

УДК 577.152.51

ГЛУТАМАТ-РАЦЕМАЗА НЕОБХОДИМА ДЛЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК *Streptococcus iniae* И ЦЕЛОСТНОСТИ ИХ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ*

© 2020 М. Мухаммад^{1,2}, Дж. Бай¹, А.Дж. Альхассан³,
Х. Суле⁴, Дж. Цзюй¹, Б. Чжао^{1**}, Д. Лю^{1**}

¹ College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China;
E-mail: morui19-hebtu@qq.com, pqw1234@163.com

² Department of Biochemistry, Kano University of Science and Technology, Wudil, Nigeria

³ Department of Biochemistry, Bayero University, Kano, Nigeria

⁴ Department of Medical Laboratory Science, Bayero University Kano, Nigeria

Поступила в редакцию 14.06.2019

После доработки 19.09.2019

Принята к публикации 07.10.2019

Streptococcus iniae является патогенным и зоонозным видом бактерий, который вызывает возникновение болезней у человека и гибель многих видов рыб. Как было недавно показано у бактерий наблюдается тенденция развития устойчивости к антибиотикам, что гарантирует интерес к этой теме и требует поиска новых подходов для борьбы с возникающей инфекцией. Глутамат-рацемаз (MurI) является широко распространенным ферментом, участвующим в процессе синтеза пептидогликанов, который играет значительную роль в поддержании целостности клеточной стенки. Однако необходимость в активной глутамат-рацемазе является видоспецифичной. В настоящей работе нами был произведен нокаут гена, кодирующего глутамат-рацемазу в клетках *S. iniae*, и определена ее роль в поддержании целостности клеточной стенки. Кроме того, нами было осуществлено клонирование и экспрессия гена *MurI*, выделен и очищен его белковый продукт и определены его биохимические характеристики. Проведенный биохимический анализ показал, что ген *MurI* из *S. iniae* кодирует функционально активный фермент с молекулярной массой 30 кДа и оптимальными значениями температуры (35 °C) и pH (8,5). Ионы металлов, такие как Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ и Zn²⁺, были способны ингибировать его активность. Ген *MurI* крайне необходим для обеспечения жизнеспособности клеток *S. iniae* и целостности их клеточной стенки. Оказалось, что для достижения оптимального роста мутантного штамма *S. iniae* необходимо обеспечить высокую концентрацию D-глутамата. Анализ проницаемости мембран клеток мутантного штамма показал увеличение повреждения клеточной стенки во время D-глутаматного голодания. Кроме того, мутантный штамм потерял свою вирулентность при инкубации в крови рыб. Наши результаты показали, что нокаут гена *MurI* приводит к появлению ауксотрофного штамма *S. iniae* с поврежденной клеточной стенкой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Streptococcus iniae*, глутамат-рацемаз, нокаут гена, биохимическая характеристика целостности клеточной стенки.

DOI: 10.31857/S0320972520020128

Глутамат-рацемаз (EC 5.1.1.3, MurI) является независимым от присутствия кофакторов ферментом, который катализирует взаимопревращения L-глутаминовой и D-глутаминовой кислот. Этот фермент обеспечивает бактерии источником D-глутаминовой кислоты, которая является необходимым компонентом пептидогликана бактерий [1]. Пептидогликан представляет собой слой кристаллической решетчатой

структуры, образованный из линейных цепей двух альтернативных аминокислот, а именно N-ацетилглюкозамина (GlcNAc или NAGA) и N-ацетилмураминовой кислоты (MurNAc или NAMA), который защищает клетки от разрушения в результате действия градиента осмотического давления [2]. D-Глутаминовая кислота также является основным компонентом бактериальной капсулы [3]. В этом ферменте присутствует пара строго консервативных остатков цистеина (Cys74/Cys185), которые участвуют в двухпорном механизме переноса протона с α-атома углерода в молекуле глутаминовой кислоты на противоположную сторону стабилизированного промежуточного продукта в виде енолата [4]. Большинство бактерий имеют один

Принятые сокращения: MurI – глутамат-рацемаз.

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 2, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

ген глутамат-рацемазы. В то время как виды бактерий, такие как *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* и некоторые другие бактерии, имеют два гена глутамат-рацемазы, которые экспрессируют различные изоферменты [5]. Кроме того, этот фермент отсутствует у человека, что делает его верным кандидатом для разработки новых антибиотиков [6].

Streptococcus iniae является грамположительной бактерией, наиболее часто регистрируемой в качестве патогена рыб, которая представляет угрозу здоровью людей в связи с тем, что она способна вызывать у людей бактериемию, целлюлит, менингит и остеомиелит [7]. В нашей предыдущей работе была продемонстрирована усиливающаяся угроза со стороны этих бактерий при получении морепродуктов и необходимость поиска возможных решений для борьбы с будущими вспышками. Для того чтобы выяснить роль глутамат-рацемазы в патогенности бактерий, необходимо получить клетки, мутантные по этим генам, и затем проанализировать их свойства. Необходимость гена *MurI* является сложным вопросом, и ответ на него, по-видимому, зависит от вида микроорганизма. Нокаут генов глутамат-рацемазы (*racE1* и *racE2*) в клетках *B. anthracis* не оказывал заметного влияния на скорость роста бактерий. В то время как удаление обоих генов приводило к получению нежизнеспособных мутантных клеток [8]. Было показано, что для *Escherichia coli* ген *MurI* необходим для выживания бактерий [9], но не в случае *Staphylococcus haemolyticus* [10] и *Bacillus sphaericus* [11], у которых есть дополнительный фермент метаболизма D-аминокислот, превращающий L-глутаминовую кислоту в D-глутаминовую. Необходимость и свойства гена *MurI* из *S. iniae* еще не изучены. Кроме того, характеристика *MurI* из различных грамположительных и грамотрицательных бактерий имеет важное значение для лучшего понимания как общих, так и уникальных особенностей фермента, которые могут быть использованы для открытия новых лекарств и проведения исследований по получению мутантных штаммов с улучшенной активностью [12]. Целью настоящей работы было осуществление нокаута гена *MurI* из *S. iniae* и определение влияния этого воздействия на жизнеспособность и вирулентность бактерий, а также клонирование, экспрессия, очистка и определение биохимических характеристик изолированного фермента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий и условия их культивирования. Штамм HNM-1 *Streptococcus iniae* был ранее

получен в нашей лаборатории из инфицированного китайского осетра (*Acipenser sinensis*). Бактерии были идентифицированы с использованием обычных физиологических и биохимических методов. Ген 16S рРНК амплифицировали с использованием ПЦР, секвенировали, и полученные данные были размещены на сайте NCBI под кодом доступа KY781829. HNM-1 культивировали в среде BHI при температуре 30 °C. Штаммы DH5α и BL21 *E. coli* культивировали в среде LB (Luria Bertani), и в дальнейшем их использовали соответственно для клонирования и экспрессии белка.

Получение мутантного штамма *S. iniae* Δ*MurI*. Для получения мутантного штамма, дефицитного по гену *MurI*, использовали плазмиду pK18*mobsacB*. Вышележащие и нижележащие участки гена *MurI* из *S. iniae* амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров *MurI*-up-F, *MurI*-up-R, *MurI*-down-F и *MurI*-down-R (таблица). Были использованы следующие сайты рестрикции: *EcoRI* и *BamHI* для *MurI*-up-F и *MurI*-up-R, *BamHI* и *XbaI* для *MurI*-down-F и *MurI*-down-R соответственно. Фрагмент размером 1440 п.н., полученный с помощью ПЦР, содержащий фрагмент (740 п.н.), расположенный выше стартового кодона ATG, и фрагмент (700 п.н.), расположенный ниже стоп-кодона TCA гена *MurI*, был амплифицирован, прикреплен к вектору pMD19-T и затем клонирован в pK18*mobsacB*, чтобы получить плазмиду pMZ1. Последовательности клонированных фрагментов ДНК pMZ1 были подтверждены с помощью секвенирования.

Плазмида pMZ1 была трансформирована в электрокомпетентные клетки *S. iniae* HNM-1. Стабильный мутантный штамм Δ*MurI* был получен в результате двух успешных кроссинговеров, как это было ранее описано [13]. Клоны, полученные в результате одиночного кроссинговера, были отобраны на планшетах, содержащих 50 мкг/мл канамицина. Клоны, полученные в результате проведения двойного кроссинговера, отбирали на планшетах, содержащих 10%-ную сахарозу и 16 мМ D-глутаминовой кислоты. Полученные результаты были проверены с помощью амплификации с использованием ПЦР и секвенирования с использованием праймеров *MurI*-up-F и *MurI*-down-R (таблица).

Кривые роста. Колонии клеток *S. iniae* дикого типа (WT) и мутантного штамма (Δ*MurI*) вводили в жидкую культуральную среду LB и Триптонного соевого дрожжевого экстракта (TSYE) и культивировали при 30 °C и 180 об./мин до поглощения при 600 нм (A_{600}) ~0,1. Затем супернатант переносили в стерильные планшеты (по 300 мкл в лунку) и определяли жизнеспособ-

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	5'–3' последовательность праймеров
MurI-up-F	5'-ATTGAATTCAGGGTTGGTGATTGCTTG-3'
MurI-up-R	5'-ATTGGATCCCAACTGAGTTTTCCTTTG-3'
MurI-down-F	5'-ATTGGATCCATGAATTTAAAGATAATGAC-3'
MurI-down-R	5'-TATCTAGAAATCATCCGCAAGAACCATC-3'
MurI-F	5'-GCGCCATGGATGGATAATAGACCAATTG-3'
MurI-R	5'-GCTACTCGAGTAGGTCAATATGCTCCAC-3'

ность клеток с использованием прибора Bioscreen machine («Thermo Lab systems», США). В качестве добавок в образцы мутантного штамма *S. iniae* Δ *MurI* вносили 14 мМ и 16 мМ D-глутаминовой кислоты. Через определенные промежутки времени измеряли поглощение образцов в соответствии с протоколом подготовки кривых роста, полученных на Bio-screen.

Определение жизнеспособности бактерий. Для того чтобы различить клетки с нативными мембранами и клетки с нарушенной целостностью мембран, использовали набор LIVE/DEAD® Bac Light™ Bacterial Viability Kit («Molecular Probes™», «Life Technologies», США) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 6 мкл смеси компонентов А и В красителя добавляли в каплю бактериальной суспензии после продолжительного голодания клеток по D-глутаминовой кислоте (20 и 30 ч) и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем регистрировали флуоресценцию с использованием эпифлуоресцентного микроскопа [14].

Определение выживаемости клеток в цельной крови. К разведенной, находящейся в лог-фазе, бактериальной культуре дикого типа и мутантного штамма Δ *MurI* (100 мкл) с поглощением при 600 нм (A_{600}) 0,5 добавляли к 300 мкл свежей гепаринизированной крови (натриевая соль гепарина, «Sigma–Aldrich», США), полученной от трех различных китайских осетров *A. sinensis*, и инкубировали при 35 °С при покачивании на шейкере в течение 2 ч, после чего раскапывали в ячейки микропланшет с агаром TSYE. Процент живых бактерий рассчитывали по формуле: $(\text{KOE}_{\text{после совместной инкубации}} / \text{KOE}_{\text{в исходном инокуляте}}) \times 100\%$, где КОЕ – колониеобразующие единицы [15]. Для получения отрицательного контроля в гепаринизированную кровь рыб прямо вводили 100 мкл PBS.

Конструирование плазмиды для экспрессии MurI. Ген *MurI* был амплифицирован с помощью следующих праймеров MurI-F и MurI-R (табли-

ца). Праймеры конструировали в соответствии с последовательностью генома штамма *S. iniae* 89353 (код доступа CP017953.1 в базе данных NCBI). Продукт ПЦР очищали и клонировали в вектор клонирования pMD19-T («Takara», Китай), проверяли секвенирование и переваривали с помощью ферментов рестрикции *NcoI* и *XhoI*, затем клонировали в вектор экспрессии pET-25b («Novagen», Германия). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей глутамат-рацемаз из различных видов бактерий проводили с помощью программы Clustal Omega.

Экспрессия и очистка белка MurI. Штамм *E. coli* BL 21 (DE3) был трансформирован плазмидой pET25b-MurI. Когда поглощение при 600 нм (A_{600}) достигало значения 0,5, проводили сверхэкспрессию белка путем добавления 1 мМ IPTG и инкубировали в течение ночи при 16 °С. Клетки лизировали ультразвуком в буфере, содержащем 50 мМ NaH_2PO_4 , pH 8,0, 300 мМ NaCl и 10 мМ имидазола, затем центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин. Полученный супернатант собирали и очищали с использованием колонки Ni-NTA («Qiagen», Германия), затем диализовали против фосфатного солевого буфера (PBS, phosphate-buffered saline, pH 7,4). Чистоту белка и его концентрацию определяли с помощью электрофореза в SDS-ПААГ и набора для определения белка с использованием бицинониновой кислоты BCA protein assay kit («Takara», Китай) соответственно.

Определение активности MurI. Примерно по 200 мл культуры дикого типа и мутантной культуры Δ *MurI* в культуральной среде LB в присутствии D-глутаминовой кислоты и без нее инкубировали при 30 °С до достижения поглощения при 600 нм (A_{600}), равного 0,7. Клетки собирали путем центрифугирования, дважды промывали, концентрировали 25× в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 8,0) и обрабатывали ультразвуком в водяной бане со льдом и солью. Соникацию проводили в течение 2 мин при 80% выходной мощности и 50% рабочем цикле. Полученные активные клеточные экстракты центрифугировали при 4 °С в течение 20 мин при 10 000 g и диализовали против 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Рацемизацию MurI проводили с использованием в качестве субстрата D-глутамата в реакционной смеси, содержащей 100 мкл 200 мМ Tris-HCl буфера, pH 8,5, 2 мМ дитиотрейтола (DTT) и 12 мМ D-глутаминовой кислоты. Запуск реакции производили путем добавления фермента, и затем инкубировали при 35 °С в течение 10 мин. Реакцию завершали добавлением 30 мкл 2 М HCl, помещали на 2 мин в лед и нейтрализовали добавлением 30 мкл 2 М NaOH. Далее осадки удаляли центрифугированием при 1400 об./мин в

течение 5 мин. Продукт реакции рацемизации (L-глутаминовая кислота) определяли с помощью набора для анализа L-глутамата, L-glutamate Assay Kit («Megazyme», США) в соответствии инструкциями производителя. Набор содержал L-глутаматдегидрогеназу, диафоруазу, НАДН и иодонитротетразолий хлорид (INT). Поглощение при 492 нм измеряли с помощью спектрофотометра для микропланшет Epoch microplate spectrophotometer («Biotech», США).

Биохимические свойства MurI из *S. iniae*. Оптимальное значение температуры для максимальной активности MurI определяли при различных значениях температуры (10, 20, 30, 35, 40 и 50 °C). В то время как термическую стабильность определяли путем инкубации фермента в течение 2 ч при 30, 35, 40 и 50 °C, остаточную активность фермента через различные интервалы времени измеряли в соответствии с условиями определения активности фермента. Используя в качестве 100% активность фермента в 0 ч рассчитывали относительную активность фермента. В то время как оптимальный pH MurI определяли при оптимальной температуре в 50 mM Tris-HCl буферах (pH 6–12), стабильность фермента при различных значениях pH исследовали при инкубации фермента в течение 2 ч при трех значениях pH (7, 8,5 и 10). Относительную активность образца рассчитывали, используя в качестве 100% активность образца при 0 ч. Субстратную специфичность также определяли в стандартной реакционной смеси, содержащей 50 mM Tris-HCl буфер (pH 8,5), 2 mM DTT и различные концентрации субстратов (L/D-глутаминовая кислота, L/D-аспарагиновая кислота, L/D-гистидин и L/D-аланин). Реакционную смесь инкубировали при 35 °C в течение 10 мин, 40 мкл аликвоты реакционной смеси обрабатывали 280 мкл смеси 0,4 M борной кислоты, pH 9,0, 0,1% N-терт-бутилокси-карбонил-L-цистеина («Sigma», США) и 0,1% О-фталевого альдегида («Thirumalai Chemicals Limited», Индия) [16]. Кроме того, ионы металлов и некоторые химические соединения в конечной концентрации 10 mM также были добавлены в реакционную смесь для рацемизации, и реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин. Остаточную активность фермента определяли при 35 °C в течение 10 мин согласно условиям стандартного метода определения активности фермента.

Статистическая обработка полученных данных. Статистический анализ был осуществлен с использованием программ SPSS 16.0 («SPSS Inc.», США) и Prism software program 7.0 («GraphPad Software, Inc.», США). Значения *p* были рассчитаны с использованием критерия Стьюдента. Значения *p* < 0,05 и < 0,01 рассмат-

ривались как статистически достоверные и высоко статистически достоверные соответственно. Результаты, полученные в результате проведения по крайней мере трех независимых экспериментов, представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биоинформатический анализ гена, кодирующего глутамат-рацемазу. В соответствии с данными по геномной последовательности *S. iniae*, штамм 89353 (код доступа CP017952) в клетках *S. iniae* имеется один ген глутамат-рацемазы. Этот ген с открытой рамкой считывания длиной 795 п.н. кодирует белок, содержащий 265 аминокислотных остатков. Ген был секвенирован и размещен на сайте NCBI под кодом доступа MN385365. В сравнении с родственными белками из *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *B. anthracis*, *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium tuberculosis* гомология его последовательности составляет 80,6; 78,4; 77,6; 75; 50,5; 40,38 и 38,40% соответственно. Множественное выравнивание показало, что функционально значимые остатки цистеина в активном центре фермента MurI из *S. iniae* также являются консервативными. В этом ферменте это аминокислотные остатки Cys73 и Cys186, которые соответствуют Cys 70 и Cys 178 в MurI из *Aquifex pyrophilus* и остаткам Cys 73 и Cys 184 в MurI из *Lactobacillus fermenti* соответственно (рис. S1 в Приложении) [17].

Конструирование мутантного (в результате делеции гена *MurI*) штамма. Плазмида pMZ1 была трансформирована в *S. iniae* HNM-1 с помощью электропорации, и трансформанты, несущие плазмиду pMZ1, были отобраны в агаре LB, содержащем канамицин. Размещение трансформированных клеток в агаре с добавлением 10% (w/v) сахарозы и 16 ммоль/л D-глутаминовой кислоты привело к появлению изолированных колоний, у которых отсутствовали чувствительные к действию канамицина последовательности pK18mobsacB и которые представляли собой как культуру неизмененного дикого типа, так и мутантную культуру, не содержащую ген *MurI*. Делеция гена была подтверждена с помощью ПЦР и секвенирования, продукт ПЦР мутантных клеток был меньше продукта ПЦР клеток дикого типа (рис. S2, а в Приложении). Кроме того, при проведении ПЦР с использованием специфических праймеров ген *MurI* не был обнаружен (рис. S2, b в Приложении).

Ген *MurI* необходим для поддержания жизнеспособности клеток *S. iniae*. Мутантные клетки

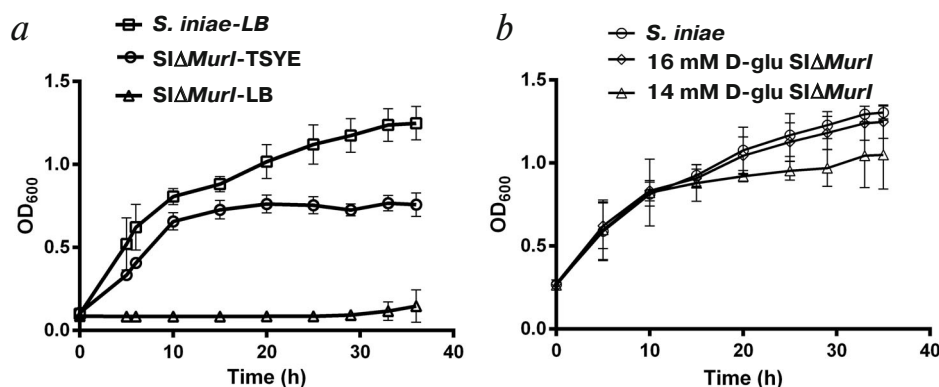


Рис. 1. Кривые роста мутантных клеток *S. iniae* Δ *MurI* и клеток дикого типа. *a* – Рост *S. iniae* Δ *MurI* в среде TSYE и LB. В качестве контроля служат клетки *S. iniae* дикого типа, культивируемые в среде LB. *b* – В среду роста мутантного штамма *S. iniae* Δ *MurI* добавляли 14 мМ и 16 мМ D-глутаминовой кислоты. SI – *S. iniae*, Δ *MurI* – Мутантный штамм *S. iniae* с делецией гена *MurI*

штамма *S. iniae* Δ *MurI* образуют маленькие колонии в чашках с агаром TSYE в сравнении со штаммом дикого типа, и они не способны расти в среде LB без добавления глутаминовой кислоты. Следует подчеркнуть, что мутантный штамм был способен расти в среде TSYE без добавления D-глутаминовой кислоты, хотя и с более низкой скоростью в сравнении со штаммом дикого типа (рис. 1, *a*). Добавление 16 мМ D-глутаминовой кислоты в среду LB приводило к значительному повышению жизнеспособности мутантных клеток (рис. 1, *b*). Поэтому можно считать, что ген *MurI* необходим для выживания клеток *S. iniae*.

Голодание по D-глутаминовой кислоте приводит к нарушению целостности клеточной стенки. Для оценки повреждения клеточной стенки мутантных по гену *MurI* клеток во время их культивирования был использован набор LIVE/DEAD BacLight kit («Invitrogen», США). Этот набор содержит два красителя, пропидиум иодид (PI) и SYTO9, которые окрашивают нуклеиновые кислоты. Зеленый флуоресцирующий краситель SYTO9 может проникать внутрь клеток, и он используется для определения общего количества клеток, тогда как красный флуоресцирующий краситель PI проникает только в клетки, у которых повреждена цитоплазматическая мембрана [18]. Общее количество клеток было определено с помощью метода эпифлуоресцентного анализа, проведенного после голодания по D-глутаминовой кислоте в течение 0, 20 и 30 ч (рис. 2, *a*). Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки обоих типов находятся в интактном состоянии в среде, дополненной D-глутаминовой кислотой в момент времени 0 ч. Однако через 20 ч голодания по D-глутаминовой кислоте значительно возрастает количество поврежденных клеток мутантного штамма, тогда как клетки дикого типа остаются интактными (рис. 2, *b*).

Со временем степень нарушения целостности клеточной стенки повышается в связи с длительным отсутствием D-глутаминовой кислоты.

Полученные нами результаты подтверждают значимость гена *MurI* для способности клеток *S. iniae* выживать и для целостности их клеточной стенки. Глутамат-рацемезаза, кодируемая геном *MurI* из *S. iniae*, крайне необходима для поддержания целостности клеточной стенки, и этот ген может рассматриваться в качестве полезной мишени для разработки новых лекарственных препаратов против инфекции, вызванной *S. iniae*.

Мутантный штамм *S. iniae* Δ *MurI* в крови рыб демонстрирует ослабленную вирулентность по сравнению со штаммом дикого типа. Одним из важнейших механизмов действия фагоцитов является генерация активных форм кислорода («окислительный взрыв»). Клетки штамма Δ *MurI* выращивали в крови рыб в течение 2 ч. В качестве контроля использовали клетки дикого типа и клетки мутантного штамма *S. iniae* Δ *MurI*, росшие в среде, дополненной D-глутаминовой кислотой (C Δ *MurI*). Мутантные клетки *S. iniae* Δ *MurI* утратили устойчивость к врожденному иммунному ответу, так как имеют более низкую выживаемость (20%) в крови рыб по сравнению с диким типом. Полученные результаты показали, что бактерии штамма Δ *MurI* имеют более низкую жизнеспособность по сравнению с диким типом (рис. 3). Способность бактерий избегать воздействия врожденного иммунного ответа является показателем их вирулентности, которая означает их способность наносить непоправимый ущерб организму, в который они попали [19].

Мутантный штамм *S. iniae* Δ *MurI* не обладает глутамат-рацемезазной активностью. Были получены грубые клеточные экстракты клеток штамма дикого типа и мутантного штамма, и в них была определена ферментативная активность *MurI*.

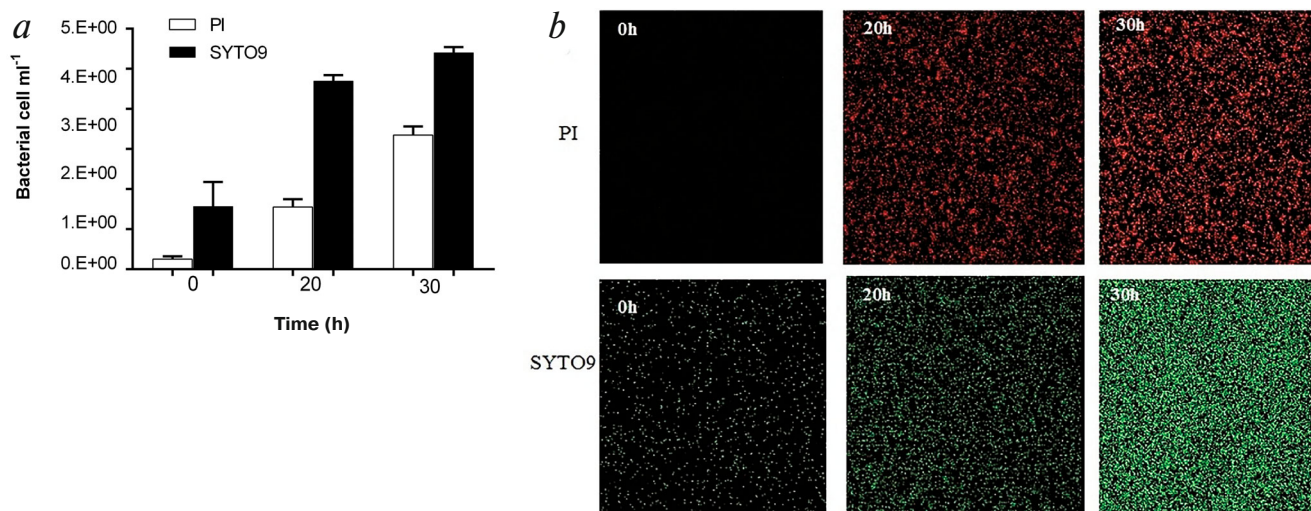


Рис. 2. Влияние голодания клеток по D-глутаминовой кислоте на проницаемость клеточной стенки, определенное в результате двойного флуоресцентного окрашивания с помощью набора «LIVE/DEAD BacLight kit» при 0, 20 и 30 ч голодания. *a* – Число флуоресцирующих благодаря SYTO9 бактерий (черные столбики) и число флуоресцирующих благодаря PI бактерий (белые столбики) было определено по подсчетам в шести полях зрения. Результаты были выражены в виде числа клеток в одном мл. *b* – Верхняя панель: красные флуоресцентные сигналы (PI) мутантных клеток с поврежденными цитоплазматическими мембранами. Нижняя панель: зеленые флуоресцентные сигналы (SYTO9) клеток дикого типа с интактной клеточной стенкой во время пролонгированного голодания по D-глутаминовой кислоте.

С цветным вариантом рис. 2, *b* можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

Клетки дикого типа росли как в присутствии D-глутаминовой кислоты, так и без нее; при этом показывали примерно одинаковые уровни активности MurI. Напротив, не удалось обнаружить какую-либо активность MurI в экстрактах мутантного штамма Δ MurI, приготовленных из клеток, выросших в присутствии или в отсутствие D-глутаминовой кислоты (рис. 4).

Экспрессия и выделение MurI из клеток *S. iniae*. Глутамат-рацемезаза (SIMurI) из клеток *S. iniae* была очищена до гомогенного состояния с ис-

пользованием Ni-агарозной аффинной хроматографии. С помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS было определено, что рекомбинантный белок имел относительную молекулярную массу 30 кДа (рис. S3 в Приложении), что сходно с рассчитанной молекулярной массой 30 кДа в случае MurI из *Pediococcus pentosaceus* [20], в то время как MurI, выделенный из клеток *Lactobacillus plantarum* NC8, имел молекулярную массу 40 кДа [21].

Влияние температуры и pH на активность фермента. Предварительные эксперименты по сравнению свойств рекомбинантных белков до и после прикрепления на N-конце полипептидной цепи полигистидинового пептида, удаляемого тромбином, показали, что присутствие этого пептида не оказывает особого влияния на активность и свойства SIMurI [22].

Оптимальная температура для активности MurI из *S. iniae* оказалось равной 35 °C (рис. 5, *a*), в то время как в случае MurI из *L. plantarum* NC8 значение температурного оптимума достигало 50 °C [18, 19]. Оптимальное значение pH для MurI из *S. iniae* равно 8,5 (рис. 5, *b*), и это значение находится внутри диапазона оптимальных значений pH для MurI охарактеризованных ранее [18, 19, 21, 22].

Фермент сохранял свою активность почти на уровне 50% после инкубации в течение 1–30 ч при температурах 30–40 °C (рис. 5, *c*) и интервале pH 7,0–10,0 (рис. 5, *d*).

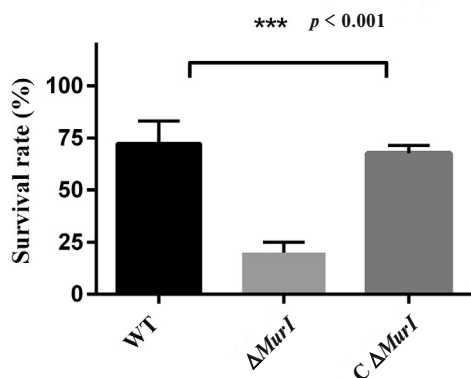


Рис. 3. Выживаемость клеток мутантного штамма *S. iniae* Δ MurI в крови рыб. Клетки этого штамма *S. iniae* обладают меньшей выживаемостью в крови рыб в сравнении с клетками дикого типа. WT – штамм дикого типа, Δ MurI – мутантный по гену *MurI* штамм, C Δ MurI – мутантный по гену *MurI* штамм при добавлении D-глутаминовой кислоты. *** $p < 0,001$

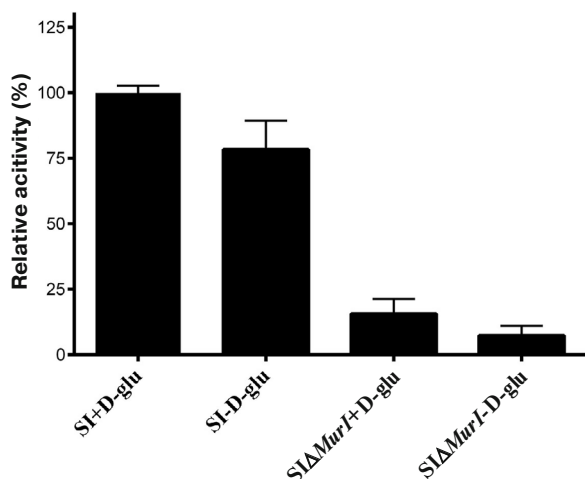


Рис. 4. Определение специфической активности глутамат-рацемазы в экстрактах клеток *S. iniae*. Клетки мутантного штамма $\Delta MurI$ не обладают активностью MurI

Влияние ионов металлов и химических соединений на активность фермента. Некоторые ионы металлов могут ингибировать активность MurI. Этот фермент показывал остаточную активность, равную 4,6; 17; 3; 7 и 23% в присутствии Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} и Pb^{2+} соответственно. Гидроксиламин снижал активность фермента на 73%, в то время как дитиотрейтол и ЭДТА, напротив, повышали его активность на 68 и 43% соответственно (рис. S4 в Приложении). Кроме того, было показано, что активность MurI из *Burkholderia cenocepacia* подавляется ионами Mn^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} [23].

Субстратная специфичность. Известно, что глутамат-рацемеза отличается высокой субстратной специфичностью. При использовании в ка-

честве субстратов аспарагиновой кислоты гистидина и аланина дальнейший анализ с использованием ВЭЖХ не выявил никаких продуктов рацемизации. По сути, в плане субстратной специфичности MurI из *S. iniae* напоминает другие ранее охарактеризованные MurI [20, 21, 24, 25].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

S. iniae — это патогенная бактерия, которая угрожает как здоровью человека, так и индустрии морских продуктов, приводя к огромным экономическим потерям во всем мире [26]. В настоящее время вакцинация, как правило, считается эффективным методом борьбы с частыми вспышками стрептококковой инфекции, и было получено несколько эффективных кандидатных субъединиц вакцины [27]. Штамм *S. iniae* HNM-1 был выделен из инфицированных китайских осетров *A. Sinensis* после вспышки болезни, которая спровоцировала высокую смертность среди рыб. В условиях возрастающей угрозы резистентности к антибиотикам и появления штаммов, устойчивых к лекарственным препаратам, поиск эффективных лекарственных мишеней и разработка новых антибиотиков широкого спектра действия являются верными подходами к решению этой проблемы [28].

Глутамат-рацемазы являются ферментами, которые имеют важное значение при синтезе пептидогликана, необходимого для создания клеточной стенки бактерий [2]. Необходимость в гене *MurI* является сложным вопросом, ответ на который зависит от биологического вида. Ген

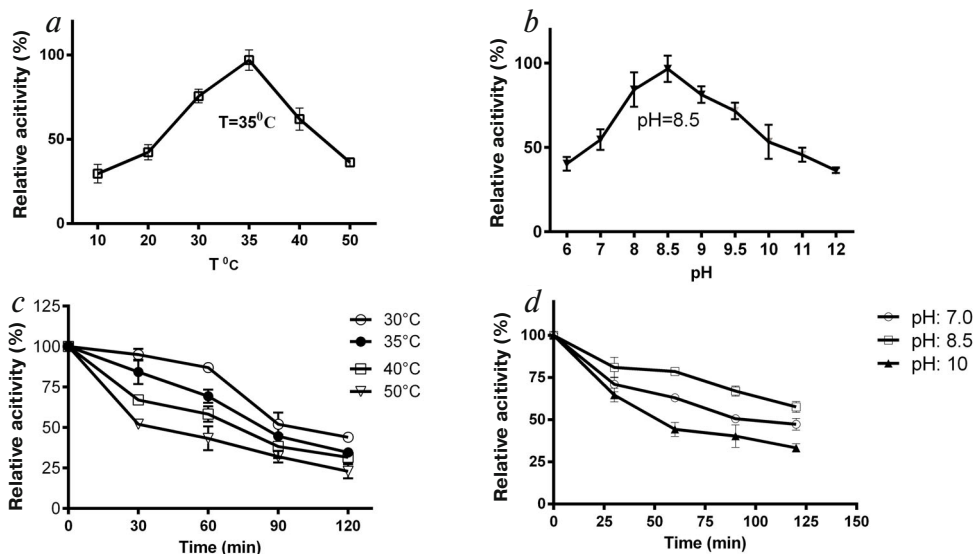


Рис 5. Стабильность MurI при различных значениях температуры и pH. a — Оптимальное значение температуры — 35 °С. b — Оптимальное значение pH — 8,5. c — Стабильность при различных значениях температуры. d — Стабильность при различных значениях pH

MurI необходим для роста клеток *E. coli* и *S. pneumoniae*, геномы которых содержат только один ген *MurI* [29]. Нокаут какого-либо гена глутамат-рацемазы в клетках *B. anthracis* (*racE1* и *racE2*) не оказывает заметного влияния на скорость роста бактерий, в то время как делеция обоих генов (*racE1* и *racE2*) приводит к образованию мутантных штаммов, которые являются нежизнеспособными [8]. Кроме того, бактерии, такие как *S. haemolyticus* и *B. sphaericus*, которые содержат трансферазы D-аминокислот, могут приводить к образованию значительных количеств D-глутаминовой кислоты из D-аланина, что может восполнить недостаток этого вещества в мутантных клетках, в которых произошла делеция гена *MurI* [30]. Было показано, что *MurI* является незаменимым геном у *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* [31–33].

С помощью биоинформатических методов было показано, что в клетках *S. iniae* обнаруживается только один ген глутамат-рацемазы, который кодирует функционально активный фермент, высокоспецифичный к своему субстрату, а оптимальные значения pH и температуры этой глутамат-рацемазы равны 8,5 и 35 °C соответственно. Больше генов, которые кодируют аминотрансферазы D-аминокислот в клетках *S. iniae*, не выявлено. Некоторые ионы металлов способны ингибировать ферментативную активность этой глутамат-рацемазы. Специфичность и различия в действии ионов металлов на активность *MurI* различных биологических видов свидетельствует о различиях в первичной структуре фермента. Таким образом, крайне важно очистить и охарактеризовать *MurI* из различных патогенных организмов, чтобы обеспечить более полное понимание их универсальных особенностей, которые могут быть использованы для скрининга новых ингибиторов. Однако для того чтобы ген мог быть использован в качестве мишени для создания новых лекарств, он должен быть необходим для выживания бактерий. Поскольку необходимость в гене *MurI* для выживания бактерий не является универсальной, чтобы установить значение этого гена, потребуется изучить множество различных видов бактерий [30].

Удаление гена *MurI* из клеток *S. iniae* было сложной задачей. Но изменив методику путем повышения концентрации субстрата (D-глутаминовая кислота) и используя более высокие значения напряжения для осуществления трансформации, ее удалось решить [34]. Кроме того, было показано, что поглощение D-глутамата бактериями может быть достигнуто при выделении мутантного штамма Δ *MurI*, содержащего мутацию, позволяющую увеличить транспорт D-глутамата через плазматическую мембрану [31]. Мутантный штамм *S. iniae* Δ *MurI* не жизнеспособен

в культуральной среде LB без добавки D-глутаминовой кислоты. Интересно, что он смог расти в среде TSYE, но с меньшей скоростью по сравнению со штаммом дикого типа. Способность мутантного по гену *MurI* штамма расти в среде TSYE в отсутствие D-глутаминовой кислоты обусловлено присутствием в ней глюкозы и соли, которые обеспечивают осмотическую стабилизацию и защищают мутантные клетки от разрушения. Было показано, что бактерии с нарушенной клеточной стенкой обычно могут расти в культуральной среде, содержащей осмопротекторы, такие как глицерин, глюкозу и соли [35]. Добавление 16 mM D-глутаминовой кислоты приводило к тому, что мутантный штамм начинал расти со скоростью, почти достигающей скорость роста штамма дикого типа.

Синтез D-глутаминовой кислоты имеет большое значение для формирования клеточной стенки, и поэтому глутамат-рацемаза может служить мишенью для направленного действия новых антибиотиков [36]. Ауксотрофные по D-глутаминовой кислоте штаммы, полученные в результате инактивации гена *MurI* и гена, кодирующего трансминазу D-аминокислот, также могут быть использованы в качестве эффективных аттенуированных живых бактериальных вакцин. Cabral et al. [37] получили такие D-глутамат-ауксотрофные вакцины против трех патогенов человека: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Ауксотрофные вакцины, полученные на основе штамма *P. aeruginosa*, запускали соответствующие клеточные иммунные ответы и образование специфических перекрестно реагирующих антител в вакцинированных мышах и способствовали их долгосрочному выживанию в условиях их инфицирования летальными дозами *P. aeruginosa*. Эти вакцины также быстро выводились из организма хозяина без возникновения заболевания [37, 38].

Клетки *S. iniae* содержат один ген функциональной глутамат-рацемазы, и нет ни одного гена аминотрансфераз D-аминокислот. В ходе нашей работы было показано, что инактивация гена *MurI* в клетках *S. iniae* оказывает влияние на выживаемость мутантных клеток и их вирулентные свойства, что, в общем, подчеркивает значение и жизненную необходимость в этом ферменте для выживаемости *S. iniae*. Полученные нами результаты также позволяют предположить, что мутантный штамм *S. iniae* Δ *MurI* может быть использован в дальнейших работах в качестве живой аттенуированной вакцины или использовать фермент в качестве уязвимой мишени для разработки антибиотиков, направленных против патогенной бактерии *S. iniae*.

Финансирование. Выполнение данной работы было поддержано Фондом естественных наук провинции Хэбэй (Natural Science Foundation of Hebei Province, грант № C2019205044), Фондом поддержки молодых ученых департамента образования провинции Хэбэй (Outstanding Youth Foundation of Department of Education of Hebei Province, грант № YQ2014026), Исследовательским фондом нормального университета провинции Хэбэй (the Research Fund of Hebei Normal University, грант № L2016Z03), Государственной центральной лабораторией изучения патогенов и биобезопасности (State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity при Академии военно-медицинской науки, грант № SKLPBS1529) и программой научно-исследовательских и технологических работ нормаль-

ного университета провинции Хэбэй (the Science and Technology Research Project of Hebei Normal University, грант № ZD2018070).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты над лабораторными животными были проведены в строгом соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве по уходу и использованию лабораторных животных провинции Хэбэй, Китай (Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals of Hebei Province of China). Протокол экспериментов над лабораторными животными был одобрен комитетом по наблюдению за лабораторными животными нормального университета провинции Хэбэй (Animal Monitoring Committee of Hebei Normal University).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mehboob, S., Guo, L., Fu, W., Mittal, A., Yau, T., Truong, K., Johlfs, M., Long, F., Fung, L.W.-M., and Johnson, M.E. (2009) Glutamate racemase dimerization inhibits dynamic conformational flexibility and reduces catalytic rates, *Biochemistry*, **48**, 7045–7055, doi: 10.1021/bi9005072.
- Rogers, H.J., Perkins, H.R., and Ward, J.B. (1980) *Microbial cell walls and membranes*, (Chapman and Hall), Springer, London, pp. 72–104, doi: 10.1007/978-94-011-6014-8.
- Prosser, G.A., Rodenburg, A., Khoury, H., de Chiara, C., Howell, S., Snijders, A.P., and de Carvalho, L.P.S. (2016) Glutamate racemase is the primary target of β -chloro-D-alanine in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 6091–6099, doi: 10.1128/AAC.01249-16.
- Whalen, K.L., Pankow, K.L., Blanke, S.R., and Spies, M.A. (2009) Exploiting enzyme plasticity in virtual screening: high efficiency inhibitors of glutamate racemase, *ACS Med. Chem. Lett.*, **1**, 9–13, doi: 10.1021/ml900005b.
- Fisher, S.L. (2008) Glutamate racemase as a target for drug discovery, *Microb. Biotechnol.*, **1**, 345–360, doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00031.x.
- Dean, S.F., Whalen, K.L., and Spies, M.A. (2015) Biosynthesis of a novel glutamate racemase containing a site-specific 7-hydroxycoumarin amino acid: enzyme–ligand promiscuity revealed at the atomistic level, *ACS Cent. Sci.*, **1**, 364–373, doi: 10.1021/acscentsci.5b00211.
- Agnew, W., and Barnes, A.C. (2007) *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination, *Vet. Microbiol.*, **122**, 1–15, doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.002.
- Oh, S.-Y., Richter, S.G., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2015) Glutamate racemase mutants of *Bacillus anthracis*, *J. Bacteriol.*, **197**, 1854–1861, doi: 10.1128/JB.00070-15.
- Doublet, P., Van Heijenoort, J., Bohin, J.-P., and Mengin-Lecreulx, D. (1993) The *murI* gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity, *J. Bacteriol.*, **175**, 2970–2979, doi: 10.1128/jb.175.10.2970-2979.1993.
- Pucci, M.J., Thanassi, J.A., Ho, H.T., Falk, P.J., and Dougherty, T.J. (1995) *Staphylococcus haemolyticus* contains two D-glutamic acid biosynthetic activities, a glutamate racemase and a D-amino acid transaminase, *J. Bacteriol.*, **177**, 336–342, doi: 10.1128/jb.177.2.336-342.1995.
- Fotheringham, I.G., Bledig, S.A., and Taylor, P.P. (1998) Characterization of the genes encoding D-amino acid transaminase and glutamate racemase, two D-glutamate biosynthetic enzymes of *Bacillus sphaericus* ATCC 10208, *J. Bacteriol.*, **80**, 4319–4323.
- Vance, N.R., Witkin, K.R., Rooney, P.W., Li, Y., Pope, M., and Spies, M.A. (2018) Elucidating the catalytic power of glutamate racemase by investigating a series of covalent inhibitors, *ChemMedChem*, **13**, 2514–2521, doi: 10.1002/cmdc.201800592.
- Ferain, T., Hobbs, J., Richardson, J., Bernard, N., Garmyn, D., Hols, P., Allen, N., and Delcour, J. (1996) Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*, *J. Bacteriol.*, **178**, 5431–5437, doi: 10.1128/jb.178.18.5431-5437.1996.
- Berney, M., Hammes, F., Bosshard, F., Weilenmann, H.-U., and Egli, T. (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 3283–3290, doi: 10.1128/AEM.02750-06.
- Buchanan, J.T., Colvin, K.M., Vicknair, M.R., Patel, S.K., Timmer, A.M., and Nizet, V. (2008) Strain-associated virulence factors of *Streptococcus iniae* in hybrid-striped bass, *Vet. Microbiol.*, **131**, 145–153, doi: 10.1016/j.vetmic.2008.02.027.
- Hashimoto, A., Nishikawa, T., Oka, T., Takahashi, K., and Hayashi, T. (1992) Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **582**, 41–48.
- Hwang, K.Y., Cho, C.-S., Kim, S.S., Sung, H.-C., Yu, Y.G., and Cho, Y. (1999) Structure and mechanism of glutamate racemase from *Aquifex pyrophilus*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **6**, 422, doi: 10.1038/8223.
- Stocks, S. (2004) Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight, *Cytometry A*, **61**, 189–195, doi: 10.1002/cyto.a.20069.
- Liu, G.Y., Essex, A., Buchanan, J.T., Datta, V., Hoffman, H.M., Bastian, J.F., Fierer, J., and Nizet, V. (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, *J. Exp. Med.*, **202**, 209–215, doi: 10.1084/jem.20050846.
- Nakajima, N., Tanizawa, K., Tanaka, H., and Soda, K. (1986) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the glutamate racemase gene from *Pediococcus pentosaceus*, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2823–2830, doi: 10.1271/bbb1961.50.2823.
- Böhmer, N., Dautel, A., Eisele, T., and Fischer, L. (2013) Recombinant expression, purification and characterisation of the native glutamate racemase from *Lactobacillus plantarum* NC8, *Protein Express. Purif.*, **88**, 54–60, doi: 10.1016/j.pep.2012.11.012.
- Dodd, D., Reese, J.G., Louer, C.R., Ballard, J.D., Spies, M.A., and Blanke, S.R. (2007) Functional comparison of the two

- Bacillus anthracis* glutamate racemases, *J. Bacteriol.*, **189**, 5265–5275, doi: 10.1128/JB.00352-07.
23. Israyilova, A., Buroni, S., Forneris, F., Scoffone, V.C., Shixaliyev, N.Q., Riccardi, G., and Chiarelli, L.R. (2016) Biochemical characterization of glutamate racemase – a new candidate drug target against *Burkholderia cenocepacia* infections, *PLoS One*, **11**, e0167350, doi: 10.1371/journal.pone.0167350.
 24. Ashiuchi, M., Tani, K., Soda, K., and Misono, H. (1998) Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly- γ -glutamate, *J. Biochem.*, **123**, 1156–1163, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022055.
 25. Potrykus, J., Flemming, J., and Bearne, S.L. (2009) Kinetic characterization and quaternary structure of glutamate racemase from the periodontal *Anaerobe Fusobacterium nucleatum*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **491**, 16–24, doi: 10.1016/j.abb.2009.09.009.
 26. Sheng, X., Liu, M., Liu, H., Tang, X., Xing, J., and Zhan, W. (2018) Identification of immunogenic proteins and evaluation of recombinant PDHA1 and GAPDH as potential vaccine candidates against *Streptococcus iniae* infection in flounder (*Paralichthys olivaceus*), *PLoS One*, **13**, e0195450, doi: 10.1371/journal.pone.0195450.
 27. Kim, M.S., Choi, S.H., and Kim, K.H. (2015) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Streptococcus iniae* shows potential as a subunit vaccine against various Streptococcal species, *J. Fish Pathol.*, **28**, 9–15, doi: 10.7847/jfp.2015.28.1.009.
 28. Muhammad, M., Li, Y., Gong, S., Shi, Y., Ju, J., Zhao, B., and Liu, D. (2019) Purification, characterization and inhibition of alanine racemase from a pathogenic strain of *Streptococcus iniae*, *Pol. J. Microbiol.*, **68**, 331–341, doi: 10.33073/pjm-2019-036.
 29. Song, J.-H., Ko, K.S., Lee, J.-Y., Baek, J.Y., Oh, W.S., Yoon, H.S., Jeong, J.-Y., and Chun, J. (2005) Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis, *Mol. Cells*, **19**, 365–374.
 30. Kimura, K., Tran, L.-S.P., and Itoh, Y. (2004) Roles and regulation of the glutamate racemase isogenes, *racE* and *yrpC*, in *Bacillus subtilis*, *Microbiology*, **150**, 2911–2920, doi: 10.1099/mic.0.27045-0.
 31. Li, Y., Mortuza, R., Milligan, D.L., Tran, S.L., Strych, U., Cook, G.M., and Krause, K.L. (2014) Investigation of the essentiality of glutamate racemase in *Mycobacterium smegmatis*, *J. Bacteriol.*, **196**, 4239–4244, doi: 10.1128/JB.02090-14.
 32. Morayya, S., Awasthy, D., Yadav, R., Ambady, A., and Sharma, U. (2015) Revisiting the essentiality of glutamate racemase in *Mycobacterium tuberculosis*, *Gene*, **555**, 269–276, doi: 10.1016/j.gene.2014.11.017.
 33. Mortuza, R., Aung, H.L., Taiaroa, G., Opel-Reading, H.K., Kleffmann, T., Cook, G.M., and Krause, K.L. (2018) Overexpression of a newly identified d-amino acid transaminase in *Mycobacterium smegmatis* complements glutamate racemase deletion, *Mol. Microbiol.*, **107**, 198–213, doi: 10.1111/mmi.13877.
 34. Dougherty, T.J., Thanassi, J.A., and Pucci, M.J. (1993) The *Escherichia coli* mutant requiring D-glutamic acid is the result of mutations in two distinct genetic loci, *J. Bacteriol.*, **175**, 111–116, doi: 10.1128/jb.175.1.111-116.1993.
 35. Zhang, J., Liu, J., Ling, J., Tong, Z., Fu, Y., and Liang, M. (2016) Inactivation of glutamate racemase (MurI) eliminates virulence in *Streptococcus mutans*, *Microbiol. Res.*, **186**, 1–8, doi: 10.1016/j.micres.2016.02.003.
 36. Malapati, P., Krishna, V.S., Nallangi, R., Meda, N., Srilakshmi, R.R., and Sriram, D. (2018) Lead identification and optimization of bacterial glutamate racemase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 177–190, doi: 10.1016/j.bmc.2017.11.031.
 37. Cabral, M.P., García, P., Beceiro, A., Rumbo, C., Pérez, A., Moscoso, M., and Bou, G. (2017) Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy, *Nat. Commun.*, **8**, 15480, doi: 10.1038/ncomms15480.
 38. Tümmler, B. (2019) Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa*, *F1000Res.*, **8**, doi: 10.12688/f1000research.19509.1.

SIGNIFICANCE OF GLUTAMATE RACEMASE FOR THE VIABILITY AND CELL WALL INTEGRITY OF *Streptococcus iniae**

M. Muhammad^{1,2}, J. Bai¹, A. J. Alhassan³, H. Sule⁴, J. Ju¹, B. Zhao^{1**}, and D. Liu^{1**}

¹ College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China; E-mail: morui19-hebtu@qq.com, pqw1234@163.com

² Kano University of Science and Technology, Department of Biochemistry, Wudil, Nigeria

³ Bayero University, Department of Biochemistry, Kano, Nigeria

⁴ Bayero University Kano, Department of Medical Laboratory Science, Kano, Nigeria

Received June 14, 2019

Revised September 19, 2019

Accepted October 7, 2019

Streptococcus iniae is a pathogenic and a zoonotic bacterium responsible for human diseases and mortality of many fish species. Recently, this bacterium has demonstrated an increasing trend for antibiotics resistance, which has warranted a search for new approaches to tackle its infection. Glutamate racemase (MurI) is a ubiquitous enzyme of the peptidoglycan synthesis pathway that plays an important role in the cell wall integrity maintenance; however, the significance of this enzyme differs in different species. In this study, we knocked out the *MurI* gene in *S. iniae* in order to elucidate the role of glutamate racemase in maintaining cell wall integrity in this bacterial species. We also cloned, expressed, and purified MurI and determined its biochemical characteristics. Biochemical analysis revealed that the *MurI* gene in *S. iniae* encodes a functional enzyme with a molecular weight of 30 kDa, temperature optimum at 35°C, and pH optimum at 8.5. Metal ions, such as Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ and Zn²⁺, inhibited the enzyme activity. *MurI* was found to be essential for the viability and cell wall integrity of *S. iniae*. The optimal growth of the *MurI*-deficient *S. iniae* mutant can be achieved only by adding a high concentration of D-glutamate to the medium. Membrane permeability assay of the mutant showed an increasing extent of the cell wall damage with time upon D-glutamate starvation. Moreover, the mutant lost its virulence when incubated in fish blood. Our results demonstrated that the *MurI* knockout leads to the generation of *S. iniae* auxotroph with damaged cell walls.

Keywords: *Streptococcus iniae*, glutamate racemase, gene knockout, cell wall integrity biochemical characterizations