мутанта БИО составляла 74.3–87.2% относительно контроля, а концентрация ионов Cl⁻ – 69.5–92.5%. Аналогичные графики для мутанта МТ и исходного штамма ДМ4 практически совпадали (рис. 4). Это означает, что ген предполагаемой метилтрансферазы METDI 2680, сходной с белками дехлорирующих штаммов *M. chloromethanicum* СМ4 и *H. denitrificans* АТСС 51888, не имеет отношения к деградации ДХМ или действует в условиях, отличных от условий эксперимента.

Напротив, замедление роста на ДХМ мутанта *M. dichloromethanicum* ДМ4 с выключенным геном *bioD*₂ свидетельствует о том, что детиобiotинсинтетазы BioD₂ участвует в биосинтезе биотина. При этом следует учитывать, что ген *bioD*₂ может котранскрибироваться со следующим за ним геном *bioA*₂ (METDI 2670), предположительно, кодирующим аминотрансферазу 7,8-диаминопеларгоновой кислоты, действующую на предшествующем этапе биосинтеза кофактора. В этом случае у мутанта БИО может быть одновременно заблокирован синтез двух ферментов (BioD₂ и BioA₂), что предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Пока не получен ответ на вопрос, почему в “ДХМ-острове” штамма ДМ4 отсутствуют два других гена биосинтеза биотина *bioF* и *bioB*. Видимо, соответствующие реакции биосинтеза не являются лимитирующими. В целом, роль биотина в процессе деградации ДХМ метиловыми бактериями детально не исследована. Возможно,

важность биотина в этом процессе обусловлена особой ролью биотинзависимых карбоксилаз, в частности ацетил-СоА-карбоксилазы (КФ 6.4.1.2) и пропионил-СоА-карбоксилазы (КФ 6.4.1.3), катализирующих ключевые этапы биосинтеза жирных кислот [18]. Известно, что адаптация штаммов бактерий, толерантных к токсичным органическим растворителям, сопровождается изменением состава жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран [19]. Как было показано нами ранее, при бактериальной деградации ДХМ происходит уплотнение барьера проницаемости клеточных мембран путем увеличения содержания насыщенных ($C_{16:0}$) и уменьшения уровня ненасыщенных жирных кислот ($C_{18:1}$ и $C_{20:1}$) с одновременным повышением содержания фосфатидилхолина. Вероятно, такие адаптивные перестройки при использовании ДХМ увеличивают потребность деструкторов в биотине, синтез которого *de novo* происходит в условиях кислотного, осмотического и окислительного стресса и может осуществляться при участии разных изоферментов. Следовательно, изучение свойств ферментов биосинтеза биотина, кодируемых генами “ДХМ-острова” у штамма ДМ4, необходимо для понимания молекулярных механизмов деградации этого поллютанта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.512.11.2024) и гранта РФФИ № 12-04-00760-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии / Ред. В.Ф. Гальченко. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
2. Vuilleumier S., Pagni M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. P. 138–146.
3. Kayser M.F., Ucurum Z., Vuilleumier S. // Microbiology (UK). 2002. V. 148. P. 1915–1922.
4. Фирсова Ю.Е., Фёдоров Д.Н., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 6. С. 796–802.
5. Vuilleumier S., Chistoserdova L., Lee M.-L., Bringel F., Lajus A., Zhou Y. et al. // PloS ONE. (www.plosone.org) 2009. V. 4. № 5. e5584. doi:10.1371/journal.pone.0005584.
6. Muller E., Hourcade E., Louhichi-Jelail Y., Hammann P., Vuilleumier S., Bringel F. // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. № 9. P. 2518–2535.
7. Muller E., Bringel F., Vuilleumier S. // Res. Microbiol. 2011. V. 162. № 9. P. 869–876.
8. Lin S., Hanson R.E., Cronan J.E. // Nature Chem. Biol. 2010. V. 6. P. 682–688.
9. Chapman-Smith A., Cronan J.E. // Trends Biochem. Sci. 1999. V. 24. P. 359–363.
10. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Leisinger T. // Syst. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 210–218.
11. Simon R., Priefer U., Puhler A. // Nature Biotechnology. 1983. V. 1. 784–791.
12. Schäfer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
13. Dennis J.J., Zylstra G.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 2710–2715.
14. Vuilleumier S., Leisinger T. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 239. P. 410–417.
15. Van de Peer Y., de Wachter R. // CABIOS. 1994. V. 10. № 5. P. 569–570.
16. Sambrook J., Russel D.W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd ed. / Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
17. Jörg G., Bertau M. // Anal. Biochem. 2004. V. 328. P. 22–28.
18. Streit W., Entcheva P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 61. P. 21–31.
19. De Bont J.A.M. // Trends Biotechnol. 1998. V. 16. № 12. P. 493–499.

Functional Analysis of the Genome Fragment Involved in Aerobic Dichloromethane Degradation by *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4

Yu. E. Firsova, D. N. Fedorov, and Yu. A. Trotsenko

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow oblast, Russia

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Received January 14, 2012

Abstract—The hypothetical genes of *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4, METDI 2671 (*bioD*₂), and METDI 2680 located within the chromosomal fragment (126 kb) associated with dichloromethane (DCM) degradation have been studied. The reverse transcription polymerase chain reaction method (RT-PCR) showed the presence of transcripts of both genes in cells grown on DCM and methanol. The mobilized suicidal vector pK18mob was used to obtain knockout mutants in these genes. The BIO mutant (with an insertion in the *bioD*₂ gene) after cultivation on methanol was characterized by a lower growth rate on DCM compared to the wild-type DM4 strain, while the MT mutant (with an insertion in the METDI 2680 gene) did not differ from the initial strain in respect of these characteristics. The results demonstrate the involvement of the *bioD*₂ gene in biotin biosynthesis coupled with DCM degradation.