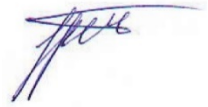


На правах рукописи



Гречишникова Елена Геннадьевна

**Генетические элементы кобальт-зависимой регуляции
транскрипции генов нитрилгидратазы в *Rhodococcus
rhodochrous*: выявление и использование для
конструирования биокатализаторов синтеза
N-замещённых акриламидов**

1.5.3. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии Геномного центра «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии» Курчатова комплекса НБИКС-природоподобных технологий (КК НБИКС-ПТ) НИЦ «Курчатowski институт».

Научный руководитель: **Лавров Константин Валерьевич**, кандидат биологических наук, заместитель начальника отдела промышленной микробиологии Геномного центра «Развитие генетических технологий для промышленной микробиологии» КК НБИКС-ПТ НИЦ «Курчатowski институт», г. Москва.

Официальные оппоненты: **Синицын Аркадий Пантелеймонович**, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, г. Москва;

Серебряный Всеволод Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории №2 Акционерного общества «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва.

Защита диссертации состоится 24 октября 2024 года, начало в 16:00, на заседании диссертационного совета 02.1.003.06 на базе НИЦ «Курчатowski институт» по адресу: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатowski институт» и на сайте www.nrcki.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 02.1.003.06
кандидат биологических наук



А.С. Жирник

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Бактерии рода *Rhodococcus* обладают ценными технологическими свойствами: механическая прочность клеточной стенки, высокая устойчивость к токсичным соединениям, органическим растворителям и тяжелым металлам, простота культивирования и высокая скорость роста при относительно низких температурах. Рекомбинантные штаммы этих микроорганизмов известны своей способностью синтезировать целевые белки в высоких внутриклеточных концентрациях, что делает эти бактерии перспективными для использования в биотехнологической промышленности.

В настоящее время генная инженерия бактерий *Rhodococcus* динамично развивается, однако набор генетических инструментов для конструирования рекомбинантных штаммов сильно ограничен. Одним из главных ограничивающих факторов является недостаток изученных систем экспрессии генов, при этом особый интерес вызывают системы, экспрессию которых можно регулировать путем изменения условий выращивания, например добавкой индуктора, и одновременно способные в условиях индукции обеспечивать высокий уровень синтеза целевого белка. Такие системы экспрессии необходимы для создания высокоактивных штаммов, которые могут выступать в качестве цельноклеточных биокатализаторов.

Биокаталитические способы синтеза органических веществ, то есть использование ферментов в качестве катализаторов процесса, являются альтернативой химическим способам синтеза, поскольку характеризуются более мягкими условиями проведения процессов. Как правило, биокаталитические синтезы происходят в водной среде при нормальном атмосферном давлении и при температурах в диапазоне 20-50 °С. Такие условия важны для получения химически лабильных органических веществ, так как предотвращают их деградацию в ходе синтеза и позволяют добиться более высоких выходов продуктов. Высокая селективность, присущая ферментам, также способствует более высоким выходам целевых веществ и снижению образования побочных продуктов. Важной особенностью биокаталитических синтезов является отсутствие необходимости в металлических катализаторах, следовые количества которых могут загрязнять получаемый продукт, делая его непригодным для дальнейшего использования, и требуя дорогостоящей процедуры очистки.

Всё вышесказанное значимо в случае получения акриловых мономеров, в том числе N-замещённых (одна из групп функционализированных мономеров). Их химическая лабильность связана с наличием реакционноспособной двойной связи, а использование металлических катализаторов для их синтеза приводит к снижению полимеризационной способности полученных мономеров. Так, получение акриламида из акрилонитрила, катализируемое ферментом нитрилгидратазой, позволяет избежать использования стадии медно-сернокислотного гидролиза и является одним из наиболее успешных биокаталитических процессов, реализованных в промышленности.

Функционализированные акриловые мономеры используются для модификации свойств водорастворимых акриловых полимеров, которые применяются в различных областях: очистке сточных вод, нефте- и газодобыче, сельском хозяйстве (применяются для улучшения аэрации почв), производстве красок, ткани и бумаги и т.д. N-замещённые акриламиды, составляющие важную группу функционализированных акриламидов, в настоящее время получают химическим синтезом из акрилоилхлорида и алкиламинов. Недостатками процесса являются использование токсичного акрилоилхлорида и взрывоопасной безводной акриловой кислоты, необходимой для получения акрилоилхлорида. Ранее была показана возможность получения N-замещённых акриламидов напрямую из акриламида биокаталитическим способом с помощью фермента ациламидазы, однако разработка промышленного биокаталитического способа синтеза N замещённых акриламидов требует создания высокоактивных штаммов-биокатализаторов.

Объектом исследования в настоящей работе является генетическая регуляция экспрессии генов нитрилгидратазы в штамме *Rhodococcus rhodochrous* M8 (штамм-биокатализатор синтеза акриламида), обеспечивающая синтез фермента нитрилгидратазы на уровне 40% от всех растворимых внутриклеточных белков. Такой уровень синтеза целевого белка позволяет считать данную систему экспрессии перспективной для синтеза других ферментов, в том числе ациламидазы для конструирования биокатализаторов синтеза функционализированных акриламидов на основе бактерий *Rhodococcus*.

Степень разработанности темы исследования

Для создания современных биокаталитических способов синтеза акриловых мономеров требуются клетки, способные продуцировать большое количество внутриклеточного растворенного целевого белка. Известны природные штаммы бактерий *Rhodococcus*, продуцирующие фермент нитрилгидратазу в количестве до 40% от всех внутриклеточных растворимых белков, что является уникальным уровнем для этих бактерий. Однако, на момент начала данного исследования не были известны генетические элементы (промотор, гены регуляторов и т.д.), обеспечивающие как такой высокий уровень синтеза белка, так и регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы. С другой стороны, рекомбинантные штаммы-биокатализаторы *Rhodococcus*, продуцирующие какие-либо другие целевые белки в количествах, сходных с продукцией нитрилгидратазы, также разработаны не были.

Исследуемая в данной работе кобальт-индуцируемая система экспрессии генов нитрилгидратазы была обнаружена в штамме *Rhodococcus rhodochrous* M8, биокатализаторе для получения акриламида. Работа направлена на выявление, изучение и использование генетических элементов, входящих в систему кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы.

Цели и задачи работы

Целями данной работы являются выявление и изучение генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы в штамме *Rhodococcus rhodochrous* M8, и использование этих элементов для экспрессии гена ациламидазы и для конструирования штаммов-биокатализаторов синтеза N-замещённых (функционализированных) акриламидов.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. выявить предполагаемые генетические элементы, вовлечённые в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы с помощью биоинформатического анализа генома;
2. разработать экспериментальную тест-систему для идентификации и изучения предполагаемых генетических элементов;
3. экспериментально идентифицировать генетические элементы и изучить их функционирование;

4. сконструировать на основе выявленных генетических элементов штаммы–биокатализаторы для синтеза N-замещённых (функционализированных) акриламидов.

Научная новизна

Идентифицированы генетические элементы, регуляторная область P_{nh569} и ген репрессора транскрипции *cbIA*, необходимые и достаточные для высокого уровня продукции нитрилгидратазы и для кобальт-зависимой регуляции транскрипции её генов в штаммах бактерий *Rhodococcus*, предложена модель механизма регуляции.

Показано, что регуляторная область генов нитрилгидратазы P_{nh569} протяжённостью 569 п.н. состоит из отдалённого на 405 п.н. от старт-кодона участка с кобальт-индуцируемым промотором и внутреннего беспромоторного участка с неизвестной функцией, существенного для высокой транскрипционной активности.

Показана эффективность использования ациламидазы в качестве репортёрного белка для изучения регуляции экспрессии генов.

Показана эффективность использования ациламидазы для конструирования высокоактивных штаммов-биокатализаторов синтеза N-замещённых (функционализированных) акриламидов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы связана с тем, что работа вносит вклад в знания о регуляции экспрессии генов в плохо изученных, но промышленно значимых бактериях *Rhodococcus rhodochrous*. Кроме того, уровень экспрессии генов нитрилгидратазы является одним из самых высоких уровней, известных для бактерий, и изучение механизмов регуляции этой экспрессии вносит вклад в знания о функционировании механизмов регуляции экспрессии такого уровня.

Практическая значимость работы связана с тем, что сконструированные высокоактивные биокатализаторы синтеза двух N-замещённых акриламидов, N-изопропилакриламида (ИПАА) и N,N-диметиламинопропилакриламида (ДМАПАА), создают основу для интенсификации производства и использования акриловых мономеров, что важно для разработки российских технологий и создания отечественного производства таких мономеров.

Методология и методы исследования

В работе использованы следующие методы: микробиологические (культивирование бактериальных штаммов), биоинформатические (анализ генома), генно-инженерные (конструирование экспрессионных кассет и рекомбинантных штаммов), биохимические (анализ ферментативной активности клеток), молекулярно-биологические (ПЦР, RT-qPCR), биокаталитический синтез N-замещённых акриламидами.

Положения, выносимые на защиту:

1. Фермент ациламидаза из *Rhodococcus qingshengii* TA37, обеспечивающий синтез N-замещённых акриламидами, был использован в качестве нового репортёрного белка для изучения транскрипционной активности регуляторной области генов нитрилгидратазы P_{nh569} в бактериях *Rhodococcus rhodochrous* и *Rhodococcus qingshengii*.

2. Регуляторная область P_{nh569} протяжённостью 569 п.н., необходимая для достижения максимального уровня экспрессии генов нитрилгидратазы, содержит отдалённый на 405 п.н. от старт-кодона участок с кобальт-регулируемым промотором и внутренний беспромоторный участок с неизвестной функцией, удаление которого значительно снижает её транскрипционную активность.

3. Кобальт-зависимая регуляция транскрипции генов нитрилгидратазы осуществляется с помощью продукта гена *cblA*, принадлежащего к ArgR семейству транскрипционных металло-регуляторов.

4. CblA является репрессором транскрипции генов нитрилгидратазы, дерепрессия транскрипции наблюдается в присутствии ионов кобальта и никеля.

5. Регуляторная область P_{nh569} проявляет высокую транскрипционную активность в бактериях *Rhodococcus qingshengii* и *Escherichia coli*.

6. На основе обнаруженных в ходе исследования генетических элементов P_{nh569} и *cblA* и бактерий *Rhodococcus rhodochrous* были сконструированы высокоактивные штаммы-биокатализаторы синтеза двух N-замещённых (функционализированных) акриламидами: N-изопропилакриламида и N,N-диметиламинопропилакриламида.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа была апробирована на межлабораторном семинаре ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» 23 декабря 2021 года.

Материалы диссертации докладывались на VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, Россия, 2015 г.), I Российском Микробиологическом Конгрессе (МО, г. Пущино, Россия, 2017 г.), XIX Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (ЛО, пос. Рощино, Россия, 2018 г.), международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, Россия, 2018 г.), школе-конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике» (МО, г. Пущино, Россия, 2018 г.), 2-м Российском Микробиологическом Конгрессе (г. Саранск, Россия, 2019 г.), Школе-конференции молодых учёных, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие» (МО, г. Пущино, Россия, 2022 г.), Курчатовской междисциплинарной молодёжной научной школе (г. Москва, Россия, 2023 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 6 статей в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и WoS.

Личный вклад автора

Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены лично Гречишниковой Е.Г. или при её непосредственном участии. Гречишникова Е.Г. участвовала в постановке задач, осуществляла планирование и проведение экспериментальной работы, а также обработку и интерпретацию полученных результатов. Гречишникова Е.Г. вместе с соавторами проводила подготовку статей по теме исследования к публикации в научных журналах.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов, списка

литературы, списка иллюстративного материала и двух приложений. Работа изложена на 203 страницах, включая 25 таблиц и 58 рисунков. Список литературы содержит 186 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Обоснована актуальность темы исследования, описана научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, поставлены цель и задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Глава 1. Обзор литературы

Приведен обзор научной литературы по теме исследования. Кратко рассмотрены основные области использования бактерий рода *Rhodococcus* в биотехнологии и возможность их применения в биокатализе. Проанализировано текущее развитие генно-инженерного инструментария для создания рекомбинантных штаммов родококков с высокопроизводительными системами экспрессии. Приведены сведения о штамме-биокатализаторе *R. rhodochrous* M8, в котором ранее была обнаружена уникальная кобальт-зависимая регуляция транскрипции генов нитрилгидратазы. Представлен обзор известных металло-зависимых систем регуляции транскрипции генов в бактериях. Приведено описание фермента ациламидазы и дано обоснование его использования для конструирования бактериальных штаммов, способных синтезировать N-замещённые (функционализованные) акриламиды.

Глава 2. Материалы и методы

Приведено описание использованных бактериальных штаммов: *R. rhodochrous* M8, *R. qingshengii* TA37, *E. coli* XL1 и *E. coli* S17-1, а также штаммов, производных от них, сконструированных в ходе данной работы. Перечислены ресурсы и алгоритмы, использованные для биоинформатического анализа последовательностей ДНК и РНК.

Описаны использованные методики, в том числе: выращивание бактериальных штаммов с указанием состава питательных сред и условий культивирования; генно-инженерное конструирование штаммов с описанием используемых плазмидных векторов; RT-qPCR анализ

экспрессии генов; анализ ациламидазной и нитрилгидратазной активности клеток родококков; определение интенсивности флуоресценции клеток; биокаталитический синтез N-замещённых (функционализированных) акриламидов (ИПАА и ДМАПАА).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

1. Биоинформатический анализ генома *Rhodococcus rhodochrous* M8 для выявления предполагаемых генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы

Для поиска предполагаемых генетических элементов регуляции (регуляторных участков ДНК/РНК и генов регуляторных белков) использовали аннотированный в базе NCBI геном штамма *R. rhodochrous* M8, GenBank NZ_CP064066. Для обнаружения генов предполагаемых регуляторных белков первичный анализ проводили в прилегающих к оперону нитрилгидратазы *nhmBAG* областях длиной около 16 и 18 тысяч п.н., используя аннотации из NCBI (включая данные базы Gene Ontology), которые дополнительно проверяли с помощью ресурса InterProScan. Среди 30 ORF, аннотированных в этих областях, на основании их предполагаемых функций для более детального анализа были выбраны 3 гена предполагаемых регуляторных белков: *nhmC*, *nhmD* и ORF, обозначенная как «*cblA*», а также ген активатора нитрилгидратазы *nhmG* (Рисунок 1.1).

Дальнейший анализ выбранных генов проводили по следующей схеме: 1) поиск нуклеотидных гомологов в NCBI GenBank; 2) поиск аминокислотных гомологов в NCBI GenBank и UniProtKB/Swiss-Prot; 3) анализ литературных данных об экспериментально изученных аминокислотных гомологах. Дополнительно среди найденных аминокислотных гомологов проводился поиск известных функциональных доменов с помощью ресурса InterProScan.

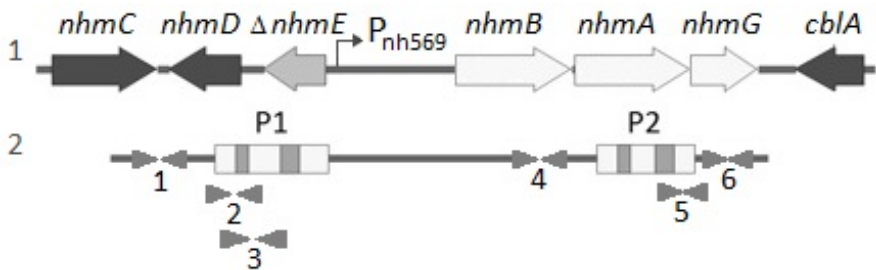


Рисунок 1 – Структура локуса генов нитрилгидратазы *nhmBA* в геноме штамма *R. rhodochrous* M8 (1) и схема регуляторной области P_{nh569} (2). 1-6 – несовершенные инвертированные повторы, темные области – предсказанные боксы -35 и -10 промоторов P1 и P2

По результатам проведенного анализа (Таблица 1) геном, кодирующим белок, участвующий в кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы, с наибольшей вероятностью являлся ген *cbIA*, поскольку у гомологов CblA были найдены ДНК-связывающие домены регуляторных белков семейства ArgR – металло-регуляторов транскрипции. В случае генов *nhmC*, *nhmD* и *nhmG* не было найдено прямых предпосылок для участия их продуктов в кобальт-зависимой регуляции транскрипции. Однако, в связи с малой изученностью генов *Rhodococcus*, исключить такое участие можно было только после экспериментальной проверки. Таким образом, был сформирован список генов для экспериментальной проверки их участия в кобальт-зависимой регуляции транскрипции: *nhmC*, *nhmD*, *nhmG* и *cbIA*.

Поиск регуляторных участков (промотора, сайтов посадки регуляторных белков, РНК-переключателей) проводился на участке ДНК длиной 0,6 т.п.н., обозначенном P_{nh569} , расположенном между опероном *nhmBAG* и фрагментом $\Delta nhmE$ (функция неизвестна). Анализ P_{nh569} с помощью ресурса BPROM и аналогов позволил выделить два предполагаемых промотора: P1 [-472; -419] и P2 [-85; -39] на основе предсказания расположения боксов посадки РНК-полимеразы -35 и -10 (Рисунок 1.2). Около обоих предполагаемых промоторов с помощью ресурса EMBOSS palindromе было выявлено несколько несовершенных инвертированных повторов, которые, согласно литературным данным, могли являться сайтами посадки транскрипционных регуляторов, вовлеченных в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции (обозначены 1-6 на Рисунке 1.2). Известные РНК-переключатели или сходные с ними

последовательности на участке P_{nh569} выявить не удалось (использовали инструменты Riboswitch Scanner и Infernal).

Таблица 1 – Гены белков, предположительно вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции

Ген	Ближайший исследованный аминокислотный гомолог	Найденные функциональные домены	Предполагаемая функция продукта гена
<i>nhmC</i>	AmiC из <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	субстрат-связывающие, лейцин-связывающие	транскрипционный регулятор
<i>nhmD</i>	NhhD из <i>R. rhodochrous</i> J1	ДНК-связывающие (НТН-тип)	транскрипционный регулятор
<i>nhmG</i>	NhhG из <i>R. rhodochrous</i> J1	гомологи β -субъединицы нитрилгидратазы, домены вспомогательного белка нитрилгидратазы	вспомогательный белок синтеза нитрилгидратазы
<i>cblA</i>	NmtR из <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ДНК-связывающие (НТН-тип, семейство ArsR)	транскрипционный регулятор

2. Разработка тест-системы для идентификации и изучения генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы

Изучение кобальт-зависимой регуляции транскрипции удобно осуществлять с помощью кобальт-независимого репортёрного белка. Фермент нитрилгидратаза не мог быть таким репортёром, так как кобальт является его кофактором, необходимым для ферментативной активности. Таким образом, для идентификации и изучения генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции, были необходимы: 1) генетическая тест-система для оценки транскрипционной активности регуляторной области P_{nh569} , основанная на использовании кобальт-независимого репортёрного белка; 2) модельные штаммы *Rhodococcus* для тестирования генетических элементов.

К моменту начала исследований в лаборатории имелись штаммы, производные от штамма *R. rhodochrous* M8, отличающиеся набором

изучаемых генов предполагаемых регуляторных белков, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции (Таблица 2). Эти штаммы использовались в качестве модельных на первых этапах исследования.

В качестве репортёрного белка была выбрана металло-независимая ациламидаза *Aam* из *R. qingshengii* TA37, активность которой измерялась спектрофотометрическим методом без разрушения клеток по образованию окрашенного продукта (1 единица активности соответствовала 1 мкмоль п-нитроанилина, образовавшегося за 1 минуту в расчёте на 1 мг с.в.кл.). Ациламидаза также являлась целевым ферментом для создания штаммов-биокатализаторов синтеза функционализированных акриламидов. В качестве модельного штамма для тестирования репортёрного белка был выбран штамм *R. rhodochrous* M33, собственная ациламидазная активность которого была ниже порогового значения в 0,01 ед.

Таблица 2 – Модельные штаммы, производные от *R. rhodochrous* M8

Ген/оперон	<i>R. rhodochrous</i> M33	<i>R. rhodochrous</i> M50
<i>nhmC</i>	делетирован	делетирован
<i>nhmD</i>	нарушен частичной делецией	делетирован
<i>nhmBAG</i>	не нарушен	делетирован
<i>cblA</i>	не нарушен	делетирован

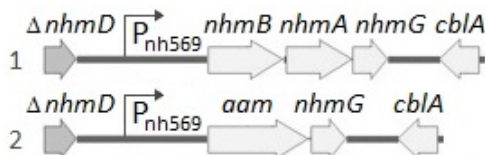


Рисунок 2 – Структура геномов штаммов *R. rhodochrous* M33 (1) и M33 *aam* (2)

Для создания тест-системы для оценки транскрипционной активности области P_{nh569} гены *nhmBA* в хромосоме штамма *R. rhodochrous* M33 были заменены на ген ациламидазы *aam* без изменения примыкающих регионов ДНК (регуляторной области P_{nh569} и гена *nhmG*), в результате чего был получен штамм *R. rhodochrous* M33 *aam*. (Рисунок 2). Замену генов проводили путём двойной рекомбинации с неспособной к автономной репликации в родококках плазмидой. Рекомбинация происходила после конъюгативного введения плазмиды, в качестве плечей для рекомбинации использовали последовательности P_{nh569} и *nhmG*.

Эффект присутствия в среде ионов кобальта на транскрипционную активность области P_{nh569} в штамме *R. rhodochrous* M33 аам оценивали двумя независимыми методами: по ациламидазной активности клеток и по относительному количеству специфической мРНК гена *nhmG* (RT-qPCR анализ); измерения проводили после 20 часов роста жидкой культуры (последняя треть логарифмической фазы роста культуры). Ген *nhmG* был выбран для RT-qPCR анализа, поскольку в штамме *R. rhodochrous* M8 он транскрибировался в составе единой полицистронной мРНК с генами *nhmBA*, и предполагалось, что в штамме *R. rhodochrous* M33 аам он транскрибируется совместно с геном *aam*. Ациламидазная активность клеток в присутствии и в отсутствие ионов кобальта составила $2,8 \pm 0,6$ и $0,2 \pm 0,1$ ед. соответственно, т.е. различалась в 14 раз (Рисунок 3.1). Относительное количество специфической мРНК гена *nhmG* рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$ и выражали в условных единицах; в качестве референсного гена использовали ген ДНК-гиразы *gyrB*. Количество мРНК гена *nhmG* в присутствии ионов кобальта увеличивалось в 16 ± 3 по сравнению с количеством мРНК гена *nhmG* в отсутствие ионов кобальта (Рисунок 3.2). Таким образом, изменение ациламидазной активности клеток в зависимости от присутствия или отсутствия ионов кобальта коррелировало с изменением количества специфической мРНК гена *nhmG*. Следовательно, ациламидазная активность клеток могла быть использована для оценки изменения транскрипционной активности регуляторной области P_{nh569} .

Дополнительно, с помощью RT-qPCR была проведена оценка эффекта присутствия в среде ионов кобальта на транскрипционную активность области P_{nh569} в штаммах *R. rhodochrous* M8 и M33, содержавших под контролем области P_{nh569} гены нитрилгидратазы (по мРНК гена *nhmG*, аналогично описанному выше способу) (Рисунок 3.3). Профиль индукции транскрипции P_{nh569} в штаммах *R. rhodochrous* M8 и M33 в присутствии ионов кобальта был сходным с таковым в штамме M33 аам. Это означало, что при создании штамма M33 аам не был нарушен механизм кобальт-зависимой регуляции транскрипции. Количество белка ациламидазы в штамме M33 аам в присутствии ионов кобальта в среде было сходным с количеством белка нитрилгидратазы в штамме M33, выращенного в тех же условиях и составляло (оценочно) десятки процентов от общего растворимого белка (Рисунок 3.4).

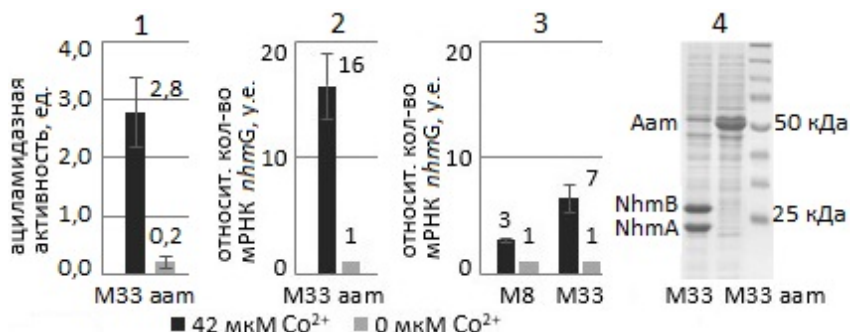


Рисунок 3 – Ациламидазная активность штамма *R. rhodochrous* M33 aam (1), результаты RT-qPCR анализа штаммов *R. rhodochrous* M33 aam (2), M8 и M33 (3), SDS-ПААГ электрофорез растворимых внутриклеточных белков штаммов *R. rhodochrous* M33 и M33 aam (4)

Таким образом, тест-система на основе белка ациламидазы могла быть использована для изучения кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности регуляторной области P_{nh569} и для выявления генов, участвующих в этой регуляции. Дополнительно, полученные результаты показали, что регуляторы NhmC и NhmD, отсутствующие в штамме M33 aam, не являлись необходимыми элементами для осуществления кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности регуляторной области P_{nh569} .

3. Идентификация и изучение функционирования генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы

Исследование регуляторной области P_{nh569}

Для проверки функционирования предполагаемых промоторов P1 и P2, входящих в регуляторную область P_{nh569} (Рисунок 1.2), была сконструирована серия автономно реплицирующихся плазмид на основе вектора pRY16, содержащих экспрессионные кассеты с общей структурой 2Tfd- P_{nhN} -*aam-nhmG-cblA*. Репортёрный ген *aam* в них находился под контролем вариантов регуляторной области разной протяжённости: P_{nh569} , P_{nh408} , P_{nh235} , P_{nh157} , P_{nh31} (значение индекса N в названии вариантов соответствуют сохранённому количеству нуклеотидов в регуляторной области с её 3'-конца) (Рисунок 4.1). Экспрессионные кассеты содержали терминатор транскрипции 2Tfd для снижения возможного влияния вышерасположенных промоторов на активность исследуемых вариантов. Также был сконструирован контрольный

вариант с регуляторной областью минимального размера P_{nh31}, не содержащий 2Tfd. Области экспрессионных кассет, содержащие гены *nhmG* и *cblA*, были идентичны аналогичной области в штамме *R. rhodochrous* M33 аам.

Плазмиды ввели в модельный штамм *R. rhodochrous* M50 (локус нитрилгидратазы делегирован, Таблица 2). Штамм с наиболее длинным вариантом регуляторной области P_{nh569} демонстрировал ациламидазную активность $1,6 \pm 0,6$ и $0,2 \pm 0,1$ ед. при выращивании в присутствии и в отсутствие ионов кобальта соответственно. Активность штаммов с укороченными вариантами регуляторной области была ниже 0,01 ед. Таким образом, транскрипционной активностью обладал только вариант регуляторной области P_{nh569}, содержащий регион ДНК протяжённостью 165 п.н. с предполагаемым промотором P1, причем активность существенно повышалась в присутствии ионов кобальта.

Для подтверждения функциональности предполагаемого промотора P1 сконструировали уменьшенный вариант регуляторной области P_{nh190} (Рисунок 4.2), состоящий из фрагмента ДНК длиной 165 п.н., содержащего P1, и фрагмента 3'-конца области P_{nh569} длиной 25 п.н., содержащего SD сайт гена *nhmB*.

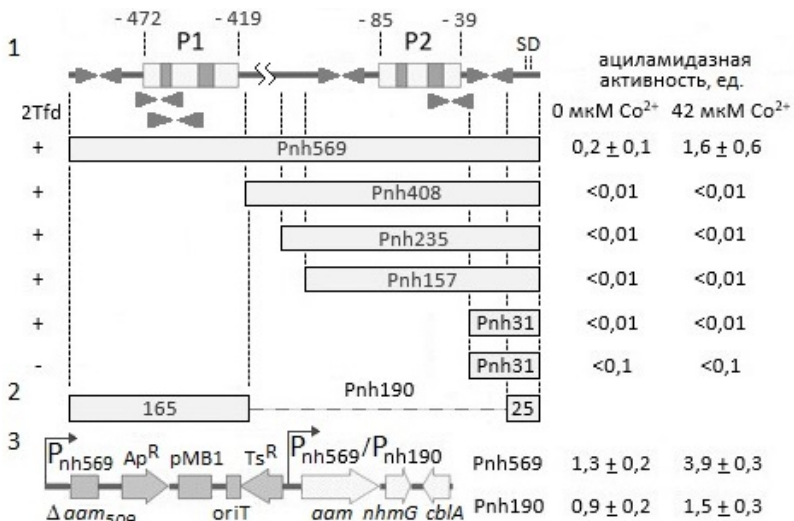


Рисунок 4 – Схема вариантов регуляторной области P_{nh569}, ациламидазные активности соответствующих штаммов (1), схема варианта P_{nh190} (2), структура геномов штаммов *R. rhodochrous* M33 P_{nh569}-аам и M33 P_{nh190}-аам, их ациламидазные активности (3)

На основе штамма *R. rhodochrous* М33 аам сконструировали два изогенных штамма, один из которых содержал в хромосоме ген *aam* под контролем уменьшенного варианта регуляторной области P_{nh190} , а другой – под контролем регуляторной области P_{nh569} максимальной длины. В обоих штаммах имеющаяся в хромосоме копия гена *aam* в результате интеграции была нокаутирована с образованием нефункционального фрагмента Δaam_{509} (Рисунок 4.3). Ациламидазные активности полученных штаммов *R. rhodochrous* М33 P_{nh190} -аам и М33 P_{nh569} -аам в стационарной фазе роста в присутствии ионов кобальта составили $1,5 \pm 0,3$ и $3,9 \pm 0,3$ ед. соответственно. В отсутствие ионов кобальта ациламидазные активности в стационарной фазе роста были в 1,8 (P_{nh190} -аам) и 2,9 (P_{nh569} -аам) раза ниже (Рисунок 4.3). При этом в логарифмической фазе роста (20 часов культивирования) в присутствии ионов кобальта ациламидазная активность штамма М33 P_{nh190} -аам была на порядок ниже активности штамма М33 P_{nh569} -аам: $0,3 \pm 0,1$ и $2,2 \pm 0,6$ ед. соответственно (Рисунок 5.1). Такая же значительная разница обнаруживалась и в транскрипционных активностях P_{nh190} и P_{nh569} согласно результатам RT-qPCR анализа относительного количества специфической мРНК гена *nhmG* (Рисунок 5.2).

Таким образом, участком ДНК, необходимым как для транскрипции, так и кобальт-зависимой регуляции этой транскрипции, является участок регуляторной области длиной 165 п.н. с координатами [-569; -405], содержащий предполагаемый промотор P1. Снижение транскрипционной активности P_{nh190} по сравнению с P_{nh569} , наиболее ярко выраженное в логарифмической фазе роста, указывало на значительную роль внутреннего участка регуляторной области с координатами [-404; -26].

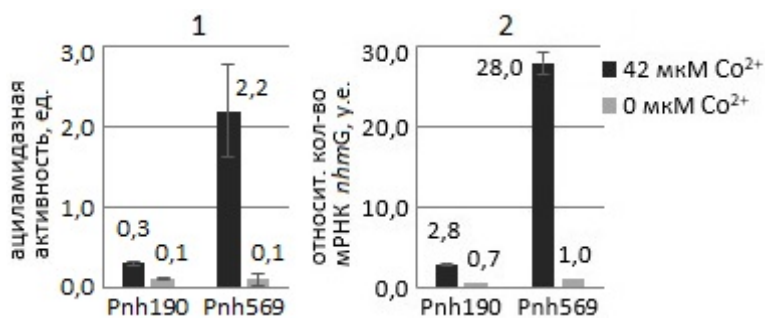


Рисунок 5 – Ациламидазная активность штаммов *R. rhodochrous* М33 P_{nh190} -аам и М33 P_{nh569} -аам (1) и результаты RT-qPCR анализа этих штаммов (2) в логарифмической фазе роста культур

Изучение роли генов nhmG и cblA в кобальт-зависимой регуляции транскрипции

Для дальнейшей работы на основе штамма *R. rhodochrous* M33 aam был сконструирован новый модельный штамм *R. rhodochrous* M33 del, в котором был удален участок ДНК $\Delta nhmD$ -P_{nh569}-aam-cblA, а также фланкирующие этот участок области длиной 533 п.н. и 169 п.н. Удаление проводили путём двойной рекомбинации с неспособной к автономной репликации в родококках плазмидой, содержащей соответствующие плечи для рекомбинации. Ациламидазная активность штамма *R. rhodochrous* M33 del была ниже порогового значения 0,01 ед.

Для выяснения роли генов *nhmG* и *cblA* в кобальт-зависимой регуляции транскрипции было сконструировано четыре изогенных штамма на основе штамма M33 del, в которых варианты экспрессионных кассет, различающиеся набором изучаемых генов, были интегрированы в хромосому (Таблица 3).

Все штаммы проявляли ациламидазную активность, но различались по способности к повышению активности в присутствии ионов кобальта (Таблица 3). Повышение активности наблюдалось в штаммах M33 del pRY1-1 и M33 del pRY1-8, содержащих ген *cblA*, и не наблюдалось в штаммах M33 del pRY1-6 и M33 del pRY1-6,5 в которых ген *cblA* отсутствовал. При этом активность штаммов M33 del pRY1-6 и M33 del pRY1-6,5 не зависела от наличия функционального *nhmG* и в обоих случаях достигала уровня активности штамма M33 del pRY1-1, выращенного в присутствии ионов кобальта.

Таблица 3 – Штаммы, сконструированные на основе модельного штамма *R. rhodochrous* M33 del, и их ациламидазные активности

Обозначение экспрессионной кассеты	Экспрессионная кассета, интегрированная в хромосому	Ациламидазная активность, ед.	
		0 мкМ Co ²⁺	42 мкМ Co ²⁺
pRY1-1	2Tfd-P _{nh569} -aam-nhmG-cblA	1,2 ± 0,1	2,4 ± 0,3
pRY1-6	2Tfd-P _{nh569} -aam-nhmG	2,0 ± 0,3	2,6 ± 0,2
pRY1-6,5	2Tfd-P _{nh569} -aam-STOP-nhmG*	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,3
pRY1-8	2Tfd-P _{nh569} -aam-cblA	1,8 ± 0,1	3,4 ± 0,3

* первые шесть нуклеотидов гена *nhmG* заменены на 2 стоп-кодона

Таким образом, для кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности регуляторной области P_{nh569} необходим единственный ген *cblA*. Конститутивный характер экспрессии гена *aam* и высокий уровень ациламидазной активности штаммов, не содержащих ген *cblA*, указывали на то, что белок CblA может являться репрессором транскрипции, функционирующим аналогично известным транскрипционным регуляторам ArgR-семейства (Рисунок 6).

Полученные результаты показали, что обнаруженные генетические элементы P_{nh569} и *cblA*, ответственные за регуляцию экспрессии на транскрипционном уровне, можно использовать для конструирования регулируемых экспрессионных кассет вида P_{nh569} -ЦГ-*cblA*, где ЦГ – целевой ген.

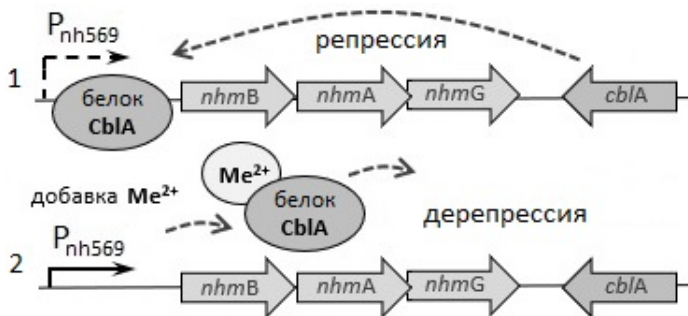


Рисунок 6 – Предположительная модель металло-зависимой регуляции транскрипции в штамме *R. rhodochrous* M8 в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов Me^{2+} , где Me^{2+} – ионы Co^{2+} и Ni^{2+}

*Тестирование регулируемости транскрипционной активности области P_{nh569} ионами кобальта в присутствии гена *cblA* в клетках *Rhodococcus qingshengii* и *Escherichia coli**

Роль гена *cblA* в кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности P_{nh569} и степень индуцибельности были дополнительно изучены в штаммах *R. qingshengii* TA37 и *Escherichia coli* XL-1.

Ген *aam* интегрировали в хромосому штамма *R. qingshengii* TA37 в составе экспрессионной кассеты 2Tfd- P_{nh569} -*aam-cblA* с помощью рекомбинации с неспособной к автономной репликации в родококках плазмидой. Полученный штамм *R. qingshengii* TA37 pRY1-8 выращивали в минимальной жидкой среде MS с глюкозой, нитратом аммония и дрожжевым экстрактом (необходим для роста штамма) до стационарной фазы роста.

Ациламидазная активность штамма составила $1,8 \pm 0,1$ и $0,9 \pm 0,1$ ед. в присутствии и в отсутствие ионов кобальта соответственно (ациламидазная активность штамма *R. qingshengii* TA37, не содержащего кассету 2Tfd- P_{nh569} -*aam-cblA*, была ниже 0,01 ед. вне зависимости от присутствия ионов кобальта в среде).

Кассету *cblA*- P_{nh569} -*turboGFP-turboRFP* ввели в штамм *E. coli* XL-1 в составе автономной плазмиды и измеряли интенсивность флуоресценции клеток, выращенных в жидкой среде LB. Измерение проводили в областях спектра, соответствующих использованным белкам TurboGFP и TurboRFP. Был обнаружен высокий уровень интенсивности флуоресценции TurboRFP, не зависящий от наличия ионов кобальта в среде.

Таким образом, наличия гена *cblA* было достаточно для кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности области P_{nh569} в штамме другого вида родококков *R. qingshengii* TA37. Эти данные подтверждали гипотезу о том, что в штаммах, производных от штамма *R. rhodochrous* M8, в кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности области P_{nh569} также не участвовали другие гены. Область P_{nh569} проявляла высокий уровень транскрипционной активности в клетках *E. coli*, однако кобальт-зависимая регуляция этой активности отсутствовала.

Оценка специфичности системы экспрессии « P_{nh569} -*cblA*» в отношении двухвалентных ионов тяжелых металлов

Известно, что специфичность гомологов белка CblA может включать двухвалентные ионы нескольких тяжелых металлов. Например, транскрипционный регулятор NmtR из *M. tuberculosis* может взаимодействовать с двухвалентными ионами никеля и кобальта. Для оценки специфичности белка CblA и соответственно всей системы экспрессии « P_{nh569} -*cblA*» штамм *R. rhodochrous* M33 *aam* выращивали в жидкой минимальной среде MS,

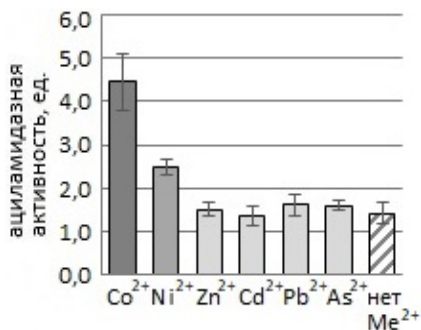


Рисунок 7 – Влияние присутствия ионов Me^{2+} на ациламидазную активность штамма *R. rhodochrous* M33 *aam*

содержащей ионы Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} и As^{2+} в концентрации 42 мкМ (максимальная концентрация ионов всех изучаемых металлов

в жидкой среде, неингибирующая рост клеток). Оказалось, что помимо присутствия ионов кобальта, ациламидазную активность штамма индуцировало присутствие ионов никеля (Рисунок 7).

Для выявления различных эффектов присутствия ионов кобальта и никеля штамм *R. rhodochrous* M33 аам выращивали в жидкой минимальной среде с нитратом аммония, содержащей ионы кобальта и никеля в диапазоне концентраций от 0,4 до 168,0 мкМ. Максимальная ациламидазная активность (т.е. полная возможная дерепрессия транскрипции) достигалась при содержании в среде 4,2 мкМ ионов кобальта или 126,0 мкМ ионов никеля (Рисунок 8).

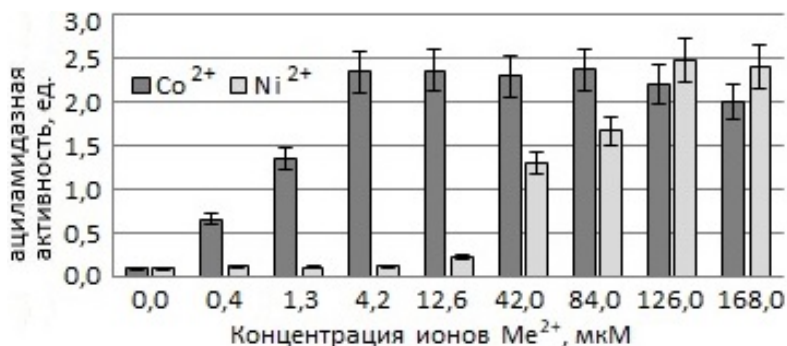


Рисунок 8 – Влияние концентрации ионов Co^{2+} и Ni^{2+} на ациламидазную активность штамма *R. rhodochrous* M33 аам

Таким образом, специфичность системы экспрессии « $P_{nh569}-cblA$ », помимо ионов кобальта, из всех исследованных в данной работе металлов распространялась только на ионы никеля. Вероятно, белок CblA взаимодействовал с ионами никеля аналогично взаимодействию с ионами кобальта (Рисунок 6), однако его чувствительность к ионам никеля была ниже на два порядка.

4. Конструирование биокатализаторов синтеза N-замещённых акриламидов на основе штаммов *Rhodococcus rhodochrous* и элементов системы экспрессии « $P_{nh569} - cblA$ »

Фермент ациламидаза способен осуществлять не только гидролиз, но и синтез N-замещённых акриламидов, поэтому на данном этапе работы он использовался как целевой фермент для конструирования двух штаммов-биокатализаторов на основе штамма *R. rhodochrous* M33 del. Штамм-биокатализатор *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up содержал в хромосоме

экспрессионную кассету 2Tfd-upP_{nh569-aam-nhmG-cblA}, обеспечивающую кобальт-зависимую регуляцию экспрессии гена *aam*. Штамм-биокатализатор *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 содержал в хромосоме экспрессионную кассету P_{nh569-aam}, обеспечивающую конститутивную экспрессию гена *aam*.

Оба штамма при выращивании в жидкой минимальной среде MS с глюкозой и мочевиной обладали высокими уровнями ациламидазной активности ($4,2 \pm 0,6$ и $5,1 \pm 0,8$ ед., Таблица 4). В регулируемом штамме pRY1-1up, выращенном в отсутствие ионов кобальта, ациламидазная активность была снижена в 3 раза ($1,5 \pm 0,1$ ед.). Содержание белка ациламидазы в клетках с максимальной активностью составляло, оценочно, не менее 40% от всех растворимых белков клетки.

Таблица 4 – Штаммы-биокатализаторы с регулируемой и конститутивной экспрессией гена *aam* и их ациламидазные активности

Обозначение экспрессионной кассеты	Экспрессионная кассета, интегрированная в хромосому	Ациламидазная активность, ед.	
		0 мкМ Co ²⁺	42 мкМ Co ²⁺
pRY1-1up	2Tfd-upP _{nh569-aam-nhmG-cblA}	$1,5 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,6$
pRY1-7	P _{nh569-aam}	$5,6 \pm 0,4$	$5,1 \pm 0,8$

Скорости роста культур и урожаи клеток не различались у регулируемого и конститутивного штаммов вне зависимости от присутствия ионов кобальта в среде, что указывало на отсутствие токсичности для клеток такого большого количества целевого белка.

Для оценки возможности биокаталитического синтеза N-замещённых (функционализированных) акриламидов (ИПАА и ДМАПАА) использовалась биомасса клеток штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 с активностью 5,3 ед. Для сравнения использовали полученные ранее данные о синтезе ИПАА и ДМАПАА клетками биокатализатора первого поколения (*R. qingshengii* TA37), ациламидазная активность которых составляла 3,0 ед. (максимально возможная для этого штамма). Синтез проводили при концентрации клеток 10 мг. с.в.кл./мл. Штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 был способен синтезировать повышенное по сравнению со штаммом *R. qingshengii* TA37 количество двух N-замещённых акриламидов (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты биокаталитического синтеза N-замещённых акриламидов

Штамм-биокатализатор	Концентрация продукта в реакционной смеси, г/л	
	ИПАА	ДМАПАА
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-7	32	8
<i>R. qingshengii</i> TA37	11	5

Таким образом, практически значимым результатом работы был сконструированный штамм-биокатализатор, способный конститутивно, то есть без добавки индукторов, продуцировать ациламидазу, необходимую для биокаталитического синтеза N-замещённых акриламидов.

Использование конститутивной системы экспрессии, основанной на регуляторной области P_{nh569} , показало свою пригодность для создания штамма-биокатализатора, продуцирующего фермент ациламидазу. Разработанная в ходе исследований кобальт-индуцибельная система экспрессии P_{nh569} -*ЦГ-cblA* также обеспечивала высокую продуктивность по целевому белку и может быть использована для тестирования возможности экспрессии других генов в бактериях *Rhodococcus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам работы были сделаны следующие выводы:

1. разработана тест-система для идентификации и изучения генетических элементов кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы, состоящая из модельных штаммов *Rhodococcus rhodochrous* и гена репортёрного металло-независимого фермента ациламидазы;

2. в штаммах, производных от штамма *Rhodococcus rhodochrous* M8, идентифицирована регуляторная область генов нитрилгидратазы длиной 569 п.н. (P_{nh569}), проявляющая высокую транскрипционную активность;

3. показано, что регуляторная область P_{nh569} содержит 2 функциональных участка: участок длиной 165 п.н. отдалённый на 405 п.н. от старт-кодона, содержащий функциональный регулируемый промотор, и беспромоторный участок с неизвестной функцией, расположенный между промотором и старт-кодоном, при этом удаление беспромоторного участка значительно снижает транскрипционную активность области P_{nh569} ;

4. идентифицирован новый ген репрессора транскрипции генов нитрилгидратазы, названный *cblA*, получены данные о том, что металло-зависимая дерепрессия транскрипции происходит в присутствии ионов кобальта и никеля;

5. показано, что регуляторная область P_{nh569} проявляет высокую транскрипционную активность в бактериях *Rhodococcus qingshengii* и *Escherichia coli*;

6. на основе генетических элементов P_{nh569} и *cblA* и бактерий *Rhodococcus rhodochrous* сконструированы высокоактивные штаммы-биокатализаторы с индуцибельной и конститутивной продукцией фермента ациламидазы и успешно апробирован биокаталитический синтез двух N-замещённых (функционализированных) акриламидов: ИПАА и ДМАПАА.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. New *cblA* gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous* / K. V. Lavrov, A. O. Shemyakina, **E. G. Grechishnikova** et al. // Research in Microbiology. – 2018. – Vol. 169, № 4/5. – P. 227-236.

2. *In vivo* metal selectivity of metal-dependent biosynthesis of cobalt-type nitrile hydratase in *Rhodococcus* bacteria: a new look at the nitrile hydratase maturation mechanism? / K. V. Lavrov, A. O. Shemyakina, **E. G. Grechishnikova** et al. // Metallomics. – 2019. – Vol 11, № 6 – P. 1162-1171.

3. A set of active promoters with different activity profiles for superexpressing *Rhodococcus* strain / A. O. Shemyakina, **E. G. Grechishnikova**, A. D. Novikov et al. // ACS Synthetic Biology. – 2021. – Vol. 10, № 3. – P. 515-530.

4. *Rhodococcus*: sequences of genetic parts, analysis of their functionality, and development prospects as a molecular biology platform / **E. G. Grechishnikova**, A. O. Shemyakina, A. D. Novikov et al. // Critical Reviews in Biotechnology. – 2023. – Vol. 43, № 6. – P. 835-850.

5. Флуоресцентные репортеры turboGFP и turboRFP для оценки промоторов в *Escherichia coli*: возможности и ограничения / К. В. Лавров, **Е. Г. Гречишникова**, А. О. Шемякина и др. // Биотехнология. – 2023. – Т. 39, № 4. – С. 39-49.

6. Structure of the regulatory region of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous* M8, a biocatalyst for production of acrylic heteropolymers / **E. G. Grechishnikova**, A. O. Shemyakina, A. D. Novikov et al. // Microbiology. – 2024. – Vol. 93, № 4. – P. 472-477.

Публикации в трудах конференций

1. Кобальт-зависимая экспрессия – новый тип регуляции катаболитных генов в бактериях *Rhodococcus* / **Е. Г. Гречишникова**, А. О. Шемякина, К. В. Лавров и др. // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы VIII Московского междунар. конгресса (Москва, 17-20 марта, 2015 г.). – М.: Экспо-биохим-технологии, РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2015. – С. 295-297.

2. Сверхпродукция фермента ациламидазы в *Rhodococcus rhodochrous* связана с влиянием металлозависимых регуляторов экспрессии / **Е. Г. Гречишникова**, А. О. Шемякина, К. В. Лавров и др. // I й Российский Микробиологический Конгресс : сборник тез. ; под ред. Т. А. Решетиловой (Пушино МО, 17-18 октября, 2017 г.). – М.: Вода: химия и экология. – 2017. – С. 143-144.

3. Изучение функционирования набора промоторов разной силы в бактериях *Rhodococcus rhodochrous* – перспективной платформе для создания биокатализаторов / **Е. Г. Гречишникова**, А. О. Шемякина, К. В. Лавров и др. // Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии : сборник тез. (Гатчина ЛО, 17-22 февраля, 2018 г.). – Гатчина ЛО.: Изд-во НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ. – 2018. – С. 101.

4. Влияние никеля на транскрипцию генов кобальт-зависимой нитрилгидратазы и на её биосинтез в *Rhodococcus rhodochrous* / А. О. Шемякина, **Е. Г. Гречишникова**, К. В. Лавров и др. // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы междунар. форума (Москва, 23-25 мая, 2018 г.). – М.: Русские Экспо Дни Групп – 2018. – С. 20-22.

5. Направленная регуляция активности промотора нитрилгидратазы в экспрессионной системе в бактериях *Rhodococcus rhodochrous* / А. О. Шемякина, **Е. Г. Гречишникова**, А. Д. Новиков и др. // Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике : материалы школы-конференции, посвященной 50-летию НИЦ «Курчатовский институт – ГосНИИгенетика» (Москва-«Царьград», 3-5 октября, 2018 г.). – Биотехнология. – 2018. – спецвыпуск. – С. 57.

6. Направленная регуляция экспрессионной системы в бактериях *Rhodococcus rhodochrous* / А. О. Шемякина, **Е. Г. Гречишникова**, А. Д. Новиков и др. // 2 й Российский микробиологический конгресс : материалы конгресса (Саранск, 23-27 сентября, 2019 г.). – Саранск: Изд-во Мордовского ун-та. – 2019. – С. 161.

7. Измерение эффективности терминаторов транскрипции в *Rhodococcus* с помощью флуоресцентных репортёров / М. С. Чуйко, А. О. Шемякина, **Е. Г. Гречишникова** и др. // Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие : сборник тез. VIII Пушинской

конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов», школы-конференции молодых ученых, аспирантов и студентов ; под ред. Т. А. Решетиловой (Пушино МО, 6-8 декабря, 2022 г.). – М.: ГЕОС. – 2022. – С. 220-222.

8. Оценка терминации транскрипции с использованием флуоресцентных белков в *Rhodococcus rhodochrous* / М. С. Чуйко, **Е. Г. Гречишникова**, К. В. Лавров и др. // Курчатовская междисциплинарная молодёжная научная школа : сборник аннотаций (Москва, 20-23 марта, 2023 г.). – М.: Изд-во НИЦ «Курчатовский институт». – 2023. – С. 286.