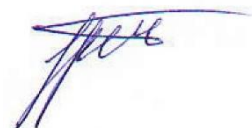


Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

*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

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
**Лавров Константин Валерьевич**

Москва, 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Бактерии рода <i>Rhodococcus</i> в промышленной биотехнологии .....	8
1.2. Генетические инструменты для гетерологичной экспрессии генов в бактериях <i>Rhodococcus</i> .....	11
1.3. Штамм <i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8 и штаммы, производные от него .....	27
1.4. Металло-регуляция транскрипции в бактериях.....	30
1.5. Фермент ациламидаза как репортёрный и целевой белок.....	34
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
2.1. Материалы, использованные в работе.....	40
2.2. Методы исследования.....	55
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	63
3.1. Биоинформатический анализ генома <i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8 для выявления предполагаемых генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы.....	63
3.2. Разработка тест-системы для идентификации и изучения генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы.....	86
3.3. Идентификация и изучение функционирования генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы .....	96
3.4. Конструирование биокатализаторов синтеза N-замещённых акриламидов на основе штаммов <i>Rhodococcus rhodochrous</i> и элементов системы экспрессии «P <sub>nh569</sub> – <i>cbIA</i> » .....	138
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	147
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	151
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ .....	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	156
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	172
ПРИЛОЖЕНИЕ А Список регуляторных областей и промоторов, использованных для экспрессии генов в <i>Rhodococcus</i> .....	182
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Параметры возбуждения и излучения флуоресценции белков TurboGFP и TurboRFP.....	202

## ВВЕДЕНИЕ

### **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 НГ 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 исследования**

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 *cblA*, 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 акриламидов.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Фермент ациламидаза из *Rhodococcus qingshengii* TA37, обеспечивающий синтез N-замещённых акриламидов, был использован в качестве нового репортёрного белка для изучения транскрипционной активности регуляторной области генов нитрилгидратазы P<sub>nh569</sub> в бактериях *Rhodococcus rhodochrous* и *Rhodococcus qingshengii*.

2. Регуляторная область P<sub>nh569</sub> 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 ArsR семейству транскрипционных металло-регуляторов.

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

5. Регуляторная область P<sub>nh569</sub> проявляет высокую транскрипционную активность в бактериях *Rhodococcus qingshengii* и *Escherichia coli*.

6. На основе обнаруженных в ходе исследования генетических элементов P<sub>nh569</sub> и *cblA* и бактерий *Rhodococcus rhodochrous* были сконструированы высокоактивные штаммы-

биокатализаторы синтеза двух N-замещённых (функционализированных) акриламидов: 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 ученых, 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 2 статьи в российских журналах, входящих в перечень ВАК, и 4 статьи в международных 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 диссертации**

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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Бактерии рода *Rhodococcus* в промышленной биотехнологии

Бактерии рода *Rhodococcus* привлекают все большее внимание исследователей в областях, связанных с различными биотехнологическими производствами и биоремедиацией. Этот растущий интерес связан с уникальными особенностями клеток бактерий *Rhodococcus*. Во-первых, это способность утилизировать широкий спектр токсичных и/или сложно перерабатываемых субстратов [1-3], механическая прочность клеточной стенки, высокая устойчивость к органическим растворителям [4-6] и тяжелым металлам [7, 8]. Во-вторых – способность родококков к сверх-экспрессии генов [9, 10] и накоплению большого количества триацилглицеринов [11-14] и других ценных соединений [15, 16] внутри клетки. Геномы родококков содержат гены многочисленных ферментов, способных трансформировать ксенобиотики, что делает эти бактерии перспективными источниками таких ферментов для будущих применений в биоремедиации.

Среди других важных преимуществ родококков – простота культивирования и быстрый рост при относительно низких температурах [17]. Практическое применение этих бактерий также перспективно в области переработки лигноцеллюлозы в возобновляемое биотопливо и другие ценные соединения [12] и биокаталитического синтеза веществ для промышленности и фармацевтики [16]. Биоремедиационный потенциал родококков представлен в обширных обзорах [1-3, 18], где подробно описаны метаболические пути деградации ароматических соединений и нитрилов [2], обсуждается разнообразие ферментов оксигеназ [1], и обобщаются перспективы применения родококков для экологической биотехнологии [3]. Перспективы применения штаммов *Rhodococcus* для валоризации лигнина обсуждаются в обзоре [12], а разнообразие метаболических путей этих бактерий рассмотрено в обзорах [11, 13]. К примерам биокаталитического производства на основе родококков относятся синтез триацилглицеринов, полигидроксиалканоатов [18], гликолипидных биосурфактантов [18], акриловых мономеров [3], региоселективный и энантиоселективный синтез [3], биоконверсия стероидов [3]. Синтез акриловых мономеров (акриламида, никотинамида и акриловой кислоты) стал первым примером успешной коммерциализации биотехнологий на основе родококков.

Далее приведены несколько примеров штаммов родококков, описываемых как перспективные в различных отраслях. Штамм *R. erythropolis* SQ1 способен деградировать ряд природных стероидов, в том числе холестерин и фитостерины, что может быть использовано для получения ценных соединений – интермедиатов метаболического пути утилизации стероидов: 4-андростен-3,17-диола, 1,4-андростадиен-3,17-диола и 9 $\alpha$ -гидрокси-4-андростен-3,17-диола [19].



Штамм *Rhodococcus* sp. TFB известен своей способностью использовать для роста в качестве единственного источника углерода широкий круг токсичных ароматических соединений, таких как фталат, тетралин, нафталин и др. [20]. Штамм *R. opacus* HL PM-1 может быть использован для деградации 2,4,6-тринитрофенола (пикриновой кислоты) [21]. Штамм *Rhodococcus* sp. YK2 может быть использован для биоремедиации почв, загрязненных диоксинами: полихлорированным дибензофураном и дибензо-*p*-диоксином [22]. Штамм *R. jostii* RHA1 является одним из наиболее перспективных бифенил-деградирующих микроорганизмов, метаболические пути которого включают множество ферментов, необходимых для утилизации полихлорированных бифенилов [23]. Ряд исследований посвящен изучению и модификациям другого фенол-деградирующего штамма *R. erythropolis* CCM2595 [24]. Штаммы *R. opacus* PD630, *R. jostii* RHA1 и *R. opacus* B4 позволяют накапливать максимальное количество триацилглицеринов среди всех микроорганизмов – до 80 % от сухого веса клетки [25].

Во многих случаях, особенно для биокатализа, требуется накопление в клетке максимального количества целевого белка в активной форме. Такое накопление чаще всего достигается с помощью сверх-экспрессии целевого гена, которая в первую очередь обеспечивается за счет сильного промотора. Однако примеров работ, в которых были сконструированы штаммы родококков со сверхвысоким уровнем экспрессии целевых генов на сегодняшний день немного.

Одним из таких примеров является штамм *R. ruber* TH3, производный от штамма *R. ruber* TH, с нокаутированным геном амидазы, в котором целевая нитрилгидратазная активность клеток была повышена на 25 % по сравнению со штаммом дикого типа [26]. Последующие исследование набора регуляторных областей в штамме *R. ruber* THdAdN (производный от штамма *R. ruber* TH с нокаутированными генами амидазы и нитрилгидратазы) также продемонстрировало возможность сверх-экспрессии генов нитрилгидратазы [27]. Штамм с максимальной нитрилгидратазной активностью был получен при экспрессии генов нитрилгидратазы под контролем синтетической регуляторной области, состоящей из участка регуляторной области генов нитрилгидратазы ( $P_{nh}$  из *R. ruber* TH) и сайта связывания рибосомы амидазы ( $RBS_{ami}$  из *R. ruber* TH). Также в штамме *R. ruber* THdAdN проводили сверх-экспрессию гена нитрилазы под контролем индуцируемой регуляторной области  $P_{ami}$  гена амидазы из *R. ruber* TH [28], что позволило достичь трехкратного увеличения нитрилазной активности в рекомбинантном штамме по сравнению со штаммом дикого типа.

Другим примером сверх-экспрессии генов в родококках является получение рекомбинантного штамма с повышенной активностью НАДФ<sup>+</sup>-зависимой алкогольдегидрогеназы [29]. Максимального уровня экспрессии алкогольдегидрогеназы удалось добиться в штамме *R. koreensis* JCM10743 с использованием конститутивного промотора  $P_{TRR}$  из

*Lactobacillus plantarum*, что позволило повысить выход продукта в 48 раз по сравнению со штаммом дикого типа. В штамме *Rhodococcus* sp. DS7 проводили сверх-экспрессию гена *dszD*, продукт которого является лимитирующим фактором в процессе биодесульфуризации [30]. Экспрессия гена *dszD* под контролем сильного конститутивного промотора P<sub>57</sub>, найденного в геноме этого же штамма, позволила повысить редуктазную активность клеток в 11 раз по сравнению со штаммом дикого типа. Для изучения трех различных белков 3-кетостероид Δ<sup>1</sup>-дегидрогеназ их гены *kstD1*, *kstD2* и *kstD3* были экспрессированы на сверхвысоком уровне в штамме *R. erythropolis* СЕСТ3014 под контролем модифицированной регуляторной области P<sub>tipA</sub> из *Streptomyces coelicolor* [31].

Растущий запрос на создание промышленных рекомбинантных штаммов родококков с измененными метаболическими путями сопровождается ростом числа исследований этих микроорганизмов с помощью транскриптомных и протеомных методов. Такие работы улучшают понимание того, какие клеточные механизмы отвечают за реакцию микроорганизма на внешнее воздействие, например изменение температуры, добавку индуктора и т.д. Далее приведены несколько примеров транскриптомных исследований бактерий *Rhodococcus*.

При разработке способа получения триацилглицерина в клетках штамма *R. jostii* RHA1 был получен транскриптом организма в условиях азотного голодания, при котором начинается повышенная наработка запасных липидов [32]. В штамме *Rhodococcus* sp. TFB с помощью транскриптомного анализа проводили изучение катаболитной репрессии [33], а с помощью протеомного подхода – изучение путей утилизации нафталина [34], тетралина [20] и фталата [35]. Для штамма *R. opacus* PD630 были полученные данные о транскриптоме и протеоме в условиях выращивания, необходимых для повышенного синтеза липидов [36]. В штамме суперпродуценте нитрилгидратазы *R. ruber* TH при анализе транскриптома был найден белок-шаперон GroES, который в сшивке с белком нитрилгидратазы увеличил удельную активность и термостабильность этого фермента [37]. С помощью транскриптома штамма *R. ruber* TH3, полученного в условиях теплового шока, был найден белок Hsp16, сверх-экспрессия гена которого позволила усилить жизнеспособность и устойчивость клеток родококков при повышении температуры [38].

Для штаммов родококков, демонстрирующих потенциал в деградации различных соединений, также проводили транскриптомные исследования: в *R. erythropolis* D310-1 изучали путь утилизации хлоримурон-этила [39], в *R. erythropolis* PR4 – углеводородных соединений на примере гексадекана и дизельного топлива [40], в *Rhodococcus* sp. AD45 – изопрена [41], в *R. aetherivorans* I24 – полихлорированных бифенилов [42], в *R. jostii* RHA1 – холата [43], п-гидроксициннамата [44], полихлорированных бифенилов [45], фталата и тетрафталата [46], холестерина [47], N-нитрозодиметиламина [48].

Помимо транскрипционного ответа клетки на такие факторы как состав среды и температура, была предпринята попытка изучить различия экспрессии генов в условиях низкой и высокой влажности окружающей среды. Родококки, являясь почвенными бактериями, способны выживать при достаточно низкой влажности, что может быть использовано при создании технологии биоремедиации почв и при поверхностном культивировании. Транскриптом штамма *R. jostii* RNA1, проинкубированного в условиях низкой влажности, позволил выявить факторы, вовлеченные в транскрипционный ответ на высушивание клеток [49]. Кроме того, штаммы *Rhodococcus* sp. TN3, *Rhodococcus* sp. TG13 и *R. biphenylivorans* TG9T были изучены на транскрипционном уровне для выяснения механизма перехода клеток родококков в жизнеспособное, но некультивируемое состояние при низкой температуре [50].

Перспективной областью, пока не разработанной для родококков в достаточной степени можно назвать сверхплотное культивирование. Попытки добиться высокой плотности культуры были выполнены для штаммов *R. opacus* PD630 [14], *R. erythropolis* LSSE8-1 [51], *R. opacus* MITXM-61 [52] и *R. opacus* MITXM-173 [53].

Исходя из доступной литературы можно сделать вывод о широте разнообразия перспективных отраслей использования родококков, однако генно-инженерное конструирование промышленных рекомбинантных штаммов этих бактерий в настоящее время часто затруднено ввиду недостаточной степени развития необходимого для этого генетического инструментария.

## **1.2. Генетические инструменты для гетерологичной экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus***

### *1.2.1. Состав набора генетических инструментов, необходимых для гетерологичной экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus**

В настоящий момент род *Rhodococcus* относится к так называемым «нестандартным» или «нетрадиционным» (от англ. «nonconventional») биотехнологическим платформам, которые обладают рядом преимуществ перед такими стандартными платформами как *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Corynebacterium* и т.д., однако изучены в меньшей степени и имеют значительно меньший набор инструментов для гетерологичной экспрессии [54]. Благодаря особенностям своего метаболизма, описанным в Разделе 1.1, род *Rhodococcus* имеет широкие перспективы развития как биотехнологическая платформа, однако для этого требуется создание полноценного набора генетических инструментов для гетерологичной экспрессии генов, по своему составу и функциональности не уступающего наборам для других разработанных штаммов-платформ.

Все генетические инструменты для гетерологичной экспрессии генов в бактериях можно разделить на несколько основных групп по их назначению (Рисунок 1.1):

1. генетические элементы контроля уровня экспрессии, к которым относятся элементы, управляющие процессами транскрипции (промоторы, транскрипционные факторы (ТФ) и терминаторы транскрипции) и трансляции (сайты связывания рибосомы (RBS), регуляторы трансляции [55], рибопереключателы [56-58] и старт-кодены целевого белка [59, 60]);

2. генетические элементы контроля уровня экспрессии, определяющие стабильность целевой мРНК (вторичные структуры на 3'- и 5'-концах транскрипта [61]) и синтезированного белка (N- и С-дегроны [62, 63]);

3. носители рекомбинантной ДНК, используемые для доставки гетерологичных генов в штамм, в котором производится экспрессия. В качестве таких носителей в бактериальных клетках обычно выступают плазмидные векторы, которые либо автономно реплицируются в клетках штамма-хозяина, либо интегрируются в его хромосому;

4. «вспомогательные» элементы, которые не принимают непосредственного участия в синтезе целевого белка, однако могут использоваться на различных стадиях работ по гетерологичной экспрессии.

Элементы из первой и второй группы комбинируют желаемым образом для создания генетических систем, определяющих уровень экспрессии целевого гена. Большинство из этих элементов располагаются в непосредственной близости от целевого гена, формируя его окружение с обеих сторон (Рисунок 1.1), за исключением ТФ и регуляторов трансляции, как белковой, так и РНК-вой природы, которые могут располагаться на достаточном удалении или в составе других молекул ДНК (в хромосоме или на дополнительных плазмидных векторах).

Собранные генетические системы располагают на инструментах третьей группы – плазмидных векторах. Элементы одной системы могут быть введены в клетки штамма-хозяина в составе единого плазмидного вектора, либо могут быть разнесены на несколько векторов и вводиться в штамм последовательно, если их функционирование не требует расположения в единой генетической кассете с целевым геном/генами.

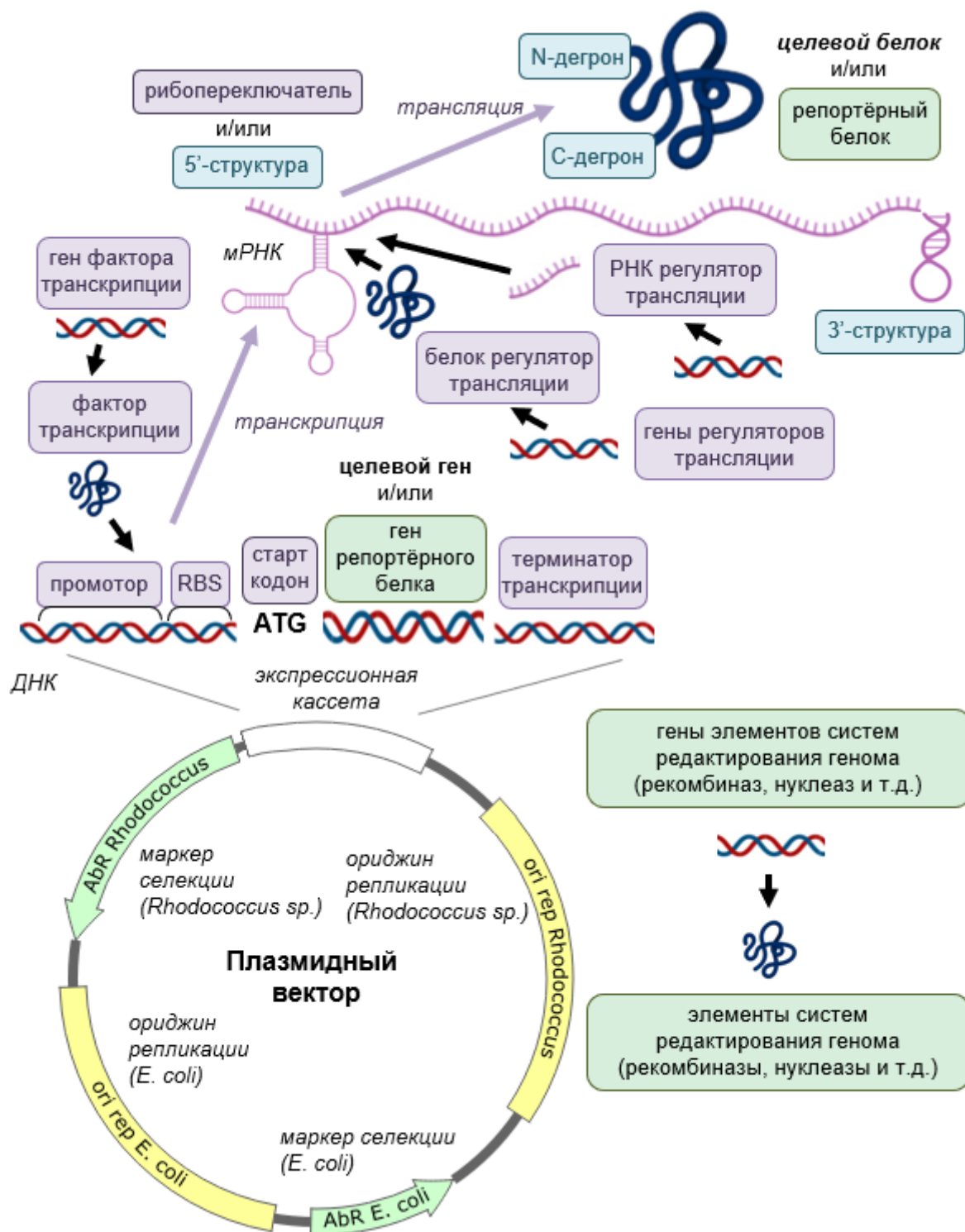


Рисунок 1.1 – Генетические инструменты для гетерологичной экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus*. Фиолетовым цветом выделены элементы контроля уровня экспрессии, управляющие процессами транскрипции и трансляции (группа 1), голубым – элементы контроля уровня экспрессии, определяющие стабильность целевой мРНК и белка (группа 2), желтым – элементы плазмидного бирепликонного вектора, способного к автономной экспрессии в *Rhodococcus* и *E. coli* (группа 3), зеленым – «вспомогательные» элементы (группа 4). Ori rep – ориджин репликации, Ab<sup>R</sup> – ген, придающий устойчивость к антибиотику

«Вспомогательные» элементы из четвертой группы используют как на стадиях разработки и тестирования конструируемых систем экспрессии, так и во время процесса экспрессии целевых генов. В качестве примеров применения на стадии разработки можно привести использование репортёрных белков для оценки силы промоторов и эффективности RBS, для конструирования систем экспрессии со сложной системой регуляции, для трекинга распределения веществ внутри бактериальной клетки, а также использование дополнительных генетических инструментов для направленного редактирования генома, например систем CRISPR-Cas или рекомбиназ [64]. Во время процесса экспрессии целевых белков такие «вспомогательные» элементы как маркеры устойчивости к антибиотикам применяются для поддержания стабильности наследования плазмидных векторов, несущих рекомбинантные генетические конструкции, в клетках штамма-хозяина.

Ввиду того, что род *Rhodococcus* сильно отдален генетически от таких микроорганизмов как *E. coli* и *Bacillus*, большинство генетических инструментов, разработанных для этих бактерий, не могут применяться в родококках или требуют существенных изменений.

Среди литературных источников, освещающих вопросы генетических инструментов доступных для родококков, можно выделить несколько обзоров, посвящённых как роду *Rhodococcus* в целом [65, 66], так и отдельному штамму *R. opacus* PD630 [12]. Опираясь на эти работы, можно сказать, что в настоящее время бактерии *Rhodococcus* уже обладают обширным набором генетических инструментов для гетерологичной экспрессии белков, однако информация по многим из этих элементов носит фрагментарный характер и недостаточно систематизирована.

В данной работе основным объектом изучения является генетическая металло-зависимая система регуляции транскрипции, поэтому дальнейший подробный анализ литературных данных посвящен таким генетическим элементам контроля экспрессии в *Rhodococcus* как регуляторные области, состоящие из промоторов и RBS, и ТФ, регулирующие транскрипционную активность этих регуляторных областей. Также проведен анализ доступной информации по использованию репортёрных белков для экспериментального изучения регуляции транскрипции в *Rhodococcus*. Элементы второй и третьей группы не были объектами изучения данного исследования, поэтому в литературном обзоре подробно не обзревается.

### *1.2.2. Регуляторные области, используемые для гетерологичной экспрессии в бактериях Rhodococcus*

Регуляторная область в бактериях – это регион ДНК, находящийся перед старт-кодоном гена, включающий в себя как минимум два функциональных элемента: промотор, отвечающий за инициацию транскрипции и RBS, обеспечивающий инициацию трансляции. Эти два элемента функционируют независимо друг от друга, внося свой вклад в конечный результат экспрессии гена. Однако для родококков было проведено незначительное количество исследований, в

которых промоторы и RBS изучались как самостоятельные элементы, в то время как в большинстве работ авторы используют единый фрагмент ДНК, обеспечивающий как транскрипцию, так и трансляцию целевого гена. В дальнейшем анализе литературы и в практической части работы такие фрагменты будут называться «регуляторными областями», а под «промоторами» будут иметься ввиду участки ДНК, непосредственно контролирующие инициацию транскрипции. Помимо двух основных функциональных элементов регуляторные области также могут содержать дополнительные – сайты посадки ТФ и последовательности, формирующие вторичные структуры в 5'-конце нетранслируемой РНК.

Регуляторные области имеют две основные характеристики: «силу» и «регулируемость». «Сила» регуляторной области оценивается по количеству белка, синтезируемого под её управлением, которое обуславливается как силой промотора, так и силой RBS. По количеству целевой мРНК можно оценить силу промотора, входящего в эту область, не учитывая силу RBS. Характеристика «регулируемость» или «индуцибельность» описывает возможность изменения силы промотора, в ответ на изменение каких-либо внешних условий: температуры или pH окружающей среды, появление или изменение концентрации определенных химических веществ в среде (индукторов или репрессоров), накопление внутренних метаболитов в клетке и т.д. Как правило индукция транскрипции происходит при участии ТФ, связывающихся с определенными сайтами ДНК (операторами), которые могут находиться внутри регуляторных областей. Количественной величиной индуцибельности служит «степень индуцибельности», рассчитываемая как отношение максимально достижимого уровня экспрессии к минимальному – «базовому».

В настоящее время описано 139 последовательностей ДНК, являющихся экспериментально подтвержденными регуляторными областями, функционирующими в родококках (Приложение А). 75 из них являются уникальными регуляторными областями, а 64 – производными от этих уникальных областей. В некоторых случаях производные регуляторные области содержат мутации, приводящие к изменениям в силе промотора (например  $P_{amiM}$  была усилена по сравнению с исходной  $P_{ami}$  с помощью мутаций в боксе -10 [27]), в других случаях в регуляторные области были добавлены или удалены из них функциональные элементы, что изменило характер регулируемости (например, в  $P_{nhM}$  введены варианты сайта посадки оператора  $lacO$ , придающие полученным производным  $P_{LacRO1-2}$  способность к индукции изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) при наличии в штамме гена регулятора  $lacI$  [67]).

Для того, чтобы использовать регуляторную область как генетический инструмент для гетерологичной экспрессии целевого гена, необходимо знать ее силу и способность к регулируемости. К сожалению, эти параметры известны только для 36 и 82 областей соответственно, причем 32 области из 82 описаны как конститутивные, то есть нерегулируемые

(Приложение А). Для полноценного сравнения силы регуляторных областей необходимо, чтобы они были изучены в универсальных условиях: одном штамме-хозяине, с одинаковым репортёрным белком под их контролем и т.д. На сегодняшний момент описано несколько «наборов» регуляторных областей, для которых были проведены подобные исследования (Таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Наборы регуляторных областей для бактерий *Rhodococcus*

Набор	Штамм-хозяин	Количество регуляторных областей, шт.	Белок репортёр	Амплитуда силы, разы	Референсная регуляторная область	Источник
1	<i>R. ruber</i> TH3	15	$\beta$ -галактозидаза, GFPuv	137,0	P <sub>nhM</sub>	[27]
2	<i>R. opacus</i> PD630	16	GFP+	200,0	P <sub>21</sub> P <sub>nhM</sub>	[67]
3	<i>R. jostii</i> RHA1	28	mCherry	23,0	P <sub>nit</sub> P <sub>nhM</sub>	[68]
4	<i>R. erythropolis</i> CCM2595	3	GFP	3,0	P <sub>dapA</sub>	[24]
5	<i>R. opacus</i> PD630	26	GFP+	45,0	P <sub>21</sub>	[69]
6	<i>R. erythropolis</i> MAK154	3	Алкоголь-дегидрогеназа	6,5	P <sub>TRR</sub>	[29]
7	<i>R. jostii</i> RHA1	29	mCherry	80,0	P <sub>nit</sub>	[70]

Приведенные наборы отличаются как по количеству регуляторных областей (от 3 до 29 штук), так и по величине амплитуды их силы (от 3 до 200 раз). Амплитуда силы в данном случае представляет собой отношение силы самой сильной регуляторной области из набора к силе самой слабой области. Составы наборов и принципы их составления также различаются.

Набор 1 [27] состоит из 7 регуляторных областей, взятых из генома штамма *R. ruber* TH3 и их производных, полученных путем комбинаций исходных промоторных участков и RBS одной из этих регуляторных областей. Такой подход составления набора, с одной стороны, позволил оценить независимый вклад силы промотора в силу регуляторной области, а с другой – значительно повысить уровень экспрессии слабых промоторов, не изменяя последовательность



областей, отвечающих за связывание с РНК-полимеразой. Возможность направленно изменять силу регуляторной области, не внося изменения в область связывания с РНК-полимеразой может быть востребована для сохранения механизма регуляции силы регуляторной области. В этом же исследовании приведен расчет сравнительной силы нескольких RBS (выражена как «скорость трансляции») с помощью RBS Calculator software [71] для предсказания наиболее эффективного RBS, причем результат расчета был подтвержден экспериментально.

Набор 2 [67] состоит из нескольких конститутивных регуляторных областей из *R. oracius* PD630 и нескольких синтетических областей, в некоторые из которых был добавлен операторный участок *lacO*, придающий полученным производным способность к индукции ИПТГ при наличии в штамме-хозяине гена регулятора *lacI*. Данная работа является первой, в которой была показана возможность использования в клетках родококков ИПТГ-индуцибельной системы экспрессии. Кроме того, в данном исследовании был проведен сравнительный анализ силы двух RBS, и также как и в наборе 1 [27] изменение последовательности RBS позволило направленно изменять силу регуляторной области.

Набор 3 [68] включает в себя линейку мутантных вариантов конститутивного сильного промотора  $P_{10}$  из *R. jostii* RHA1 с измененными последовательностями сайтов -35 и -10, часть из которых имеет конститутивный характер экспрессии, а часть – содержит операторные участки *tetO<sub>1</sub>* и *tetO<sub>2</sub>*, которые являются сайтами посадки транскрипционного репрессора TetR. Полученные гибридные промоторы, содержащие операторные участки *tetO<sub>1</sub>* и *tetO<sub>2</sub>*, приобрели индуцибельный характер транскрипции: их транскрипционная активность заметно снизилась в условиях отсутствия индуктора, в качестве которого мог выступать тетрациклин или ангидротетрациклин. В присутствии индуктора транскрипционная активность этих вариантов дерепрессировалась.

Набор 4 [24] состоит из трех регуляторных областей: области  $P_{dapA}$  из *Corynebacterium glutamicum* и двух её усиленных мутантных вариантов с измененной последовательностью сайтов -10. Несмотря на то, что в набор входит всего три регуляторные области, он представляет собой интерес, так как демонстрирует разницу транскрипционной активности каждой из этих областей при экспрессии репортёрного гена в двух микроорганизмах: *C. glutamicum* и *R. erythropolis* CCM2595. Важно отметить, что несмотря на то, что рода *Corynebacterium* и *Rhodococcus* можно назвать родственными (относятся к одному порядку *Mycobacteriales*), функционирование генетических элементов, взятых из одного вида, в другом виде не является обязательным и потому требует экспериментальной проверки. В данном случае регуляторная область  $P_{dapA}$ , взятая из *C. glutamicum*, показала высокую транскрипционную активность в штамме *R. erythropolis* CCM2595.

Набор 5 [69] состоит из мутантных вариантов сильного конститутивного промотора  $P_{Constitutive}$ , который в свою очередь является усиленным вариантом промотора  $P_{ermEp1}$  из *Streptomyces lividans* TK24. Насыщающий мутагенез промотора  $P_{Constitutive}$  в районе сайтов -35 и -10 позволил получить набор из 26 конститутивных промоторов, сила которых плавно опускается от исходного варианта к наиболее слабому варианту, при этом амплитуда силы внутри набора составляет около 45 раз.

Набор 6 [29] состоит из трех генетических элементов: конститутивного промотора  $P_{hsr}$  из *S. griseus*, регуляторной области  $P_{1200rep}$  из *R. erythropolis* IAM 1400 и сильного конститутивного промотора  $P_{TRR}$  из *L. plantarum*. В проведенном исследовании промотор  $P_{TRR}$  использовали для экспрессии репортёрного белка в 18 различных видах родококков, получив разброс активности репортёрного белка более чем на порядок. Данное наблюдение не может быть напрямую интерпретировано как разница в транскрипционной активности промотора, так как могло быть вызвано в том числе разницей копийности используемого плазмидного вектора в различных видах микроорганизмов, однако наглядно демонстрирует возможные изменения в эффективности работы одних и тех же генетических элементов при переходе от одного штамма-хозяина к другому даже внутри одного рода микроорганизмов.

Набор 7 [70] состоит из 20 регуляторных областей сильно экспрессирующихся генов из генома *R. jostii* RNA1. Эти области представляются собой фрагменты длиной 500 п.н., захватывающие по 400 п.н. до и 100 п.н. после предсказанных старт-кодонов генов, находящихся под их контролем. Самая сильная из этих областей,  $P_{10}$ , послужила основой для создания нескольких укороченных вариантов, часть из которых обладала повышенной транскрипционной активностью.

Поскольку в большинстве наборов различаются штаммы-хозяева и репортёрные белки, совместить их в единую библиотеку на основании имеющихся данных невозможно. Так силу регуляторных областей из наборов 1, 2 и 3 затруднительно соотнести между собой несмотря на наличие в каждом из них области  $P_{nhm}$ . В то же время две пары наборов: 2 [67], 5 [69] и 3 [68], 7 [70] можно условно объединить в два составных набора 2-5 и 3-7 на основании общих репортёрных белков, штаммов-хозяев и наличия одинаковых регуляторных областей  $P_{21}$  (набор 2-5) и  $P_{nit}$  (набор 3-7).

Помочь сравнить силу регуляторных областей из разных наборов могут приведенные данные о количестве репортёрного белка, измеренном не специфическим методом (по активности ферментативной реакции или значениям интенсивности флуоресценции), а напрямую и выраженном, например, в виде концентрации растворенного белка в клетке. Такая информация является особенно актуальной для конструирования цельноклеточных биокатализаторов, так как они зачастую требуют повышения внутриклеточной концентрации

целевого белка до максимально возможных уровней. Для нескольких регуляторных областей были приведены результаты денатурирующих электрофорезов внутриклеточных растворенных белков в полиакриламидном геле:  $P_{57}$  [30],  $P_{TRR}$  [72],  $P_{nit}$  [73],  $P_{ami}$  или  $P_{a2}$  [9, 28, 38, 74],  $P_{tipARo}$  [75] и  $P_{dsz}$  [76], которые позволяют оценить количество белков, экспрессируемых под их контролем.

Что касается регулируемости транскрипционной активности, то 49 регуляторных областей и промоторов были описаны как индуцибельные. Для практического использования важным параметром является то, какой именно фактор выступает в роли индуцирующего, и наиболее предпочтительным будет являться вариант, когда транскрипционная активность регулируется с помощью добавки в среду химического соединения – индуктора. Условно все индуцибельные регуляторные области можно разделить на два класса в зависимости от того, какое вещество их индуцирует: индуцируемые дешевыми доступными нетоксичными соединениями (класс I) и индуцируемые соединениями, часто являющимися ксенобиотическими загрязнителями окружающей среды (класс II) (Таблица 1.2). Регуляторные области класса I можно использовать для биотехнологической продукции белков и различных клеточных метаболитов как в лабораторном, так и в промышленном масштабе, в то время как регуляторные области класса II больше подходят для создания биосенсоров на различные загрязнения и для биоремедиации загрязненных почв.

Таблица 1.2 – Классификация индуцибельных регуляторных областей и промоторов

Класс I		Класс II	
Регуляторная область/ промотор	Индуктор	Регуляторная область/ промотор	Индуктор
$P_{nh}$ (ТНЗ)* $P_{ami}$ $P_{50sl36}$ $P_{groE}$ $P_{niami}$	мочевина	$P_{LPD06699}$	фенол, гваякол, протокатеховая кислота, бензоат натрия, 4-гидро- ксибензойная кислота, ванилиновая кислота
$P_{BAD}$	арабиноза	$P_{bnz}$	ароматические углеводороды
$P_{lac}$ $P_{LacRO1-3}$	ИПТГ	$P_{LPD06568}$	фенол, бензоат натрия, гваякол
$P_{ace}$	ацетамид	$P_{icl}$	метанол
$P_{Tet}$	ангидротетрациклин	$P_{VAN}$	ванилиновая кислота

Продолжение Таблицы 1.2

Класс I		Класс II	
Регуляторная область/ промотор	Индуктор	Регуляторная область/ промотор	Индуктор
$P_{dsz}$	репрессия сульфатами и серосодержащими аминокислотами	$P_{ba2}$ $P_{ba2A23}$ $P_{ba2T1}$ $P_{ba2G3}$	Этилбензол
$P_{M6-T01-12}$	ангидротетрациклин	$P_{HBA}$	4-гидроксибензойная кислота
$P_{tipA}$ $P_{tipA-LG10}$ $P_{tipARo}$	тиострептон	$P_{IGRI}$ $P_{IGRIV}$	2,4-динитрофенол, 2,4,6-тринитрофенол, 2-хлор-4,6-динитрофенол, 2-метил-4,6-динитрофенол
$P_{LPD03031}$	репрессия аммонием	$P_{BEN}$	бензоат натрия
$P_{T7+lacO}$	ИПТГ, требуется T7 РНК-полимераза	$P_{Phenol}$ $P_{LPD06740}$	фенол
		$P_{alkB}$	C6–C22 н-алканы
		$P_{catA}$	фенол; репрессия сукцинатом
		$P_{bphA1}$	ароматические соединения
		$P_{GUA}$	гваякол
* регуляторная область $P_{nh}$ из штамма <i>R. ruber</i> TH3 [27]			

Для использования индуцибельных регуляторных областей и промоторов класса I в лабораторной или промышленной практике необходимо знать их степень индуцибельности. Другими важными параметрами являются уровень их «базовой» активности, то есть их минимальная транскрипционная активность без добавки индуктора или в присутствии вещества-репрессора (например, в случае области  $P_{LPD03031}$ , репрессируемой аммонием [77]) и способность к плавному регулированию транскрипционной активности с помощью изменения концентрации индуктора. Регуляторные области класса I, для которых известна степень индуцибельности, показаны на Рисунке 1.2, там же указаны области, для которых была показана возможность плавного регулирования силы.

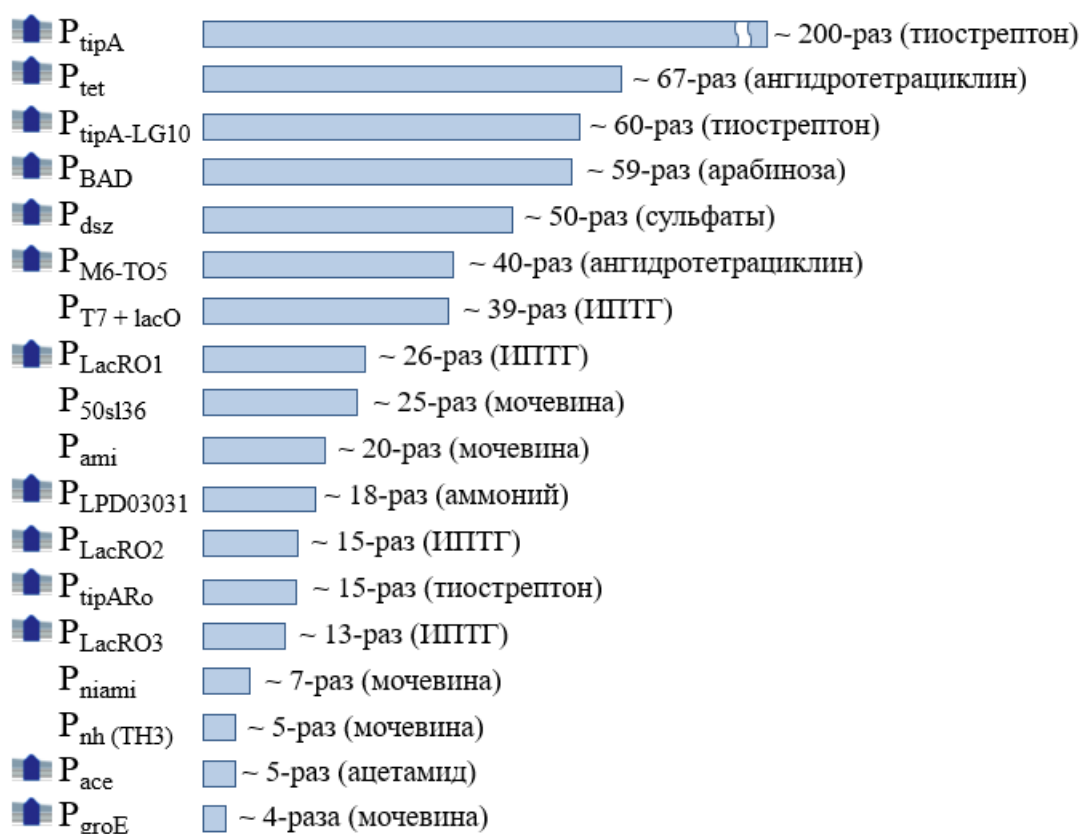


Рисунок 1.2 – Степени индуцибельности регуляторных областей и промоторов класса I. Знак регулирования слева обозначает возможность плавной регулировки силы, в скобках указаны индукторы.  $P_{nh (TH3)}$  – регуляторная область  $P_{nh}$  из штамма *R. ruber* TH3 [27]

Знание о «базовом» уровне активности особенно важно при экспрессии генов токсичных белков, так как использование даже слабого промотора, обладающего высокой «базовой» активностью, может привести к гибели клетки. Так, например, промотор  $P_{tipA}$  обладает, с одной стороны, достаточно низким «базовым» уровнем транскрипционной активности, а с другой – максимальной степенью индуцибельности, поэтому может применяться для экспрессии генов токсичных белков [78]. К сожалению, сравнить между собой «базовые» уровни различных промоторов и регуляторных областей, не входящих в один набор затруднительно, по причинам, перечисленным выше.

Актуальной проблемой использования уже описанных регуляторных областей и промоторов является недостаток данных о возможности сохранения уровня их силы и механизма регуляции при переносе их из одного вида родококков в другой. Например, в случае переноса сильных регуляторных областей  $P_{nh}$  и  $P_{ami}$  из *R. ruber* TH3 в *R. opacus* PD630 (см. серию  $P_{LacRO1-3}$  [67]), уровень их транскрипционной активности заметно понизился. Межвидовой перенос механизмов регуляции транскрипции возможен в том случае, если известны гены соответствующих транскрипционных регуляторов. Несколько генетических систем регуляции

транскрипционной активности регуляторных областей были протестированы как в разных видах *Rhodococcus*, так и в бактериях других родов (Таблица 1.3). Упомянутый в данной таблице перекрестный перенос генетических систем регуляции из *E. coli* в *Rhodococcus* может быть полезен для проверки функциональности целевого белка в обоих микроорганизмах без дополнительных этапов конструирования различных систем экспрессии.

Таблица 1.3 – Межродовой перенос генетических систем регуляции транскрипции

Регуляторная область/ промотор	Индуктор	Ген регулятора транскрипции	Межродовой перенос
P <sub>BAD</sub>	арабиноза	<i>araC</i>	из <i>E. coli</i> в <i>R. opacus</i> PD630 [77]
P <sub>LacRO1-3</sub> P <sub>T7 + lacO</sub>	ИПТГ	<i>lacI</i>	оператор lacO из <i>E. coli</i> в <i>R. opacus</i> PD630 [67]
P <sub>tipA</sub> P <sub>tipA-LG10</sub>	тиострептон	<i>tipAL</i>	из <i>S. coelicolor</i> JCM4979 в <i>R. erythropolis</i> JCM3201 [75], <i>R. fascians</i> JCM10002 [78], <i>R. fascians</i> F7 [79], <i>R. opacus</i> PD630 [80], <i>R. opacus</i> DSM44193 [78], <i>R. jostii</i> RHA1 [79]
P <sub>Tet</sub>	ангидротетрациклин	<i>tetR</i>	из <i>E. coli</i> в <i>R. opacus</i> PD630 [67, 77], <i>R. jostii</i> RHA1 [68]

Таким образом характеристика новой регуляторной области в *Rhodococcus* должна состоять из следующих шагов:

1. определение характера экспрессии, контролируемой данной областью: конститутивный или индуцибельный. В случае выявления индуцибельности необходимо провести определение природы возникновения этого явления: реакция микроорганизма на присутствие индуктора/репрессора, изменение внешних условий среды (температура, pH), изменение физиологического состояния клетки на различных стадиях роста и т.д;

2. определение степени индуцибельности экспрессии. Желательно определение «базового» и максимального уровня экспрессии и возможности плавного регулирования уровня внутри этого диапазона;

3. в случае, если экспрессия регулируется на транскрипционном уровне – определение генов, кодирующих регуляторы данной экспрессии, и выяснение механизма регуляции (репрессии/активации);

4. в случае определения генов, кодирующих регуляторы транскрипции – проверка возможности межвидового и межродового переноса генетической системы регуляции и характеристика транскрипционной активности регуляторной области в новых штаммах-хозяевах.

Чем более полной является характеристика новой регуляторной области, тем более удобной эта область будет для практического использования при конструировании рекомбинантных штаммов родококков.

Важно отметить, что независимо от используемого репортёрного белка, определение силы регуляторной области желательно сопровождать определением количества этого белка относительно всех растворенных внутриклеточных белков. В таком случае характеристика силы данной регуляторной области может быть использована для сравнения с другими известными регуляторными областями и промоторами даже в случае использования различных репортёрных белков.

Говоря о силе промотора, важно также упомянуть о возможности предсказания этой силы с помощью биоинформатических методов. В настоящее время существует множество ресурсов и программ, направленных на предсказание как наличия промоторов в заданной последовательности ДНК, так и их силы. На момент написания данной работы наиболее удобными и доступными ресурсами были BPROM [81], NNPP [82], PromoterHunter [83] и SAPPHIRE.CNN [84], однако все они опирались на данные о консенсусных последовательностях промоторов из *E. coli* (в большей степени тех из них, которые узнаются  $\sigma^{70}$  фактором РНК-полимеразы). Как уже было сказано ранее, *E. coli* и *Rhodococcus* сильно отличаются генетически, поэтому можно предполагать, что данные алгоритмы могут давать некорректные результаты при использовании последовательностей ДНК, взятых из геномов *Rhodococcus*. Поскольку достоверно известно о транскрипционной активности некоторых промоторов как в *E. coli*, так и в *Rhodococcus* (Таблица 1.3), можно ожидать, что данные программы успешно распознают в геноме родококков те промоторы, которые структурно похожи на консенсусные последовательности промоторов из *E. coli*. При этом те промоторы, чьи сайты посадки сильно отличаются от таких последовательностей, останутся необнаруженными, что приведет к ложноотрицательным результатам биоинформатического анализа. Из этого следует важное замечание: результаты биоинформатического поиска промоторов *Rhodococcus* требуют обязательной экспериментальной проверки, поскольку последовательности, не содержащие предсказанных промоторов, тем не менее могут проявлять транскрипционную активность в клетках родококков.

### 1.2.3. Репортёрные белки, используемые в бактериях *Rhodococcus*

Репортёрные белки могут быть использованы для различных целей: оценки эффективности генетических регуляторных элементов (промоторов, терминаторов и т.д.), локализации белков и субструктур внутри клетки, автоматического высокопроизводительного клеточного сортирования и локализации клеток в окружающей среде [85]. Репортёрные белки различаются по принципу их детекции: светоизлучающие (флуоресцирующие и биолюминесцирующие белки), и катализирующие реакции образования окрашенных продуктов. Оба типа репортёрных белков были использованы в бактериях *Rhodococcus* (Таблица 1.4). Флуоресцентные белки кажутся более удобным типом репортёрных белков для всех перечисленных выше задач, так как измерение интенсивности флуоресценции (ИФ) не требует добавления какого-либо субстрата и инкубации [86].

Таблица 1.4 – Репортёрные белки, используемые в бактериях *Rhodococcus*

Репортёрный белок	Описание	Способ детекции	Источник
GFP+	зеленый флуоресцентный белок с повышенными эффективностью фолдинга и ИФ	измерение ИФ	[67, 69, 77]
sfGFP	зеленый флуоресцентный белок с повышенной эффективностью фолдинга	измерение ИФ	[77]
eGFP	зеленый флуоресцентный белок с повышенной ИФ	измерение ИФ	[67]
rsGFP	зеленый флуоресцентный белок с пиком возбуждения, смещенным в красную сторону спектра	измерение ИФ	[24, 87]
GFPuv	зеленый флуоресцентный белок, с пиком возбуждения, смещенным в ультрафиолетовую сторону спектра	измерение ИФ	[27]
CFP	голубой флуоресцентный белок	измерение ИФ	[77]
EYFP	желтый флуоресцентный белок с повышенной ИФ	измерение ИФ	[69, 77]
RFP	мономерный красный флуоресцентный белок	измерение ИФ	[77]



Продолжение Таблицы 1.4

Репортёрный белок	Описание	Способ детекции	Источник
DsRed.T4	красный флуоресцентный белок с быстрым созреванием, высокой растворимостью и пониженным уровнем остаточного излучения в зеленой части спектра	измерение ИФ	[24]
mCherry	яркий красный флуоресцентный белок с быстрым созреванием	измерение ИФ	[64, 67, 68, 77]
LuxAB	люцифераза	измерение люминисценции	[88-92]
LacZ	$\beta$ -галактозидаза	измерение ферментативной активности	[27]
XylE	катехол-2,3-диоксигеназа	измерение ферментативной активности	[21, 30]
PIP	пролиниминопептидаза	измерение ферментативной активности	[75, 78]

К сожалению, сравнение между собой результатов, полученных при использовании разных флуоресцентных белков, невозможно из-за существенно различающихся светоизлучающих способностей различных белков [77]. Существенной проблемой в случае использования флуоресцентных белков также может оказаться фоновая флуоресценция клеточных компонентов, которая может препятствовать измерению ИФ, транскрибируемых со слабых промоторов.

Некоторые другие применения флуоресцентных белков в *Rhodococcus* включают: локализацию плазмид [93] и хромосом [94] в клетке, визуализацию функционирования нанокompартментов инкапсулина в клетке [95], локализацию целых клеток внутри гетерогенной биокаталитической системы [96], отслеживание выживания клеток в почве [97] и мониторинга разрушения клеток во время биокаталитического процесса [38].

Светоизлучающие белки другого типа, люциферазы, не требуют облучения светом с определенной длиной волны, так как в их случае испускание света происходит во время катализируемой ими реакции окисления. При этом их функционирование зависит от

энергетического состояния клетки и эффективности работы белков-шаперонов [98, 99]. Их основным преимуществом является высокая чувствительность, основанная на отсутствии биолюминесценции клетки [100], благодаря чему люциферазы кажутся хорошим выбором для изучения транскрипционной активности слабых промоторов. Основным недостатком люцифераз при этом является большая длина экспрессионной кассеты при использовании полного бактериального оперона *luxCDEAB* (гены *luxCDE* необходимы для обеспечения субстратом люциферазы *LuxAB*). Кроме того, люциферазы неприменимы для исследований локализации белков и сортировки клеток.

Что касается репортёрных белков, количество которых измеряется по ферментативной реакции, в клетках *Rhodococcus* были успешно использованы хорошо изученные  $\beta$ -галактозидаза LacZ [27] и катехол-2,3-диоксигеназа Ху1Е [30]. Измерение их активности требует разрушения клеток, поскольку клеточная стенка родококков недостаточно проницаема для соответствующих субстратов, что несколько затрудняет их использование. Измерение активности пролиниминопептидазы Р1Р [75, 78], напротив, проходит без разрушения клеток, поскольку её субстрат легко диффундирует в клетки. Использование репортёра этого типа не имеет преимуществ перед светоизлучающими репортёрами, за исключением тех случаев, когда представляющие биотехнологический интерес фермент сам выступает в роли репортёрного белка.

Если в качестве репортёрного белка для оценки силы промотора или регуляторной области используется новый фермент, для него необходимо показать прямую корреляцию изменения ферментативной активности клетки и относительного количества мРНК репортёрного гена. В том случае, если данные о такой корреляции отсутствуют, изменение ферментативной активности клетки может быть интерпретировано не только как изменение транскрипционной активности промотора, но и как изменение активности самого репортёрного белка, происходящие в следствие изменений условия выращивания. При использовании фермента в качестве репортёрного белка важно также учитывать допустимые пределы измерения его активности (как минимальную детектируемую активность, так и максимальную) и биохимию самого фермента. Так, например, фермент, ингибируемый субстратом или продуктом реакции, не может быть использован в качестве репортёрного.

### 1.3. Штамм *Rhodococcus rhodochrous* M8 и штаммы, производные от него

#### 1.3.1. Кобальт-зависимая экспрессия генов нитрилгидратазы в штамме *Rhodococcus rhodochrous* M8

Штамм *Rhodococcus rhodochrous* M8 является природным почвенным изолятом, выделенным ранее в лаборатории №22 НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов [101]. Данный штамм интересен прежде всего тем, что является продуцентом фермента нитрилгидратаза, катализирующего превращение акрилонитрила в акриламид. Нитрилгидратаза из штамма *R. rhodochrous* M8 относится к Co-типу, то есть содержит ионы кобальта в активном центре фермента. Известно, что нитрилгидратазы такого типа являются гетеротетрамером вида  $\alpha_2\beta_2$ , причем за связывание с ионом кобальта отвечает  $\alpha$ -субъединица, таким образом связывание происходит между поверхностями двух  $\alpha$ -субъединиц [102]. Ионы кобальта в активном центре нитрилгидратазы взаимодействуют с атомом углерода акрилонитрила [102], что обеспечивает протекание ферментативной реакции, поэтому этот фермент в полной мере является металло-ферментом, а наличие ионов кобальта в среде необходимо для его функционирования.

Для понимания роли ионов кобальта в экспрессии генов нитрилгидратазы необходимо учитывать механизм формирования активного ферментного комплекса. Для ближайшего аминокислотного гомолога нитрилгидратазы NhhVA из штамма *R. rhodochrous* M8 – NhhVA из штамма *R. rhodochrous* J1 (97,00 % процентов гомологии для  $\beta$ -субъединицы и 99,00% для  $\alpha$ -субъединицы) было показано, что пост-трансляционное созревание фермента происходит по так называемому механизму «самообмена субъединицами» (от англ. «self-subunit swapping») [103]. Было показано, что вспомогательный белок нитрилгидратазы, металло-шаперон NhhG, формирует комплекс с  $\alpha$ -субъединицей и координирует ее связывание с ионом кобальта (комплекс Co- $\alpha e_2$ , где e – белок NhhG). Одновременно с этим происходит формирование неактивного комплекса  $\alpha_2\beta_2$ , не содержащего в своем составе ионов кобальта. Затем неактивный комплекс  $\alpha_2\beta_2$  и комплекс Co- $\alpha e_2$  обмениваются  $\alpha$ -субъединицами, таким образом  $\alpha$ -субъединица, связанная с ионом кобальта, формирует связь с  $\beta$ -субъединицей и образует активный фермент вида Co- $\alpha_2\beta_2$ . Белок NhhG из штамма *R. rhodochrous* J1 имеет гомологию с N-концевой частью  $\beta$ -субъединицы нитрилгидратазы, что, по-видимому, указывает на домены белков, отвечающие за взаимодействие с  $\alpha$ -субъединицей.

Таким образом для формирования активного ферментного комплекса нитрилгидратазы NhhVA необходимо наличие двух компонентов: доступных ионов кобальта и вспомогательного белка NhhG. При этом ген вспомогательного белка *nhhG* транскрипционно сопряжен с генами *nhhVA*, формируя оперон *nhhVAG*.

Поскольку нитрилгидратаза из штамма *R. rhodochrous* M8 высокогомологична нитрилгидратазе из штамма *R. rhodochrous* J1, можно было ожидать, что формирование ее активного ферментного комплекса происходит по схожему механизму. Действительно, ранее при изучении этого штамма была предсказана открытая рамка считывания (ORF) длиной 312 п.н., расположенная сразу после гена  $\alpha$ -субъединицы *nhmA*. Результат Нозерн-гибридизации показал, что данный участок транскрибируется в составе единой полицистронной молекулы мРНК с генами *nhmBA* [104]. На момент изучения экспрессии генов нитрилгидратазы в штамме *R. rhodochrous* M8 еще не был открыт описанный выше механизм созревания активного ферментного комплекса и не было известно о необходимости наличия вспомогательного белка, поэтому функции белка, кодируемого этой ORF, не изучались экспериментально. В дальнейшей работе (Раздел 3.1. и далее) данная ORF обозначена как ORF №17 или ген *nhmG*.

Особенностью экспрессии генов нитрилгидратазы в штамме *R. rhodochrous* M8 стало открытие зависимости транскрипции генов нитрилгидратазы от присутствия в среде ионов кобальта [101], подтвержденное результатами Нозерн-гибридизации. Ранее подобный феномен не наблюдался ни для одной из описанных нитрилгидратаз. Механизм, обеспечивающий кобальт-зависимую регуляцию транскрипции, на предыдущем этапе исследования штамма *R. rhodochrous* M8 не изучался.

Анализ близлежащих областей в окружении генов *nhmBA* позволил предсказать перед генами *nhmBA* две ORF длиной 1086 п.н и 339 п.н (Рисунок 3.1). Первая из этих ORF длиной 1086 п.н. была названа *nhmC* (далее в Разделе 3.1 также обозначена как ORF №12) по аналогии с найденным гомологом *nhhC* в штамме *R. rhodochrous* J1. С помощью нокаутирования гена *nhmC* было показано, что кодируемый им белок *NhmC*, по-видимому, является позитивным регулятором экспрессии генов нитрилгидратазы, поскольку при его отсутствии в клетке синтеза нитрилгидратазы не наблюдалось. Функции второй ORF длиной 339 п.н. (далее в Разделе 3.1 обозначена как ORF №13 или ген *nhmD*) экспериментально не изучались, однако было предположено, что она также может выступать регулятором экспрессии генов нитрилгидратазы. Расстояние между этой ORF и геном *nhmB* составляло более 1000 п.н., на протяжении которых не было обнаружено других ORF. Данный участок содержал область, высокогомологичную гену *nhhE* из штамма *R. rhodochrous* J1, функция которого не была известна, хотя было уставлено, что ген *nhhE* не был существенно важен для экспрессии генов нитрилгидратазы [105]. После генов *nhmBA* было обнаружено две области, в которых были найдены гомологии с регуляторными белками и транспозазой IS1164, однако ни точные границы соответствующих генов, ни их участие в регуляции экспрессии генов нитрилгидратазы не изучались.

Таким образом, обнаруженное в штамме *R. rhodochrous* M8 явление кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы не имело каких-либо предположительных

объяснений, поскольку функции генов, находящихся в их ближайшем окружении, не были изучены в достаточной степени, а аналогов этого явления в других штаммах, продуцирующих нитрилгидратазы, не было описано в литературных источниках.

### 1.3.2. Штаммы, производные от штамма *Rhodococcus rhodochrous* M8

В ходе лабораторных работ со штаммом *R. rhodochrous* M8 в лаборатории №22 НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов был получен ряд производных штаммов [104]. В настоящей работе использовались два производных штамма: *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M50, отличающиеся от исходного штамма протяженными делециями в геноме (Рисунок 1.3).

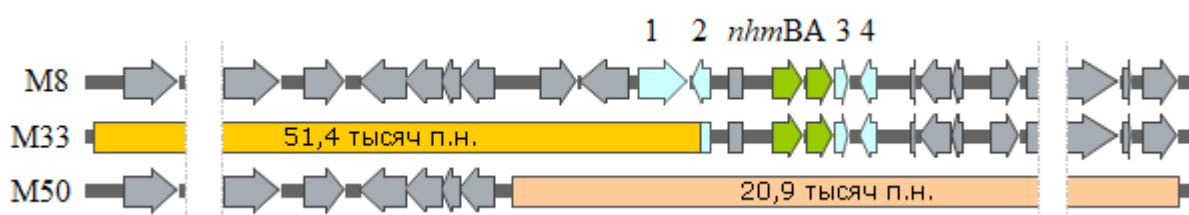


Рисунок 1.3 – Различия в структуре геномов штаммов *R. rhodochrous* M8, M33 и M50. Зеленым обозначены гены нитрилгидратазы *nhmBA*; 1, 2, 3, 4 – гены *nhmC*, *nhmD*, *nhmG*, *cblA* (см. Раздел 3.1 и словарь терминов), желтый и оранжевый участки – делеции в геномах штаммов *R. rhodochrous* M33 и M50

Как отмечено на Рисунке 1.3, в штамме *R. rhodochrous* M33 произошла делеция области ДНК длиной около 51,4 тысяч п.н., из-за чего ген *nhmC* был полностью делетирован, а находящаяся рядом с ним ORF длиной 339 п.н. оказалась делетирована частично. При этом делеция в данной ORF затронула 152 п.н. перед стоп-кодоном гена, поэтому было предположено, что оставшаяся в хромосоме штамма *R. rhodochrous* M33 часть ORF кодировала нефункциональный пептид. Структура оперона генов нитрилгидратазы и области генома после него в данном штамме не отличались от родительского штамма *R. rhodochrous* M8.

В штамме *R. rhodochrous* M50 произошла делеция области ДНК длиной около 20,9 тысяч п.н., затронувшая весь оперон генов нитрилгидратазы и области вокруг него (Рисунок 1.3).

В штамме *R. rhodochrous* M50 не детектировалась нитрилгидратазная активность независимо от присутствия или отсутствия ионов кобальта в среде [104]. В штамме *R. rhodochrous* M33 экспрессия генов нитрилгидратазы ожидаемо требовала присутствия ионов кобальта в среде для формирования активного ферментного комплекса [104]. Стоит отметить, что ранее этот штамм был охарактеризован как «конститутивно экспрессирующий гены нитрилгидратазы», однако данное утверждение касалось отсутствия регуляции экспрессии генов нитрилгидратазы амидами и нитрилами, которая была присуща родительскому штамму

*R. rhodochrous* M8 [104]. При этом наличие регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы ионами кобальта в данном штамме не проверялось.

#### 1.4. Металло-регуляция транскрипции в бактериях

В литературе описано множество примеров систем регуляции экспрессии генов в бактериях, реагирующих на присутствие в среде ионов тяжелых металлов, таких как медь, никель, кобальт, цинк и т.д. Высокие концентрации ионов тяжелых металлов токсичны для клеток и продукты регулируемых таким образом генов обычно выполняют функции по поддержанию гомеостаза соответствующих ионов металла в клетках.

Металло-регуляция транскрипции у бактерий осуществляется с помощью двух механизмов: ТФ и рибопереключателей. Металло-регулируемые рибопереключатели на сегодняшний день являются менее изученной областью. В недавно вышедшем обзоре, посвящённом этим генетическим элементам [106], упомянуты рибопереключатели, чувствительные к ионам лития, натрия, магния, марганца, железа, кобальта и никеля. В контексте кобальт-зависимой регуляции транскрипции особо стоит упомянуть рибопереключателем NiCo из *Clostridium scindens* [107], регулирующей экспрессию транспортера кобальта, который селективно взаимодействует с ионами  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ . В отсутствие ионов  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$  рибопереключателем образует терминирующую шпильку в 5'-нетранслируемой области мРНК целевого гена, из-за чего транскрипция гена прерывается и синтез транспортерного белка не происходит. В присутствии ионов  $\text{Co}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$  происходит связывание этих ионов и мРНК рибопереключателем, в результате чего в 5'-нетранслируемой области мРНК формируется альтернативная вторичная структура и терминирования транскрипции не происходит, что делает возможным синтез транспортерного белка. На сегодняшний день NiCo является единственным описанным представителем рибопереключателей, для которого были установлены сайты связывания с ионами  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ni}^{2+}$ . Учитывая такую неполноту данных, можно предположить, что результат биоинформатического поиска металло-регулируемых рибопереключателей в исследуемой области ДНК может быть ложноотрицательным, что потребует экспериментальной проверки.

По текущим представлениям в основном гомеостаз ионов металлов внутри бактериальных клеток поддерживается при помощи регуляторных белков – ТФ, которые способны взаимодействовать непосредственно как с ДНК в регуляторных областях генов, так и с ионами металлов. Взаимодействие с ионами металлов вызывает изменение конформации этих белков, что либо изменяет их способность к связыванию с ДНК в регуляторных областях (происходит

либо связывание, либо диссоциация), либо другим образом приводит к изменению доступности промоторного участка для РНК-полимеразы [108].

Выделяют несколько основных семейств металло-чувствительных ТФ: MerR, ArsR-SmtB, Fur и DxtR, а также несколько меньших по составу семейств: NikR, CopY и ModE. Белки, относящиеся к семействам MerR и ArsR-SmtB, в большинстве случаев регулируют экспрессию генов белков, необходимых для вывода ионов металлов из клетки при их избыточной концентрации. Белки семейств Fur и DxtR регулируют экспрессию генов белков, участвующих в транспорте ионов металлов внутрь клетки, подавляя экспрессию генов транспортеров при избыточной концентрации ионов металлов в клетке.

В строении металло-чувствительных регуляторных белков можно выделить следующие общие черты [109]:

1. металло-чувствительные белки являются гомодимерами либо гомотетрамерами,
2. центры связывания с ионами металлов находятся на границе между субъединицами, что способствует изменению конформации белков при взаимодействии с ионами,
3. основным фактором, от которого зависит селективность белков по отношению к ионам металлов, является координационная геометрия образуемых металлами комплексов.

Семейство MerR было названо по первому представителю – регулятору MerR, обеспечивающего устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к ионам ртути [110]. Белок MerR активирует экспрессию *mer*-оперона в присутствии ионов ртути и репрессирует ее в случае их отсутствия. Другой представитель семейства MerR, белок CoaR из *Synechocystis* PCC 6803, в присутствии ионов кобальта активирует экспрессию протонной АТФ-зависимой помпы, выводящей эти ионы из клетки, и репрессирует ее экспрессию при понижении концентрации ионов кобальта в клетке до определенного уровня [111]. Регуляторы семейства MerR связываются с ДНК в регуляторной области с помощью консервативного домена, содержащего мотив НТН (от англ. «Helix-Turn-Helix» – «спираль-поворот-спираль»). В связанном с ионами металлов состоянии белки изменяют свою конформацию, не диссоциируя при этом от молекулы ДНК, за счет чего сокращается расстояние между функциональными элементами промотора и появляется возможность инициации транскрипции. В отсутствие ионов металлов элементы промотора находятся на неподходящем расстоянии друг от друга, из-за чего РНК-полимераза не может сформировать с ними устойчивый комплекс и иницировать транскрипцию. Представители семейства MerR участвуют в поддержании устойчивости клеток к различным металлам, в том числе меди, серебра, свинца и цинка [108].

Семейство ArsR-SmtB является самым разнообразным среди всех семейств металло-регуляторов – его представители обладают по меньшей мере 13-ю металло-чувствительными мотивами [112]. В перечне металлов, к которым различные белки семейства ArsR-SmtB имеют

чувствительность, на текущий момент значатся мышьяк, сурьма, висмут (белок ArsR из *E. coli*, давший название семейству), цинк (белок SmtB из *Synechococcus* sp., также давший название семейству), кадмий, свинец (белок CadC из *Staphylococcus aureus*), кобальт, никель (белок NmtR из *Mycobacterium tuberculosis*), медь и серебро (белок VxmR из *Oscillatoria brevis*). Белки семейства ArsR-SmtB являются транскрипционными репрессорами, которые в отсутствие ионов металлов находятся в связанном состоянии с ДНК в районе регуляторных областей генов, причем сайты связывания этих белков находятся в непосредственной близости к сайтам связывания РНК-полимеразы или перекрываются с ними. В присутствии ионов металлов репрессоры ArsR-SmtB, связываясь с этими ионами, меняют свою конформацию и диссоциируют от ДНК, освобождая сайты связывания РНК-полимеразы для инициации транскрипции.

Классическая структура белка семейства ArsR-SmtB выглядит как  $\alpha 1-\alpha 2-\alpha 3-\alpha 4-\beta 1-\beta 2-\alpha 5$ , где  $\alpha N$  – альфа спирали и  $\beta N$  – бета листы, при этом связывание ионов металлов как правило происходит в двух различных сайтах, расположенных в  $\alpha 3$  и  $\alpha 5$ , реже – в  $\alpha 2$  (например, белок-активатор AioF из *Thiomonas arsenitoxydans*, чувствительный к ионам мышьяка [113]) и  $\alpha 4$  (например, белок CmtR из *M. tuberculosis*, чувствительный к ионам кадмия и свинца [114]). Сайт связывания  $\alpha 3$  координирует ион металла тремя остатками цистеина, два из которых обычно входят в высококонсервативный мотив ELCV(C/G)D, а третий расположен либо так же в  $\alpha 3$  (сайты  $\alpha 3$ ), либо ближе к N концу белка (сайты  $\alpha 3N$ ). Белки, содержащие  $\alpha 3$  сайт, чаще чувствительны к ионам  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $Bi^{3+}$ . Сайт связывания  $\alpha 5$  образуется двумя субъединицами гомодимерного белка с помощью 4-х консервативных аминокислотных остатков, причем из каждой субъединицы в формировании сайта участвуют по два остатка. Консенсусная последовательность при этом имеет вид  $DxHx_{10}Hx_2(E/H)$ , где  $x_N$  – не консервативные аминокислотные остатки с указанием их количества. Сайты  $\alpha 5$  чаще чувствительны к ионам  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Ni^{2+}$ . Важно отметить, что белки семейства ArsR-SmtB могут иметь, как только один сайт связывания, так и оба одновременно.

Связывание с ДНК происходит за счет высококонсервативного мотива НТН ( $\alpha 3$ -turn- $\alpha 4$ ), а бета листы  $\beta 1-\beta 2$  формируют мотив «крыло», поэтому белки семейства ArsR-SmtB называют также wНТН (от англ. «winged Helix-Turn-Helix»). ДНК последовательность, являющаяся сайтом посадки белка, представляет собой несовершенный инвертированный повтор (палиндром), чаще всего имеющий вид «12-2-12». Известны отдельные случаи, когда сайт посадки имеет вид «13-4-13» (белок KmtR из *M. tuberculosis* [112]), «17-6-17» (белок ArsRC2 из *Microbacterium* sp. A33 [115]) или еще более отличается от стандартного вида. Стандартное расположение сайтов посадки при этом находится в районе боксов -35 и -10.

Белки семейства Fur (от англ. «ferric uptake regulator» – регулятор поглощения железа), являющиеся транскрипционными репрессорами, регулируют транскрипцию генов, продукты



которых необходимы для транспорта ионов железа в клетку, и часто выступают в роли глобальных регуляторов гомеостаза железа [116]. Данные регуляторы содержат мотив связывания с ДНК, wНТН, на N конце и сайт связывания с ионом железа на C конце белка. Взаимодействие с ионом железа меняет конформацию димеров белков семейства Fur таким образом, что их сродство к ДНК повышается и комплекс белок-ДНК стабилизируется, то есть ион железа в данном случае выступает как корепрессор. В отсутствие ионов железа репрессор диссоциирует от ДНК, что приводит к инициации транскрипции. Белки семейства Fur распространены по большей части в грамотрицательных бактериях и грамположительных бактериях с низким GC составом.

Семейство DtxR (от англ. «diphtheria toxin regulator» – регулятор дифтерийного токсина) названо в честь первого представителя – железо-чувствительного репрессора дифтерийного токсина DtxR из *Corynebacterium diphtheria* [117]. В последствии оказалось, что белки семейства DtxR репрессируют транскрипцию генов, связанных с транспортом ионов железа в клетку, подобно белкам семейства Fur, однако в отличие от последних, больше распространены в грамположительных бактериях с высоким содержанием GC, в том числе в бактериях рода *Rhodococcus*. Помимо белков, чувствительных к ионам железа, в семейство DtxR входят также белки, чувствительные к ионам марганца (MntR из *Bacillus subtilis* [118]) и цинка (TroR из *Treponema pallidum* [119]). Связывание этих белков с ДНК происходит за счет классического НТН мотива на N-конце. Белки также содержат два сайта связывания с ионами металлов и гидрофобный регион, ответственный за димеризацию. Димерная форма белка возможна только в присутствии ионов металлов, которые стабилизируют ее связанное состояние с молекулой ДНК в районе боксов -35 и -10 регулируемых промоторов.

Что касается менее обширных семейств, то среди них в контексте данной работы представляет интерес семейство NikR [108]. Металло-чувствительный репрессор NikR из *E. coli*, репрессирует транскрипцию оперона генов АТФ-зависимого транспортера ионов никеля в ответ на их избыточную концентрацию внутри клетки. Белок NikR содержит мотив «лента-спираль-спираль», за счет которого происходит связывание с ДНК. В отсутствие ионов никеля белок существует в димерной форме, которая имеет низкое сродство к ДНК, однако в присутствии ионов никеля образуется тетрамерный белок, который связывается с ДНК в районе бокса -10. Несмотря на то, что белок NitR может взаимодействовать также с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Cd}^{2+}$ , только взаимодействие с ионами никеля стабилизирует структуру комплекса белок-ДНК. Гомологи белка NikR были найдены в грамотрицательных бактериях и археях.

Белок CopY и его гомологи обладают селективной чувствительностью к ионам меди, белок ModE – к ионам  $\text{MoO}_4^{2-}$  [108].

Таким образом явление кобальт-зависимая регуляции транскрипции может связано либо с функционированием металло-чувствительного рибопереключателя (как известного NiCo типа, так и неизученного типа), либо с наличием металло-чувствительного регуляторного белка. Регуляторный белок при этом с большей вероятностью может относиться к семейству активаторов MerR или семейству репрессоров ArsR-SmtB, так как представители остальных семейств в большей степени чувствительны к присутствию ионов других металлов.

## 1.5. Фермент ациламидаза как репортёрный и целевой белок

### 1.5.1. Ферменты группы амидаз и ацилирование аминов

Амидазы – ферменты, способные гидролизовать амидную связь в небелковых молекулах, с образованием соответствующей кислоты и аммония. Группа амидаз разделяется на два семейства белков, не родственных друг другу: алифатические амидазы и амидазы семейства AS [120]. Первые, как правило, способны гидролизовать алифатические короткоцепочечные амиды – акриламид, ацетамид, пропионамид. Амидазы семейства AS помимо короткоцепочечных амидов гидролизуют более длинные алифатические амиды, а также разветвленные и ароматические амиды. Семейство AS амидаз (от англ. «Amidases Signature»), также известное как семейство GGSS, характеризуется наличием высококонсервативного домена GGSS, один из остатков серина которого входит в каталитическую триаду серин-серин-лизин, формирующую активный центр фермента.

Механизм катализируемой амидазами реакции гидролиза подробно изучен (Рисунок 1.4): на первом этапе происходит нуклеофильная атака ацильной группы амида ферментом амидазой с формированием промежуточного тетраэдрического фермент-субстратного комплекса. Далее происходит отщепление молекулы аммония и образование промежуточного ацилферментного комплекса. На завершающем этапе выступающая в качестве нуклеофила молекула воды формирует ацилфермент-нуклеофильный комплекс, который затем образует молекулу соответствующей кислоты, высвобождая фермент.

Помимо основной гидролитической активности амидазы обладают также ацилтрансферазной активностью, то есть способны переносить ацильный остаток амида на молекулу амина (ацилировать амины). Механизм данной реакции аналогичен механизму ферментативного гидролиза, описанному выше, за исключением того, что в качестве нуклеофила выступает не вода, а молекула амина (Рисунок 1.5). Важно отметить, что ацилтрансферазная реакция происходит в водном растворе, поэтому молекулы воды конкурируют за ацилферментный комплекс с молекулой амина, которая является акцептором переносимой ацильной части.

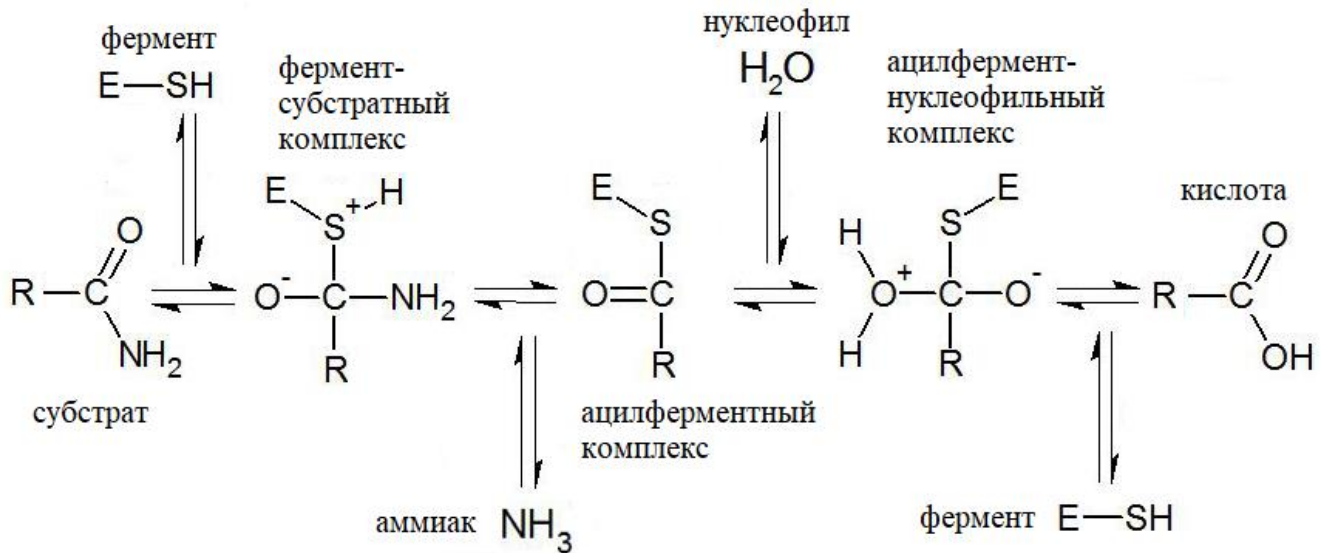


Рисунок 1.4 – Механизм реакции гидролиза амида, катализируемой амидазой

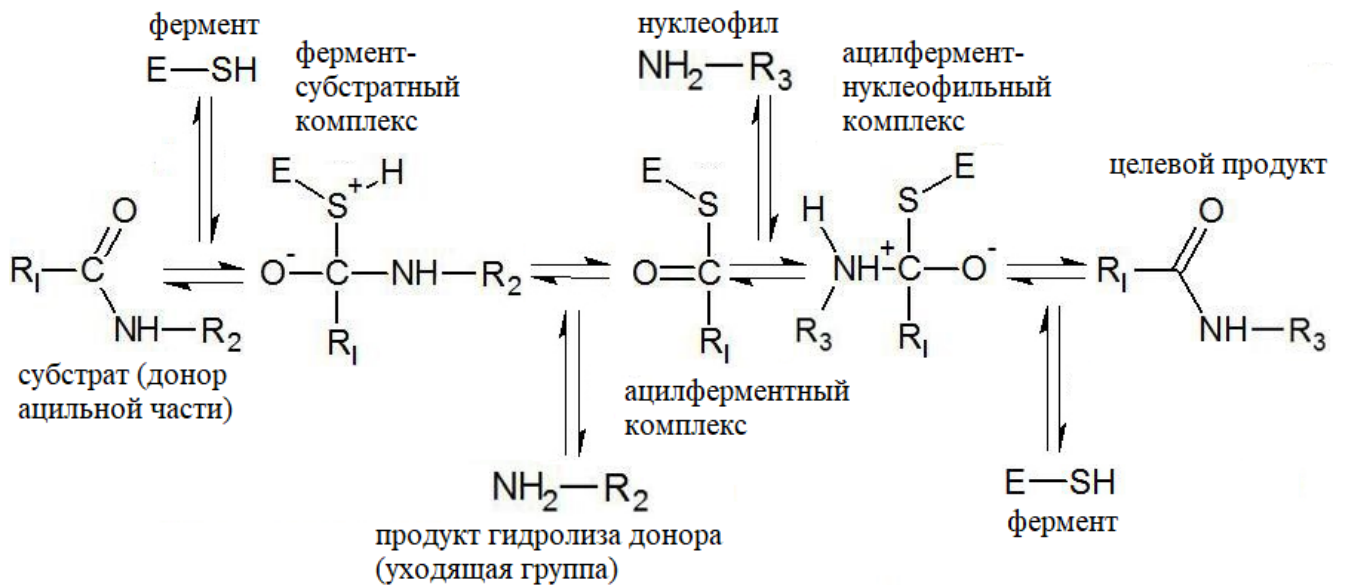


Рисунок 1.5 – Механизм ацилтрансферазной реакции, катализируемой амидазой

При изучении кинетики ацилтрансферазной реакции, катализируемой амидазами, было показано, что максимальный выход целевого продукта реакции определяется относительной специфичностью фермента по отношению к продукту и субстрату (донору ацильной части), а также относительной реакционной способностью молекулы нуклеофила [121, 122].

В литературе описано множество примеров изучения ацилтрансферазной активности различных амидаз, далее приведены лишь некоторые из них. В качестве молекулы нуклеофила большинство амидаз используют гидроксилламин и/или гидразин [123]. В качестве донора ацильной части различные амидазы могут использовать различные вещества. Так было показано, что для алифатических амидаз из *P. aeruginosa* [124] и *R. erythropolis* R312 [125] лучшими

донорами ацильной части являются ацетамид и пропионамид, для стереоселективной амидазы из *R. erythropolis* R312 [126] – среднепочечные амиды.

Амидаза из *B. smithii* ПТР6b2, способна использовать в качестве донора ацильной части гетероциклические амиды: никотинамид и изоникотинамид [127, 128]. С использованием этого штамма было разработано два биокаталитических синтеза: гидроксамата никотиновой кислоты из никотинамида и изониазида из изоникотинамида, при использовании в качестве нуклеофила гидроксилamina и гидразина соответственно. Амидаза из *P. putida* BR-1 [129] также может синтезировать гидроксамат никотиновой кислоты из никотинамида, но в отличие от фермента из *B. smithii* ПТР6b2 проявляет максимальную ацилтрансферазную активность при повышенной температуре 50 °С (против 30 °С) и позволяет получить продукт чистотой до 98 % без образования побочных продуктов. Также описаны амидазы, способные синтезировать бензогидроксамовую кислоту из бензамида и гидроксилamina, например амидаза из штамма *Alcaligenes* sp. МТСС 10674 [130].

Продолжается поиск новых амидаз для создания более эффективного способа получения ацетогидроксамовой кислоты из ацетамид и гидроксилamina. Например, амидаза из *Geobacillus pallidus* ВТР-5х МТСС 9225 [131] способна осуществлять реакцию с молярной конверсией ацетамид до 93%, что значительно превышает показатели амидазы из *R. erythropolis* R312 (55-60%).

Для большинства амидаз показана неспособность гидролизовать N-замещённые амиды, что может указывать на потенциальную неспособность таких амидаз ацилировать амины, имеющие большие замещающие радикалы, чем гидроксильная или аминная группа. Исключением является ациламидаза из *Rhodococcus erythropolis* ТА37, обладающая уникальной способностью использовать для ацилтрансферазной реакции алифатические амины в качестве нуклеофилов [132].

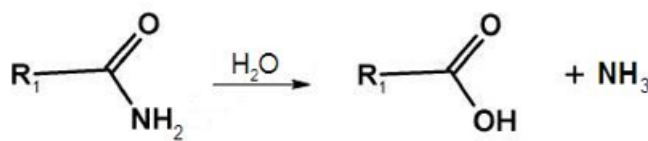
#### 1.5.2. Фермент ациламидаза как репортёрный белок

Белок ациламидаза Aam был открыт и описан ранее в лаборатории №22 НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов [133]. Данный фермент относится к группе амидаз, к семейству AS. Амидазы семейства AS гидролизуют широкий спектр амидов, однако единственным представителем этого семейства, способным гидролизовать N-замещённые амиды является ациламидаза из почвенного изолята *R. qingshengii* ТА37 (ранее в литературе был описан как *R. erythropolis* ТА37). Схема ферментативной реакции гидролиза N-замещённых амидов приведена на Рисунке 1.6 с указанием ацильной и аминной частей гидролизуемого амида. Оптимум pH для проведения гидролиза находится в нейтральной зоне от 7 до 8 единиц, при более щелочном значении реакция замедляется, а при более кислом – происходит инактивация фермента. Субстратная специфичность ациламидазы включает п-нитроанилиды кислот: п-

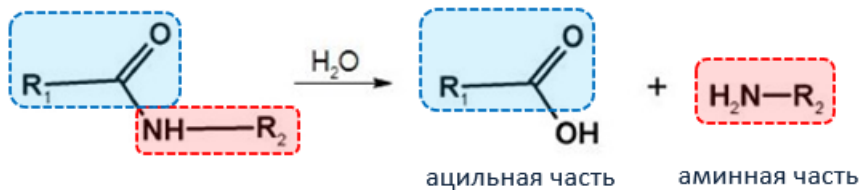
нитроацетанилид, глицин-*p*-нитроанилид и т.д., *N*-замещённые акриламидамы: *N*-изопропилакриламид (ИПАА), *N,N*-диметиламинопропилакриламид (ДМАПАА), метиленбисакриламид и *N*-ацетилпроизводные аминокислот глицина, аланина, лейцина.

Одним из самых предпочтительных субстратов для ациламидазы является *p*-нитроацетанилид, продукт гидролиза которого, *p*-нитроанилин, окрашивает раствор в ярко-желтый цвет (Рисунок 1.6). Данное свойство этого вещества можно использовать для спектрофотометрического измерения концентрации продукта реакции и таким образом легко оценивать ферментативную активность.

1 амидазы: гидролиз амидов



2 ациламидаза Aam: гидролиз *N*-замещённых амидов



3 ациламидаза Aam: гидролиз *p*-нитроацетанилида

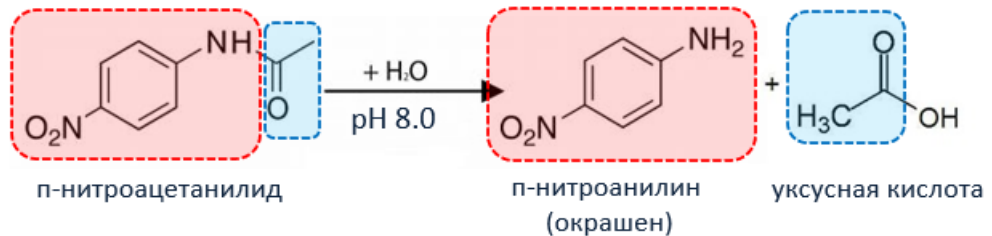


Рисунок 1.6 – Ферментативные реакции гидролиза, катализируемые амидазами. (1): общий вид реакции гидролиза амидов; (2): общий вид реакции гидролиза *N*-замещённых амидов; (3): реакция гидролиза *p*-нитроацетанилида

Ген ациламидазы *aam* был использован для гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* BLR (DE3) под контролем сильного фагового промотора P<sub>T7</sub>, однако ферментативная активность клеток находилась на низком уровне [134], что в целом часто встречается при гетерологичной экспрессии генов из родококков в клетках *E. coli*. Ген ациламидазы *aam* также экспрессировали в составе автономной плазмиды в двух штаммах родококков: *R. qingshengii* TA37 и *R. erythropolis* HX7 [135]. Важно отметить, что ациламидазную активность штаммов измеряли по количеству *p*-нитроанилина, образовавшегося в ходе описанной выше реакции, измеренному

спектрофотометрическим способом. Данный метод не требовал разрушения клеток, так как субстрат и окрашенный продукт реакции могли беспрепятственно диффундировать сквозь клеточную стенку бактерий. Таким образом фермент ациламидаза может рассматриваться в качестве перспективного репортёрного белка в клетках *Rhodococcus*, измерение ферментативной активности которого не требует разрушения клеток, проводится при нейтральном рН при температуре 37 °С [133], а измерение проводится с помощью спектрофотометрического способа.

#### *1.5.3. Фермент ациламидаза как целевой белок для синтеза N-замещённых акриламидов*

Для ациламидазы Aam из *R. erythropolis* TA37, помимо гидролитической активности, была также показана ацилтрансферазная активность, причем в качестве нуклеофилов (реципиентов ацильной части) она была способна использовать алифатические амины [132]. В результате ферментативного переноса ацильного участка с молекулы акриламида на алифатические амины синтезировались молекулы N-замещённых акриламидов. Ранее с помощью клеток *R. erythropolis* TA37, продуцирующих ациламидазу, была показана возможность биокаталитического синтеза двух N-замещённых акриламидов: ИПАА и ДМАПАА [132]. Было продемонстрировано, что наиболее эффективно ферментативная реакция ацилирования протекает при щелочных значениях рН, максимальный выхода продукта был зафиксирован при рН 10 и температуре 37 °С. Оптимизация параметров проведения синтеза позволила установить следующие предпочтительные величины: начальная концентрация акриламида в реакционной смеси 10 %; изопрпиламина – 4%; клеток биокатализатора – 10 г с.в.кл./л. Синтез, проведенный в таких условиях в течении 24 часов позволил получить выход целевого продукта до 20 мг/мл.

Поскольку ацилтрансферазная и гидролитическая активность являются свойствами одного и того же фермента, количество этого фермента можно определять по любой из этих реакций. Так как способ измерения ациламидазной (то есть гидролитической) активности, описанный в предыдущем разделе, является методически более простым, то количество целевого белка ациламидазы в штамме, катализирующим синтез N-замещённых акриламидов, можно определять с помощью него. Таким образом в данном штамме ациламидаза будет выступать как в качестве целевого фермента, так и в качестве репортёрного белка.

#### *1.5.4. Перспективы биокаталитического синтеза N-замещённых акриламидов*

Стоит отметить, что на сегодняшний день ациламидаза является единственным ферментом, продемонстрировавшим способность синтезировать N-замещённые акриламиды. Традиционно N-замещённые акриламиды получают с помощью химического синтеза. Исходным реагентом для синтеза является пропилен, из которого химическим синтезом получают акриловую кислоту и акрилонитрил. Из акриловой кислоты химическим путем получают N-замещённые акриламиды, а из акрилонитрила с помощью биотехнологического гидролиза – акриламид.

Процесс получения N-замещённых акриламидов проходит через дополнительную стадию – получение из акриловой кислоты акрилоилхлоридов и последующее ацилирование ими аминов.

Данный процесс сопряжен с рядом технологических трудностей, а именно: в большинстве процессов используются опасные реагенты (горючий и взрывоопасный газ пропилен, токсичные акрилоилхлорид и безводная акриловая кислота, кроме того, безводная акриловая кислота плохо хранится), условия проведения разных стадий процесса существенно различаются из-за различий фазового состояния ключевых реагентов и их технологических свойствах. В силу этого процессы, необходимые для получения N-замещённых акриламидов, сложно объединить в единое комплексное производство.

В последнее время в промышленности активно развивается тренд перехода к более безопасным и экологически безвредным процессам, поэтому перспективным направлением может стать перевод максимального количества вышеописанных стадий получения N-замещённых акриламидов на цельноклеточный биокатализ в водной среде, аналогичный тому, который используется для получения акриламида из акрилонитрила. Также биокаталитические процессы могут быть более унифицированными с точки зрения аппаратуры.

Использование цельноклеточного биокатализа теоретически возможно на всех стадиях после химического получения акрилонитрила. Процесс получения акриламида из акрилонитрила уже реализован в промышленности [136], а процессы биокаталитического получения из акриламида акриловой кислоты и N-замещённых акриламидов требуют разработки. Потенциально большая безопасность и единообразие этой группы биокаталитических процессов обусловлено тем, что все реагенты представляют собой водные растворы, не образуют паров и не горючи. Перспективным преимуществом такой схемы производства является и то, что биокатализаторы являются удобной платформой для последующего развития.

Поскольку клетки бактерий *Rhodococcus* имеют ряд преимуществ для использования в роли цельноклеточных биокатализаторов (Раздел 1.1 и Раздел 1.3), а фермент ациламидаза, способная синтезировать N-замещённые акриламиды, происходит из микроорганизма этого рода, перспективной стратегией разработки биокатализатора является экспрессия гена ациламидазы в клетках этого рода. Генетическая система регуляции экспрессии генов в штамме *R. rhodochrous* M8, позволяющая экспрессировать ген нитрилгидратазы на сверхвысоком уровне (Раздел 1.3), может послужить основой для создания рекомбинантных штаммов, производных от штамма *R. rhodochrous* M8, обладающих высоким уровнем ацилтрансферазной активности за счет повышенной экспрессии гена ациламидазы.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1. Материалы, использованные в работе

## 2.1.1. Бактериальные культуры

Обозначения использованных в работе штаммов и их описания приведены в Таблице 2.1. Описания упомянутых в Таблице 2.1 плазмид приведены далее в Таблице 2.2.

Таблица 2.1 – Штаммы, использованные в работе

Штамм	Описание	Источник
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi metB1 trpR55 relA1 lac, F' traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1 pUC19-P <sub>nh</sub> -AA	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC19-P <sub>nh</sub> -AA	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC19-P <sub>nh</sub> -AA-nhmG	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC19-P <sub>nh</sub> -AA-nhmG	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC57-2Tfd	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC57-2Tfd	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC57-1	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC57-1	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC57-2	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC57-2	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC57-3	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC57-3	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC57-4	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC57-4	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC57-5	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC57-5	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC57-6	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC57-6	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pUC57-7	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pUC57-7	эта работа



Продолжение Таблицы 2.1

Штамм	Описание	Источник
<i>E. coli</i> XL1 pRY16-1	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY16-1	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY16-2	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY16-2	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY16-3	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY16-3	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY16-4	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY16-4	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY16-5	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY16-5	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY16-9	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY16-9	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-P <sub>nh</sub> -AA-nhmG	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-P <sub>nh</sub> -AA-nhmG	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-UP-IS	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-UP-IS	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-1	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-1	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-1up	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-1up	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-6	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-6	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-6,5	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-6,5	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-7	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-7	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-8	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-8	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-P <sub>nh569</sub> -aam <sub>509</sub>	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-P <sub>nh569</sub> -aam <sub>509</sub>	эта работа

Продолжение Таблицы 2.1

Штамм	Описание	Источник
<i>E. coli</i> XL1 pRY1-P <sub>nh190</sub> -aam <sub>509</sub>	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY1-P <sub>nh190</sub> -aam <sub>509</sub>	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pTurboGFP-B	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pTurboGFP-B	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pTurboRFP-B	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pTurboRFP-B	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -aam	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -aam	эта работа
<i>E. coli</i> XL1 pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -GFP-RFP	<i>E. coli</i> XL1, содержащий автономную плазмиду pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -GFP-RFP	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1	TrpR SmR <i>recA, thi, pro, hsdR</i> -M+RP4: 2-TcMu:KmTn7 λpir	Stratagene
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-P <sub>nh</sub> -AA-nhmG	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-P <sub>nh</sub> -AA-nhmG	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-UP-IS	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-UP-IS	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-1	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-1	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-1up	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-1up	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-6	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-6	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-6,5	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-6,5	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-7	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-7	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-8	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-8	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-P <sub>nh569</sub> -aam <sub>509</sub>	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-P <sub>nh569</sub> -aam <sub>509</sub>	эта работа

Продолжение Таблицы 2.1

Штамм	Описание	Источник
<i>E. coli</i> S17-1 pRY1-P <sub>nh190</sub> -aam <sub>509</sub>	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY1-P <sub>nh190</sub> -aam <sub>509</sub>	эта работа
<i>E. coli</i> S17-1 pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -GFP-RFP	<i>E. coli</i> S17-1, содержащий автономную плазмиду pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -GFP-RFP	эта работа
<i>R. qingshengii</i> TA37	природный изолят, содержащий ген <i>aam</i>	[133]
<i>R. qingshengii</i> TA37 pRY1-8	производный от <i>R. qingshengii</i> TA37 с интегрированной кассетой P <sub>nh569</sub> - <i>aam-cblA</i>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M8	природный изолят, содержащий оперон <i>nhmBAG</i>	[101]
<i>R. rhodochrous</i> M33	производный от <i>R. rhodochrous</i> M8 с полной делецией гена <i>nhmC</i> и частичной делецией гена <i>nhmD</i> , был получен мутагенезом	[137]
<i>R. rhodochrous</i> M50	производный от <i>R. rhodochrous</i> M8 с делецией кластера <i>nhmBAG</i> и регуляторного гена <i>cblA</i> , был получен мутагенезом	[137]
<i>R. rhodochrous</i> M33 aam I	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33, интегрант первого кросса, содержащий кассету P <sub>nh</sub> - <i>aam-nhmG</i> , в котором интеграция прошла по P <sub>nh</sub> -плечу	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 aam II	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33, интегрант первого кросса, содержащий кассету P <sub>nh</sub> - <i>aam-nhmG</i> , в котором интеграция прошла по <i>nhmG</i> -плечу	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 aam	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33, в котором гены нитрилгидратазы <i>nhmBA</i> были заменены на ген ациламидазы <i>aam</i>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-1	<i>R. rhodochrous</i> M50, содержащий автономную плазмиду pRY16-1	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-2	<i>R. rhodochrous</i> M50, содержащий автономную плазмиду pRY16-2	эта работа

Продолжение Таблицы 2.1

Штамм	Описание	Источник
<i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-3	<i>R. rhodochrous</i> M50, содержащий автономную плазмиду pRY16-3	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-4	<i>R. rhodochrous</i> M50, содержащий автономную плазмиду pRY16-4	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-5	<i>R. rhodochrous</i> M50, содержащий автономную плазмиду pRY16-5	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-9	<i>R. rhodochrous</i> M50, содержащий автономную плазмиду pRY16-9	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 P <sub>nh569</sub> -aam	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 aam с интегрированной плазмидой pRY1-P <sub>nh569</sub> -aam <sub>509</sub>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 P <sub>nh190</sub> -aam	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 aam с интегрированной плазмидой pRY1-P <sub>nh190</sub> -aam <sub>509</sub>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 del I	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 aam, интегрант первого кросса, содержащий кассету UP-IS, в котором интеграция прошла по UP-плечу	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 del	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 aam с делецией кластера генов <i>nhmBAG-cblA</i>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-1	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 del с интегрированной кассетой P <sub>nh569</sub> -aam- <i>nhmG-cblA</i>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-1up	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 del с интегрированной кассетой upP <sub>nh569</sub> -aam- <i>nhmG-cblA</i>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-6	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 del с интегрированной кассетой P <sub>nh569</sub> -aam- <i>nhmG</i>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-6,5	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 del с интегрированной кассетой P <sub>nh569</sub> -aam-STOP- <i>nhmG</i>	эта работа

Продолжение Таблицы 2.1

Штамм	Описание	Источник
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-7	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 del с интегрированной кассетой P <sub>nh569</sub> - <i>aam</i> - $\Delta$ <i>nhmG</i>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-8	производный от <i>R. rhodochrous</i> M33 del с интегрированной кассетой P <sub>nh569</sub> - <i>aam</i> - <i>cblA</i>	эта работа
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -GFP-RFP	<i>R. rhodochrous</i> M33 del, содержащий автономную плазмиду pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -GFP-RFP	эта работа

Для выделения хромосомной и плазмидной ДНК для амплификации целевых участков генома использовали природные изоляты *R. qingshengii* TA37 [133] и *R. rhodochrous* M8 [101], а также производные от этих штаммов.

Штаммы *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M50 (производные от *R. rhodochrous* M8, полученные ранее в лаборатории №22 НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов с помощью мутагенеза [137]) использовали для получения рекомбинантных штаммов.

Штамм *R. rhodochrous* M33 *aam* был получен с помощью замены генов нитрилгидратазы *nhmBA* в штамме *R. rhodochrous* M33 на ген ациламидазы *aam* из штамма *R. qingshengii* TA37.

Штамм *R. rhodochrous* M33 *aam* был использован для получения штамма *R. rhodochrous* M33 del, где была произведена делеция кластера, содержавшего ген ациламидазы *aam* и ген регулятора транскрипции *cblA*. На основе штамма *R. rhodochrous* M33 del был получен ряд рекомбинантных штаммов с интегрированными в состав хромосомы последовательностями ДНК.

Для работ по клонированию целевых генов и получению плазмидной ДНК использовали клетки *E. coli* XL1-Blue.

Для введения плазмидной ДНК в штаммы родококков использовали технику конъюгативного переноса с клетками-донорами штамма *E. coli* S17-1 [138].

### 2.1.2. Плазмидные векторы

Для конструирования рекомбинантных штаммов использовали ряд плазмидных векторов. Для клонирования целевых последовательностей ДНК использовали многокопийные векторы pUC19 и pUC57, способные к автономной репликации в *E. coli*. Для экспрессии генов в родококках использовали бирепликонные челночные векторы pRY16 и pRY3, способные к автономной репликации в *E. coli* и *Rhodococcus*. Для проведения интеграции фрагментов ДНК в хромосому родококков с помощью гомологичной рекомбинации использовали неспособный к автономной репликации в *Rhodococcus* вектор pRY1, способный к автономной репликации в

*E. coli* и содержащий фрагмент *oriT*, необходимый для конъюгативного переноса плазмиды. Все использованные в работе плазмиды и их описания приведены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Плазмидные векторы, использованные в работе

Вектор	Описание	Источник
pUC19	вектор для клонирования в <i>E. coli</i> , Ap <sup>R</sup>	Thermo Scientific™
pUC57	вектор для клонирования в <i>E. coli</i> , Ap <sup>R</sup>	Thermo Scientific™
pRY1	вектор на основе репликона pMB1 ( <i>E. coli</i> ) для интеграции в хромосому <i>Rhodococcus</i> с помощью гомологичной рекомбинации, содержал <i>oriT</i> плазмиды RK2 для мобилизации и конъюгативного переноса, Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	[139, 140]
pRY16	шаттл-вектор <i>E. coli</i> – <i>Rhodococcus</i> на основе репликонов pMB1 и pRC4 соответственно, Ap <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup>	[135]
pUC19-Pnh-AA	производный от pUC19, содержащий кассету P <sub>nh512-aam</sub> , Ap <sup>R</sup>	эта работа
pUC19-Pnh-AA-nhmG	производный от pUC19, содержащий кассету P <sub>nh512-aam-nhmG</sub> , Ap <sup>R</sup>	эта работа
pM17	источник двойного терминатора транскрипции из бактериофага <i>fd</i> (фрагмент 2Tfd)	Машко С.В. (АО АГРИ)
pUC57-2Tfd	производный от pUC57, содержащий двойной терминатор транскрипции из фага <i>fd</i> , Ap <sup>R</sup>	эта работа
pUC57-1	производный от pUC57, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh569-aam-nhmG-cblA</sub> , Ap <sup>R</sup>	эта работа
pUC57-2	производный от pUC57, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh408-aam-nhmG-cblA</sub> , Ap <sup>R</sup>	эта работа
pUC57-3	производный от pUC57, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh235-aam-nhmG-cblA</sub> , Ap <sup>R</sup>	эта работа
pUC57-4	производный от pUC57, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh157-aam-nhmG-cblA</sub> , Ap <sup>R</sup>	эта работа

Продолжение Таблицы 2.2

Вектор	Описание	Источник
pUC57-5	производный от pUC57, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh31</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> , Ap <sup>R</sup>	эта работа
pRY16-1	производный от pRY16, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh569</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> , Ap <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup>	эта работа
pRY16-2	производный от pRY16, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh408</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> , Ap <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup>	эта работа
pRY16-3	производный от pRY16, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh235</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> , Ap <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup>	эта работа
pRY16-4	производный от pRY16, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh157</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> , Ap <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup>	эта работа
pRY16-5	производный от pRY16, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh31</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> , Ap <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup>	эта работа
pRY16-9	производный от pRY16, содержащий кассету P <sub>nh31</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> , Ap <sup>R</sup> , Apr <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-P <sub>nh</sub> -AA-nhmG	производный от pRY1, содержащий кассету P <sub>nh512</sub> - <i>aam-nhmG</i> для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33, Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-UP-IS	производный от pRY1, содержащий кассету UP-IS для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 <i>aam</i> , Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-1	производный от pRY1, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh569</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 <i>del</i> , Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-1up	производный от pRY1, содержащий кассету 2Tfd-upP <sub>nh569</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i> для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 <i>del</i> , Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-6	производный от pRY1, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh569</sub> - <i>aam-nhmG</i> для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 <i>del</i> , Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа

Продолжение Таблицы 2.2

Вектор	Описание	Источник
pRY1-6,5	производный от pRY1, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh569</sub> -aam-STOP-nhmG для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 del, Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-7	производный от pRY1, содержащий кассету P <sub>nh569</sub> -aam-ΔnhmG для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 del, Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-8	производный от pRY1, содержащий кассету 2Tfd-P <sub>nh569</sub> -aam-cblA для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 del и <i>R. qingshengii</i> TA37, Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-P <sub>nh569</sub> -aam <sub>509</sub>	производный от pRY1, содержащий кассету P <sub>nh569</sub> -aam <sub>509</sub> для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 aam, Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pRY1-P <sub>nh190</sub> -aam <sub>509</sub>	производный от pRY1, содержащий кассету P <sub>nh190</sub> -aam <sub>509</sub> для интеграции в хромосому <i>R. rhodochrous</i> M33 aam, Ap <sup>R</sup> , Ts <sup>R</sup>	эта работа
pTurboGFP-B	вектор на основе репликона pMB1 ( <i>E. coli</i> ), содержащий ген <i>turboGFP</i> под контролем индуцибельного промотора T5/lacO, Ap <sup>R</sup>	ЗАО Евроген
pTurboRFP-B	вектор на основе репликона pMB1 ( <i>E. coli</i> ), содержащий ген <i>turboRFP</i> под контролем индуцибельного промотора T5/lacO, Ap <sup>R</sup>	ЗАО Евроген
pRY3	шаттл-вектор <i>E. coli</i> – <i>Rhodococcus</i> на основе репликонов pMB1 и pRC4 соответственно, содержит oriT плазмиды RK2 для мобилизации и конъюгативного переноса, Apr <sup>R</sup>	эта работа
pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -aam	производный от pRY3, содержащий кассету <i>cblA</i> -P <sub>cblA</sub> -P <sub>nh569</sub> -aam, Apr <sup>R</sup>	эта работа
pRY3-CblA-P <sub>nh</sub> -GFP-RFP	производный от pRY3, содержащий кассету <i>cblA</i> -P <sub>cblA</sub> -P <sub>nh569</sub> - GFP-RBS <sub>E.coli</sub> -RFP	эта работа



### 2.1.3. Доступность последовательностей ДНК, использованных в работе

Следующие последовательности ДНК доступны в базе NCBI GenBank:

1. Полный геном природного изолята *R. rhodochrous* M8 – GCA\_015654185;
2. Полный геном природного изолята *R. qingshengii* TA37 – JAHREK000000000.1.

Следующие последовательности ДНК доступны в репозитории данных Mendeley Data

1. Полный геном штамма *R. rhodochrous* M33 – «Sequences for metabolic engineering of *Rhodococcus* for biocatalysis» (URL: <https://data.mendeley.com/datasets/b9fz39cbn3/1>): Sequence3, Sequence4;
2. Полный геном штамма *R. rhodochrous* M50 – «Sequences for metabolic engineering of *Rhodococcus* for biocatalysis» (URL: <https://data.mendeley.com/datasets/b9fz39cbn3/1>): Sequence5, Sequence6;
3. Последовательность плазмидного вектора pRY1 – «Sequences for metabolic engineering of *Rhodococcus* for biocatalysis» (URL: <https://data.mendeley.com/datasets/b9fz39cbn3/1>): Sequence8;
4. Последовательность репликона pRC4, использованного в плазмидных векторах pRY16 и pRY3 – «Collection of sequences of *Rhodococcus* genetic parts» (URL: <https://data.mendeley.com/datasets/8zy6pr47mr/1>): Table S1.

### 2.1.4. Компоненты питательных сред для культивирования микроорганизмов

Для выращивания культур использовали жидкие питательные среды следующего состава:

1. Минеральная синтетическая среда MS: глюкоза, 5 г/л; мочевины, 6 г/л;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2,8 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,8 г/л;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 г/л;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 г/л (стандартные условия выращивания). В качестве источника азота также использовали  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 2 г/л, в качестве источника углерода –  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 4 г/л. Штаммы *R. qingshengii* выращивали в среде MS с добавкой дрожжевого экстракта, 1 г/л.

Для изучения влияния присутствия в среде двухвалентных ионов тяжелых металлов использовали добавки следующих солей:  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaAsO}_2$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , при этом расчет добавки производили, исходя из необходимой финальной концентрации иона металла в среде (от 0,42 мкМ до 504 мкМ).

2. Полноценная среда LB: дрожжевой экстракт, 5 г/л; триптон, 10 г/л; NaCl, 5 г/л. В качестве индуктора для штаммов *E. coli*, содержащих плазмиды серии pTurbo-B, использовали ИПТГ, 100 мг/л.

3. Полноценная среда ВН: сердечно-мозговая вытяжка, 37 г/л.

Для выращивания штаммов на твердой среде к жидкой среде LB добавляли агар бактериологический, 20 г/л.

Антибиотики были добавлены в следующих концентрациях: тиострептон – 25 мкг/мл, налидиксовая кислота – 10 мкг/мл, ампициллин – 100 мкг/мл, апрамицин – 100 мкг/мл.

#### 2.1.5. Реактивы, использованные в работе

Для работы с ДНК использовали следующие наборы: набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli*, набор GeneJET PCR Purification Kit для очистки ПЦР смесей для последующего секвенирования фрагментов ДНК, набор GeneJET Gel Extraction Kit для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля (Thermo Fisher Scientific Inc, США). Для выделения суммарной РНК из клеток *Rhodococcus* использовали набор miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Нидерланды), для проведения синтеза кДНК с мРНК матрицы использовали набор MMLV RT kit (ЗАО Евrogen, Россия), для проведения количественной ПЦР использовали готовую смесь qPCRmix-HS SYBR + LowROX PK156 (ЗАО Евrogen, Россия), для сборки плазмид по методу Гибсона использовали набор Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs, США).

Для амплификации фрагментов ДНК использовали полимеразу DreamTaq и высокоточную термостабильную полимеразу Phusion (Thermo Fisher Scientific Inc, США). ПЦР проводили с использованием соответствующих буферов в условиях, требуемых производителем ферментов.

Для рестрикции ДНК использовали ферменты рестрикции, в том числе ускоренного действия FastDigest, и соответствующие им буферы (Thermo Fisher Scientific Inc, США). Для очистки РНК от примесей ДНК использовали дезоксирибонуклеазу DNAase I и предоставленный изготовителем буфер для данного фермента (Thermo Fisher Scientific Inc, США).

Для проведения лигирования использовали T4 ДНК лигазу и необходимые для работы фермента компоненты реакционной смеси (Thermo Fisher Scientific Inc, США).

Для приготовления буферных растворов, добавок в питательные среды, биохимических методов работы с ДНК и белками, проведения ферментативных реакций использовали реактивы марок хч, чда, осч, производства Лабтех, АО РЕАХИМ, ХИММЕД, ЗАО Евrogen, СИНТЕЗ, Минмедпром, Мосхимфармпрепараты им. Семашко (Россия), Киевмедпрепарат (Украина), Ferak Berlin GmbH, SERVA Electrophoresis GmbH, Carl Roth GmbH + Co. KG, Merck KGaA (Германия), Difco, Sigma-Aldrich, Bio-Rad Laboratories Inc (США), Reanal (Венгрия), Panreac (Испания), Chemapol (Чехия).

Праймеры для ПЦР были синтезированы в ЦКП НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика с использованием автоматического синтезатора ДНК/РНК ASM-800 (БИОССЕТ, Россия). Последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Праймеры, использованные в работе

Название	Использование	Последовательность 5' – 3', сайты рестрикции подчеркнуты
AA-SacI-3	ПЦР амплификация гена <i>aam</i> , введение сайта рестрикции <i>SacI</i>	GGGG <u>GAGCTCG</u> ATTTCAGACGTCAT CACACCAATCTAGCC
ArsR-ass-2	ПЦР амплификация гена <i>cbIA</i> , введение последовательности для ПЦР объединения с геном <i>aam</i>	GCTCGACTCGATGATCGGTGGAG CGCATGGAATCGATGGC
BamHI-M8-3	ПЦР амплификация P <sub>nh</sub> -плеча для гомологичной рекомбинации, введение сайта рестрикции <i>BamHI</i>	GGGGGATCCCCGGAGTCTTCATC CTGTTTTGGGATGCG
F1-Del	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh569</sub>	TTGGACGACCACGGTTGCTACGA GTGTGCG
F2-Del	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh408</sub>	TCTGCAGCTCGAACATCGAAGGG TGGGAGC
F3-Del	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh235</sub>	GCGCCCGAACGCAGGGATGGTAT CCATGCG
F4-Del	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh157</sub>	CACTGTGACGCCGTTCAACGATT GTTGTGC
F5-Del	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh31</sub>	TGAGCCCAGCTCCGATGAAAGGA ATGAGGC
F6-Del	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh569</sub> , введение сайта рестрикции <i>MluI</i>	CAC <u>ACGCGT</u> TTGGACGACCACGG TTGCTAC
F7-Del	ПЦР амплификация фрагмента upP <sub>nh569</sub> , введение сайта рестрикции <i>MluI</i>	CAC <u>ACGCGT</u> CTACGCATCCTCGG CCGGAAG
F-CbIA-HindIII	ПЦР амплификация гена <i>cbIA</i> , введение сайта рестрикции <i>HindIII</i>	GAGA <u>AAGCTT</u> TTCATGGCAAGTGGG ACTCCGGTGCGCCGAG
For-2Tfd	ПЦР амплификация фрагмента 2Tfd, введение сайта рестрикции <i>BamHI</i>	CGGGGATCCTCTAGAGGTCGA

Продолжение Таблицы 2.3

Название	Использование	Последовательность 5' – 3', сайты рестрикции подчеркнуты
ForE	ПЦР амплификация UP-плеча для гомологичной рекомбинации, введение сайта рестрикции <i>BamHI</i>	ATGGGATCCATCGTTGCGGACGA TGATGTC
ForInt	ПЦР амплификация Int-плеча для гомологичной рекомбинации, введение сайта рестрикции <i>KpnI</i>	CACGGTACCTCGCTGTACCGGCG GCCTCA
ForIS	ПЦР амплификация IS-плеча для гомологичной рекомбинации	CGGTAGATAGGCCCTTGGCG
ForPng	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh569</sub> , введение сайта рестрикции <i>BamHI</i>	ATCGGATCCTTGGACGACCACGG TTGCTACG
For-Pngaam	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh25</sub> , введение последовательности для ПЦР объединения с фрагментом P <sub>nh165</sub>	AGGGCGGCAGGCGAAGTCTGCA GCTCCGATGAAAGGAATG
For-pRY1- EcoRI	ПЦР амплификация для конструирования плазмид pRY1-Int и pRY1-Int-2Tfd, введение сайтов рестрикции <i>MluI</i> , <i>NheI</i> и <i>EcoRI</i>	CACACGCGTGCTAGCGAATTCAC TGGCCGT
For-ST	ПЦР амплификация гена <i>nhmG</i> с введенным участком STOP	GATCGTTAGTGAGAAGACACACT CACTGATCG
Gib-GFP-SD- rev	ПЦР амплификация гена <i>turboGFP</i> , введение последовательности для сборки методом Гибсона	TAATTTCTCCTCTTTAATCAATTC TGTGTGCAAGCTCAGCTAATTA GCTTCATTCTTCACCGGC
Gib-Pnh- GFP30-rev	ПЦР амплификация фрагмента P <sub>nh569</sub> , введение последовательности для сборки методом Гибсона	GGCGGGCAGGCCGCTCTCGTCGC TCTCCATGGCCTCATTCCTTTCAT CGGAGCTGGG
Gib-Pnh-GFP- for	ПЦР амплификация гена <i>turboGFP</i> , введение последовательности для сборки методом Гибсона	ATGGAGAGCGACGAGAGCGGCC TGC

Продолжение Таблицы 2.3

Название	Использование	Последовательность 5' – 3', сайты рестрикции подчеркнуты
Gib-SD-RFP-for	ПЦР амплификация гена <i>turboRFP</i> , введение последовательности для сборки методом Гибсона	CACACAGAATTGATTAAGAGGA GAAATTAATATGAGAGGATCGGG ATCCATGAGCG
Gib-T0-V-for	ПЦР амплификация гена AAC(3)-IV ( <i>Apr<sup>R</sup></i> ), введение последовательности для сборки методом Гибсона	GAATTCGAATGATTAATTTAGCT AGCGTATTTGCAGTACCAGCCTA CGGC
Gib-T0-V-rev	ПЦР амплификация гена <i>turboRFP</i> , введение последовательности для сборки методом Гибсона	ATACGCTAGCTAAATTAATCATT CGAATTCATTCTCACCAATAAAA AACGCCCCGGCGGCA
gyrB-M8-F	ПЦР амплификация гена <i>gyrB</i> для нормирования результатов RT-qPCR анализа	CGAGGCACCGAAGAAGGC
gyrB-M8-R	ПЦР амплификация гена <i>gyrB</i> для нормирования результатов RT-qPCR анализа	CGACGACCGAGTTGTGGAT
M33-NcoI	ПЦР амплификация P <sub>nh</sub> -плеча для гомологичной рекомбинации, введение сайта рестрикции <i>NcoI</i>	GATCCATGGCCTCATTCCTTTCAT CGGAGC
NcoI-AA	ПЦР амплификация гена <i>aam</i> , введение сайта рестрикции <i>NcoI</i>	GTCCCATGGCCGAACAGAATCTG C
nhmG-EcoRI-3	ПЦР амплификация <i>nhmG</i> -плеча для гомологичной рекомбинации, введение сайта рестрикции <i>EcoRI</i>	GGGGAATTCAGTACCCACCGAGC CGAATTAGGAACCACCG
nhmG-F	ПЦР амплификация фрагмента гена <i>nhmG</i> для проведения RT-qPCR анализа	ATCGGTGTCAGTAATGCG
nhmG-R	ПЦР амплификация фрагмента гена <i>nhmG</i> для проведения RT-qPCR анализа	GTGCGGCGGTCCCAGT

Продолжение Таблицы 2.3

Название	Использование	Последовательность 5' – 3', сайты рестрикции подчеркнуты
R1-Del	ПЦР амплификация гена <i>cblA</i> , введение сайта рестрикции <i>EcoRI</i>	GTGGAATTCTTGGGTGGGGCCCG ACTACGGAATGGCGC
R2-Del	ПЦР амплификация гена <i>nhmG</i> , введение сайта рестрикции <i>EcoRI</i>	GTGGAATTCCTTGCCATGAACGC CTACAGCGTCACCGCG
R4-Del	ПЦР амплификация гена <i>aam</i>	CACCGATCATCGAGTCGAGC
R6-Del	ПЦР амплификация участка $\Delta nhmG$ , введение сайта рестрикции <i>EcoRI</i>	GTGGAATTCGCCATGAACGCCTA CAGCGTC
R-CblA-Png	ПЦР амплификация участка $P_{cblA}$ , введение последовательности для ПЦР объединения с фрагментом $P_{nh569}$	TAGCAACCGTGGTCGTCCAAGTT CTCTCGTTCTCGGC
Rev	ПЦР амплификация фрагмента <i>aam</i> <sub>509</sub> , введение сайта рестрикции <i>EcoRI</i>	ATCGAATTCGAGGCCTGCAGCC ACGGCAGC
Rev-2Tfd	ПЦР амплификация фрагмента 2Tfd	CGCTACGTGACTGGGTC
Rev-aamPng	ПЦР амплификация фрагмента $P_{nh165}$ , введение последовательности для ПЦР объединения с фрагментом $P_{nh25}$	CATTCCTTTCATCGGAGCTGCAG ACTTCGCCTGCCGCCCT
RevE	ПЦР амплификация UP-плеча для гомологичной рекомбинации, введение последовательности для ПЦР объединения с IS-плечом	CGCCAAGGGCCTATCTACCGCCG CCACGACTGTTGGCTGT
RevInt	ПЦР амплификация Int-плеча для гомологичной рекомбинации, введение последовательности для ПЦР объединения с фрагментом 2Tfd	CGACCTCTAGAGGATCCCCGTGC CTGTTCCCTGCGTGCTGC
RevIS	ПЦР амплификация IS-плеча для гомологичной рекомбинации, введение сайта рестрикции <i>EcoRI</i>	GTGGAATTCTTGGGTGGGGCCCG ACT

Продолжение Таблицы 2.3

Название	Использование	Последовательность 5' – 3', сайты рестрикции подчеркнуты
Rev-pRY1-2Tfd	ПЦР амплификация для конструирования плазмиды pRY1-Int-2Tfd, введение сайтов рестрикции <i>MluI</i> и <i>BcuI</i>	GACAC <u>CGCGTACTAGT</u> CGAATGCA TCTAGAT
Rev-pRY1-Int	ПЦР амплификация для конструирования плазмиды pRY1-Int, введение сайтов рестрикции <i>MluI</i> и <i>BcuI</i>	GACAC <u>CGCGTACTAGT</u> TGCCTGTT CCTGCGT
Rev-ST	ПЦР амплификация гена <i>aam</i> с введенным участком STOP	GTGTCTTCTCACTAACGATCACTT CCTGGGGTGTG
SacI-nhmG-3	ПЦР амплификация <i>nhmG</i> -плеча для гомологичной рекомбинации, введение сайта рестрикции <i>SacI</i>	GGGG <u>GAGCTCGACT</u> CGATGATCGG TGTCAGTAATGCG

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Биоинформатические методы

Для предсказания функций генов использовали аннотации NCBI GenBank (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [141], базу данных Gene Ontology (URL: <https://geneontology.org>) [142, 143] и поиск функциональных доменов с помощью ресурса InterProScan (URL: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) [144].

Поиск наиболее близких гомологичных нуклеотидных последовательностей исследуемых генов проводили в базе данных NCBI GenBank с помощью алгоритма BLASTN (URL: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_SPEC=GeoBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch)) [145].

Поиск отдаленных гомологов изучаемых белков проводили в базах данных NCBI GenBank [141] с помощью алгоритма SmartBLAST NCBI (URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast>), а также в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot (URL: <https://www.uniprot.org/>) [146] с помощью её алгоритмов поиска.

Построение филогенетических деревьев белков проводили с помощью ресурса COBALT NCBI (URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)) [147] со стандартными настройками, с помощью метода минимальной эволюции и эволюционной дистанции Гришина.

Для предсказания сайтов связывания РНК-полимеразы с регуляторной областью ДНК использовали следующие ресурсы поиска бактериальных промоторов: BPROM (URL: <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) [81], NNPP (с настройками для прокариотических организмов) (URL: [https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) [82], PromoterHunter (со стандартными настройками) (URL: [http://www.phisite.org/main/index.php?nav=tools&nav\\_sel=hunter](http://www.phisite.org/main/index.php?nav=tools&nav_sel=hunter)) [83], SAPPHIRE.CNN (URL: <https://sapphire.biw.kuleuven.be>) [84].

Для предсказания сайтов связывания транскрипционного регулятора CblA с регуляторной областью ДНК проводили поиск несовершенных инвертированных повторов в нуклеотидной последовательности регуляторной области, выполненный с помощью ресурса EMBOS palindrom (URL: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/palindrome>). Поиск проводили со следующими параметрами: длина плеча палиндрома не более 14 нуклеотидов, расстояние между плечами не более 4 нуклеотидов, количество несопадающих нуклеотидов не более 5.

Поиск известных рибопереключателей в 5'-нетранслируемой области мРНК выполняли с помощью ресурсов Riboswitch Scanner (URL: <http://service.iiserkol.ac.in/~riboscan/application.html>) [148, 149] и Infernal (URL: <http://eddylab.org/infernal>) [150].

Предсказание регулярных вторичных структур в 5'-нетранслируемой области мРНК проводили с помощью ресурса RNAstructure (URL: <https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>) [151].

Для визуализации последовательностей ДНК и схем клонирования генетических кассет использовали программу SnapGene® (URL: <http://www.snapgene.com>).

### 2.2.2. Культивирование микроорганизмов

Культивирование микроорганизмов проводилось в жидких средах LB и MS во встряхивателе-инкубаторе Multitron (Infors HT, Швейцария) при постоянном перемешивании (300 об/мин) при 30° С и 37° С в случае культур *Rhodococcus* и *E. coli* соответственно. Добавки компонентов питательной среды, индукторов и солей тяжелых металлов проводили во время засева культур. Культивирование штаммов *Rhodococcus* осуществляли в течение 2 – 7 суток в зависимости от штамма и питательной среды.

### 2.2.3. Молекулярно-биологические методы

#### 2.2.3.1. Амплификация и клонирование генов

В качестве матриц для амплификации целевых участков ДНК были использованы хромосомные ДНК из *R. qingshengii* TA37, *R. rhodochrous* M8, и производных от них рекомбинантных штаммов. Выделение хромосомной ДНК проводили согласно лабораторной методике [152] следующим методом: биомассу клеток родококков, полученную из 5 мл культуры, имеющей оптическую плотность при 600 нм равную 1 – 2 единицы, инкубировали в



растворе ацетата аммония 7,5 М в течение 10 минут при комнатной температуре; после этого клетки осаждали и ресуспендировали в 100 мкл воды (SQ). Для разрушения клеточной стенки и ингибирования нуклеаз добавляли 1100 мкл раствора ЭДТА 10 мМ и 1%-го SDS (pH 8,0) и инкубировали 5 минут при комнатной температуре, затем выдерживали суспензию 10 минут при 65° С; после охлаждения добавляли 400 мкл раствора ацетата аммония 7,5 М и мягко перемешивали смесь. Депротеинизацию клеточного лизата проводили с помощью добавки 200 мкл хлороформ-изоамиловой смеси (24 : 1) при интенсивном перемешивании; затем денатурированные белки и фрагменты клеточной стенки отделяли центрифугированием в течение 10 минут при 15° С. Верхнюю фракцию, содержащую хромосомную ДНК, переносили в чистую пробирку и проводили осаждение ДНК с помощью 1080 мкл изопропанола; осадок ДНК дважды промывали 70%-ым этанолом и растворяли в воде (SQ).

Для амплификации целевых участков ДНК использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакцию проводили в условиях согласно инструкциям от производителей полимераз в амплификаторах Mastercycler Gradient и Mastercycler Nexus Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Германия).

Клонирование фрагментов ДНК (т.е., ведение их в состав плазмид) производили лигированием с помощью Т4 ДНК лигазы по сайтам рестрикции. Сборку плазмид по методу Гибсона проводили согласно протоколу производителя набора Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs, США), смесь инкубировали при 50° С в течение 1 часа в амплификаторах Mastercycler Gradient и Mastercycler Nexus Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Германия). Сконструированные плазмиды вводили в электрокомпетентные клетки *E. coli* XL1-Blue методом электропорации, используя элетропоратор Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories Inc, США) со стандартным протоколом для клеток *E. coli*. После скрининга рекомбинантных клеток последовательность сконструированных плазмид проверяли с помощью секвенирования.

Стандартные процедуры с ДНК, такие как переосаждение электрофорез в агарозном геле, проводили согласно принятым протоколам [153].

#### 2.2.3.2. Секвенирование ДНК

Секвенирование фрагментов ДНК было выполнено в ЦКП НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика с использованием анализатора-секвенатора ABI PRISM 3500 (Termo Fisher Scientific Inc, США).

#### 2.2.3.3. Ведение плазмидной ДНК в клетки *Rhodococcus* с помощью конъюгативного переноса

Для доставки рекомбинантной ДНК в клетки штаммов родококков использовали метод конъюгативного переноса плазмид. Для этого плазмидные векторы предварительно вводили в штамм *E. coli* S17-1 методом химической кальциевой трансформации [154], после чего

полученные штаммы использовали в качестве донора для конъюгативного скрещивания. Конъюгативный перенос плазмид осуществляли следующим методом: культуры клеток донора *E. coli* S17-1 и реципиента *Rhodococcus*, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, ресуспендировали в основе MS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 2,8 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,8 г/л) в соотношении 2 : 1 и инкубировали 1 час при комнатной температуре. После этого суспензию клеток распределяли по чашкам Петри с агаризованной средой MS и инкубировали 16 часов при 30° С. Через 16 часов чашки заливали раствором антибиотиков, содержащим налидиксовую кислоту для подавления роста клеток донора и антибиотик для селективного отбора получивших плазмидный вектор клеток реципиента, после чего инкубировали от 4 до 7 суток при 30° С.

#### 2.2.3.4. Анализ уровня транскрипции генов с помощью количественной ПЦР (RT-qPCR)

Клетки штаммов *Rhodococcus* разрушали, растирая биомассу в ступке с кварцевым песком и жидким азотом. Суммарную РНК выделяли по методике, предоставленной изготовителем набора miRNeasy Mini Kit, остаточную ДНК удаляли с помощью дезоксирибонуклеазы. Полученную РНК использовали для синтеза первой цепи кДНК с помощью метода обратной транскрипции, которую проводили согласно методике набора MMLV RT kit. Количественный анализ транскриптов осуществляли с помощью метода RT-qPCR с использованием готовой смеси qPCRmix-HS SYBR + LowRox. Анализ проводили в амплификаторе Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc, США). Состав типичной ПЦР смеси (20 мкл): 15 мкл воды (SQ), 2 мкл смеси qPCRmix-HS SYBR + LowRox, 1 мкл матрицы кДНК (не более 200 нг), 1 мкл каждого праймера. Режим циклов амплификации: 95° С 5 мин, 40 циклов 95° С 30 сек, 60° С 20 сек и 72° С 30 сек. Количество целевых транскриптов нормализовали на количество транскрипта гена домашнего хозяйства гиразы *gyrB*, для амплификации которого использовали праймеры *gyrB*-M8-F, *gyrB*-M8-R (Таблица 2.3). Определение относительного количества целевой мРНК проводили с помощью амплификации фрагмента гена *nhmG* с праймерами *nhmG*-F и *nhmG*-R. Относительное количество специфической мРНК гена *nhmG* выражали в условных единицах, проводя его расчет с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta CT}$  со стандартными алгоритмами вычисления программного обеспечения 7500 Fast Software 2.3 (Applied Biosystems).

#### 2.2.4. Спектофотометрические измерения

Определение концентрации ДНК в растворах проводили с использованием спектрофотометра NanaPhotometer NP80 (Implen, Германия) согласно стандартному протоколу для измерения концентраций нуклеиновых кислот при длине волны 260 нм.

Определение оптической плотности клеточных суспензий штаммов *Rhodococcus* проводили в 96-луночных микропланшетах с плоским дном (Deltalab, Испания) в планшетных спектрофотометрах Safire II (Tecan, Швейцария) и Multiscan (Thermo LabSystems Inc, США) при

длине волны 492 нм. Объем пробы 300 мкл соответствовал длине оптического пути 0,8 см, 200 мкл – 0,5 см.

Определение оптической плотности клеточных суспензий штаммов *E. coli* проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 см в спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) при длине волны 600 нм.

#### 2.2.5. Биохимические методы

##### 2.2.5.1. Определение концентрации белка

Для определения концентрации белка в клетках штаммов *Rhodococcus* предварительно проводили гомогенизацию биомассы с помощью ультразвука в дезинтеграторе Soniprep 150 (MSE, Великобритания). Для стабилизации субъединиц белка нитрилгидратазы в суспензию клеток перед гомогенизацией добавляли раствор ацетамида до концентрации 5 г/л. Концентрацию белка в полученных растворах определяли по методу Бредфорд [155], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта. Спектрофотометрические измерения проводили в планшетном спектрофотометре Safire II (Tecan, Швейцария) при длине волны 595 нм.

##### 2.2.5.2. Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили в денатурирующих условиях [156], используя концентрирующий гель с концентрацией акриламида 5 % и разделяющий гель с концентрацией акриламида 12 %. Для электрофореза использовали вертикальную камеру Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad Laboratories Inc, США). Стандартная нагрузка белка в пробе составляла 10 мкг.

##### 2.2.5.3. Определение ациламидазной активности клеток

Ациламидазную активность клеток, содержавших фермент ациламидазу, определяли по образованию окрашенного продукта гидролиза 4'-нитроацетанилида (НАА) – п-нитроанилина (п-НА). Для этого 150 мкл суспензии клеток, предварительно прогретые при 37° С, смешивали со 150 мкл 1 мМ раствора НАА и инкубировали 20 минут при 37° С. В качестве буфера использовали 0,01 М Трис-НСl, рН 8,0. Реакцию гидролиза останавливали охлаждением при 0° С во время осаждения клеток центрифугированием в центрифуге Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Германия). Оптическую плотность 200 мкл супернатанта измеряли в 96-луночных микропланшетах с плоским дном (Deltalab, Испания) в планшетном спектрофотометре Multiscan (Thermo LabSystems Inc, США) при длине волны 405 нм. За 1 единицу удельной ациламидазной активности клеток принимали такое количество фермента, которое требовалось для получения 1 мкМ п-НА за 1 минуту в расчете на 1 мг с.в.кл. при оптимальных условиях. Для расчета удельной ациламидазной активности клеток использовали следующую формулу:

$$A_{\text{aam}} = \frac{\text{ОП}_{405} \cdot 10^3}{\text{ОП}_{492} \cdot k \cdot \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot t}, \quad (2.1)$$

где ОП<sub>405</sub> – оптическая плотность 200 мкл супернатанта, измеренная при длине волны 405 нм; ОП<sub>492</sub> – оптическая плотность 300 мкл реакционной смеси, измеренная при длине волны 492 нм; k – эмпирический коэффициент для пересчета оптической плотности суспензии клеток *Rhodococcus*, измеренной при длине волны 492 нм в микропланшетах в спектрофотометре Multiscan (Thermo LabSystems Inc, США) при длине оптического пути 0,8 см в концентрацию клеток в смеси (0,51 мг с.в.кл/мл);

$\varepsilon_{\lambda}$  – коэффициент молярной экстинкции п-НА при длине волны 405 нм (8900 л/(моль/см));

l – длина оптического пути при измерении оптической плотности супернатанта (0,5 см);

t – время реакции (20 мин).

Далее в тексте удельная ациламидазная активность клеток обозначена как «ациламидазная активность клеток».

#### 2.2.5.4. Расчет ациламидазной активности культур

Рассчитываемый параметр «ациламидазная активность культуры» обозначает суммарную активность биомассы, получаемой в определенных условиях выращивания, с учетом плотности жидкой культуры. Для расчета ациламидазной активности культуры (величина выражена в условных единицах) использовали следующую формулу:

$$B = A_{\text{aam}} \cdot \text{ОП}_{492}, \quad (2.2)$$

где  $A_{\text{aam}}$  – удельная ациламидазная активность клеток, рассчитанная по формуле (2.1);

ОП<sub>492</sub> – оптическая плотность 300 мкл реакционной смеси, измеренная при длине волны 492 нм в микропланшетах в спектрофотометре Multiscan (Thermo LabSystems Inc, США) при длине оптического пути 0,8 см.

#### 2.2.5.5. Определение нитрилгидратазной активности клеток

Нитрилгидратазную активность клеток, содержавших фермент нитрилгидратазу, определяли по образованию продукта гидролиза акрилонитрила (АН) – акриламида (АА). Суспензию клеток объемом 100 мкл смешивали со 100 мкл 2 %-го раствора акрилонитрила и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. В качестве буфера использовали 0,01 М фосфатный буфер, рН 7,6. Реакцию гидролиза останавливали добавлением 100 мкл 1,7 %-ой HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны 235 нм в 96-луночных микропланшетах с плоским дном UV-STAR (Greiner Bio-One, Австрия) в планшетном спектрофотометре Safire II (Tecan, Швейцария), в объеме смеси равном 200 мкл. За 1 единицу нитрилгидратазной активности принимали такое количество фермента, которое требовалось для получения 1 мкМ АА за 1 минуту в расчете на 1 мг с.в.кл. при оптимальных условиях. Для расчета нитрилгидратазной активности использовали следующую формулу:

$$A_{\text{NH}} = \frac{\text{ОП}_{235} \cdot 10^3}{\text{ОП}_{492} \cdot k \cdot \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot t}, \quad (2.3)$$

где ОП<sub>235</sub> – оптическая плотность 200 мкл реакционной смеси, измеренная при длине волны 235 нм;

ОП<sub>492</sub> – оптическая плотность 300 мкл реакционной смеси, измеренная при длине волны 492 нм;  
 k – эмпирический коэффициент для пересчета оптической плотности суспензии клеток *Rhodococcus*, измеренной при длине волны 492 нм в микропланшетах в спектрофотометре Multiscan (Thermo LabSystems Inc, США) при длине оптического пути 0,8 см в концентрацию клеток в смеси (0,51 мг с.в.кл/мл);

$\varepsilon_{\lambda}$  – коэффициент молярной экстинкции АА при длине волны 235 нм (1100 л/(моль/см));

l – длина оптического пути при измерении оптической плотности реакционной смеси (0,5 см);

t – время реакции (20 мин).

#### 2.2.5.7. Определение интенсивности флуоресценции клеток

Суспензию клеток промывали от культуральной жидкости 0,01 М фосфатным буфером, рН 7,6 и разводили в нем же до оптической плотности 0,1 – 0,4 единицы. Измерения оптической плотности проводили в 96-луночных микропланшетах с плоским дном (Deltalab, Испания) в планшетном спектрофотометре Safire II (Tecan, Швейцария) при длине волны 492 нм. Далее аликвоты промытых клеточных суспензий объемом по 100 мкл переносили в черные 384-луночные микропланшеты с плоским дном (Greiner Bio-One, Австрия). Далее проводили измерение оптической плотности аликвот при длине волны 492 нм и флуоресценции аликвот при параметрах измерения согласно Таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Параметры для измерения флуоресценции клеток

Параметр	Область измерения TurboGFP	Область измерения TurboRFP
длина волны возбуждения, нм	482	553
ширина спектральной щели возбуждения, нм	10	10
длина волны излучения, нм	518	586
ширина спектральной щели излучения, нм	17	20

Для расчета интенсивности флуоресценции (ИФ) клеток, выраженной в условных единицах, использовали следующую формулу:

$$\text{ИФ} = \frac{\Phi}{\text{ОП}_{492}}, \quad (2.4)$$

где  $\Phi$  – флуоресценция 100 мкл аликвоты клеток, измеренная при соответствующих для исследуемого флуоресцентного белка параметрах;

$\text{ОП}_{492}$  – оптическая плотность 100 мкл аликвоты клеток, измеренная при длине волны 492 нм.

### 2.2.6. Биокаталитический синтез *N*-замещённых акриламидов

#### 2.2.6.1. Биокаталитический синтез ИПАА

Синтез ИПАА проводили с использованием в качестве биокатализаторов клеток штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7. Суспензию клеток дважды промывали от культуральной жидкости в дистиллированной воде и ресуспендировали в ней же. Синтез ИПАА осуществляли в реакционной смеси в объеме 500 мкл со следующим составом: бактериальные клетки, 10 г с.в.кл./л; акриламид, 60 г/л; *N*-изопропиламин, 30 г/л (рН 10,0). Реакцию синтеза проводили при 37° С и рН 10,0 в течение 7 часов при постоянном перемешивании (550 об/мин). После этого 250 мкл смеси центрифугировали при 0° С в течение 1 мин, отбирали 200 мкл супернатанта и смешивали с 9,2 мкл концентрированной HCl для остановки реакции. Количество образовавшегося ИПАА определяли с помощью газовой хроматографии.

#### 2.2.6.2. Биокаталитический синтез ДМАПАА

Синтез ДМАПАА проводили с использованием в качестве биокатализаторов клеток штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7. Суспензию клеток дважды промывали от культуральной жидкости в дистиллированной воде и ресуспендировали в ней же. Синтез ДМАПАА осуществляли в реакционной смеси в объеме 500 мкл со следующим составом: бактериальные клетки, 10 г с.в.кл./л; акриламид, 60 г/л; *N*-диметиламинопропиламин, 25 г/л (рН 10,0). Реакцию синтеза проводили при 37° С и рН 10,0 в течение 24 часов при постоянном перемешивании (550 об/мин). После этого 250 мкл смеси центрифугировали при 0° С в течение 1 мин, отбирали 200 мкл супернатанта и смешивали с 9,2 мкл концентрированной HCl для остановки реакции. Количество образовавшегося ДМАПАА определяли с помощью газовой хроматографии.

#### 2.2.7. Анализ состава реакционной смеси методом газовой хроматографии

Анализ реакционной смеси осуществляли на газовом хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония) с пламенно-ионизационным детектором. Анализируемые вещества (ИПАА, ДМАПАА) в смеси, получаемой после синтеза акриловых мономеров, разделяли с помощью кварцевой колонки длиной 32 м, наполненной сорбентом FFAP, при постоянной температуре 180° С. В качестве газа носителя использовали гелий. Для сравнения времён выхода и расчёта концентраций веществ использовали хроматографические чистые стандарты определяемых веществ, во все образцы добавляли ацетамид в качестве внутреннего стандарта. Обсчёт данных проводили с помощью программы ChromProcessor.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

##### *3.1.1. Биоинформатический анализ окружения оперона нитрилгидратазы *nhmBAG* в геноме штамма *Rhodococcus rhodochrous* M8*

Гены нитрилгидратазы у родококков вероятно не являются генами домашнего хозяйства или центрального метаболизма, а относятся к вторичному (периферическому) метаболизму. Экспрессия таких генов часто подвержена воздействию не только общеклеточных регуляторов, но и специфических регуляторов, кластеризованных рядом с ними. Поскольку регуляция транскрипции ионами кобальта также с большой вероятностью относится к вторичному метаболизму, было сделано предположение о том, что гены осуществляющих её регуляторов являются специфичными для функционирования оперона генов нитрилгидратазы, и, следовательно, локализованы в том же регионе ДНК. Предполагаемые регуляторные участки ДНК и РНК, принимающие участие в кобальт-зависимом механизме регуляции транскрипции (промотор и/или рибопереключатели), в свою очередь также должны быть расположены непосредственно около регулируемых ими генов (Раздел 1.4).

Для поиска предполагаемых элементов кобальт-зависимой регуляции транскрипции оперона нитрилгидратазы *nhmBAG* использовали аннотированный с помощью алгоритмов NCBI геном штамма *R. rhodochrous* M8, GenBank NZ\_CP064066. Анализ проводили в прилегающих с каждой стороны к оперону *nhmBAG* областях длиной около 16 и 18 тысяч п.н. Схема окружения оперона изображена на Рисунке 3.1, где показано расположение аннотированных открытых рамок считывания (ORF). В Таблице 3.1, которая служит также подробным описанием Рисунка 3.1, приведены описания предполагаемых функций кодируемых ими белков. Функции белков были взяты непосредственно из аннотаций генома, базы данных Gene Ontology [142, 143], а также дополнительно подтверждены с помощью ресурса InterProScan [144], позволяющего анализировать белки по их функциональным доменам.

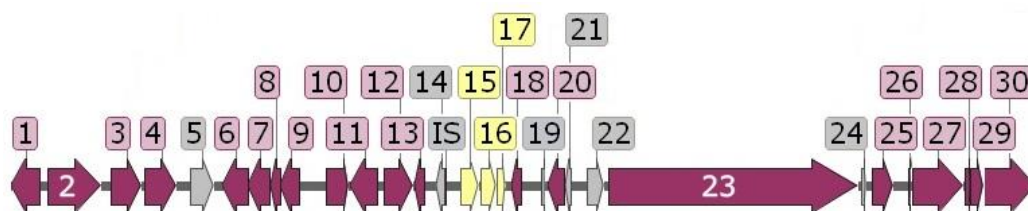


Рисунок 3.1 – Схема окружения оперона *nhmBAG* в геноме штамма *R. rhodochrous* M8.

Красным цветом обозначены аннотированные ORF с предсказанными функциями (расшифровка цифровых обозначений приведена в Таблице 3.1), серым – фрагменты ORF и ORF с неизвестными функциями, желтым – оперон *nhmBAG*

Таблица 3.1 – ORF в окружении оперона *nhmBAG* в геноме штамма *R. rhodochrous* M8

Номер ORF на Рисунке 3.1	Локус в геноме NZ_CP064066	Предполагаемый кодируемый белок
1	ISO16_RS27920	алифатическая амидаза
2	ISO16_RS27925	ацетат-КоА лигаза
3	ISO16_RS27930	АТФ-связывающая субъединица АТФ-зависимой Clp протеазы
4	ISO16_RS27935	НАД(Ф)/ФАД-зависимая оксидоредуктаза
5	ISO16_RS27940	гипотетический белок с неизвестной функцией
6	ISO16_RS27945	АТФ-связывающий белок CbiO, входящий в состав комплекса CbiMNOQ, транспортирующего ионы кобальта в клетку
7	ISO16_RS27950	трансмембранный белок CbiQ, входящий в состав комплекса CbiMNOQ, транспортирующего ионы кобальта в клетку
8	ISO16_RS27955	субстрат-связывающий белок CbiN, входящий в состав комплекса CbiMNOQ, транспортирующего ионы кобальта в клетку
9	ISO16_RS27960	белок CbiN, входящий в состав комплекса CbiMNOQ, транспортирующего ионы кобальта в клетку
10	ISO16_RS27965	транспозаза семейства IS5
11	ISO16_RS27970	транспозаза семейства IS481
12	ISO16_RS27975	субстрат-связывающий белок



Продолжение Таблицы 3.1

Номер ORF на Рисунке 3.1	Локус в геноме NZ_CP064066	Предполагаемый кодируемый белок
13	ISO16_RS27980	НТН транскрипционный регулятор семейства MarR
14	–	гомолог белка NhhE из родственного штамма <i>R. rhodochrous</i> J1, функция не известна
15	ISO16_RS27985	$\beta$ -субъединица нитрилгидратазы
16	ISO16_RS27990	$\alpha$ -субъединица нитрилгидратазы
17	ISO16_RS27995	гомолог $\beta$ -субъединицы нитрилгидратазы
18	ISO16_RS28000	НТН транскрипционный регулятор семейства ArsR
19	ISO16_RS28005	фрагмент транспозазы семейства IS1164
20	ISO16_RS28010	белок семейства Fic, участвующий в процессе деления клетки
21	ISO16_RS28015	гипотетический белок с неизвестной функцией
22	ISO16_RS28020	гипотетический белок с неизвестной функцией
23	ISO16_RS28025	хеликаза семейства DEAD/DEAH-box
24	ISO16_RS28030	гипотетический белок с неизвестной функцией
25	ISO16_RS28035	белок семейства Fic, участвующий в процессе деления клетки
26	ISO16_RS28040	лассо пептид лариатин
27	ISO16_RS28045	аспарагин синтаза
28	ISO16_RS28050	лассо пептид, участвующий в процессе биосинтеза пирролохинолинхинона
29	ISO16_RS28055	лассо пептид, участвующий в процессе биосинтеза B2
30	ISO16_RS28060	АТФ-связывающий транспортный белок

ORF №14, кодирующая белок NhhE, была отмечена на основе ее гомологии с белком NhhE из родственного штамма *R. rhodochrous* J1, функция которого не известна. Ранее было установлено, что белок NhhE не участвует в регуляции экспрессии генов нитрилгидратазы NhhBA [105].

Для более детального биоинформатического анализа и поиска экспериментально изученных гомологов были выбраны следующие ORF: №13 (кодирует НТН транскрипционный

регулятор семейства MarR), №17 (кодирует гомолог  $\beta$ -субъединицы нитрилгидратазы NhmB), №18 (кодирует НТН транскрипционный регулятор семейства ArsR).

Отдельно стоит отметить, что ген *nhmC* (ORF №12) был описан в более ранних исследованиях штамма *R. rhodochrous* M8 [104]. В ходе работ с данным штаммом был получен мутант с инактивированным геном *nhmC*, который утратил способность к синтезу белка нитрилгидратазы NhmBA. Исходя из этого был сделан вывод о том, что белок NhmC является позитивным регулятором экспрессии генов нитрилгидратазы. Являлся ли при этом белок NhmC металло-регулятором ранее изучено не было, поэтому для ORF №12 также провели биоинформатический анализ и поиск экспериментально изученных гомологов.

### 3.1.2. Биоинформатический анализ ORF №12, кодирующей субстрат-связывающий белок NhmC

Биоинформатический анализ ORF проводили по следующей общей схеме:

1. Поиск наиболее близких гомологичных нуклеотидных последовательностей в базе данных NCBI GenBank с помощью алгоритма BLASTN [145].
2. Поиск более отдаленных гомологов предполагаемого продукта, транслируемого с ORF, в базах данных NCBI GenBank [141], UniProtKB/Swiss-Prot [146] с помощью алгоритмов поиска данных ресурсов.
3. Анализ литературных данных по экспериментально изученным гомологичным белкам, если таковые были найдены.

Для нуклеотидной последовательности ORF №12 были найдены одна полностью идентичная и несколько высокогомологичных последовательностей в геномах близких видов *Rhodococcus* (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для ORF №12

Описание	Покрытие, %	Идентичность, %	Номер в NCBI GenBank
последовательность, кодирующая позитивный регулятор экспрессии нитрилгидратазы и амидазы, из штамма <i>R. aetherivorans</i> VKPM AC-2063	100	100,00	LC385649.1

Продолжение Таблицы 3.2

Описание	Покрытие, %	Идентичность, %	Номер в NCBI GenBank
последовательность, кодирующая белок, содержащий субстрат-связывающий домен; автоматически аннотирована в плазмиде <i>plas-1</i> штамма <i>Rhodococcus</i> sp. DMF-1	100	99,45	CP090443.1
последовательность, кодирующая белок, содержащий субстрат-связывающий домен; автоматически аннотирована в плазмиде <i>pPE111</i> штамма <i>R. pyridinivorans</i> PE41	100	98,99	CP096584.1
последовательность, кодирующая регулятор экспрессии нитрилгидратазы NhhC, из штамма <i>R. rhodochrous</i> J1	100	98,80	D67027.1
последовательность, кодирующая белок, содержащий субстрат-связывающий домен; автоматически аннотирована в плазмиде <i>pRJH2</i> штамма <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2	100	98,71	CP050180.1
последовательность, кодирующая белок, содержащий субстрат-связывающий домен; автоматически аннотирована в плазмиде <i>pN2</i> штамма <i>R. aetherivorans</i> N1	99	92,12	CP106983.1

Из наиболее близких найденных гомологов только последовательность из штамма *R. rhodochrous* J1, кодирующая регулятор экспрессии нитрилгидратазы NhhC, была описана в литературе как позитивный регулятор [105], предположительно участвующий в амид-зависимом механизме регуляции экспрессии нитрилгидратазы. Остальные найденные гомологи были автоматически аннотированы алгоритмами базы данных NCBI GenBank и не были изучены экспериментально.

Поскольку поиск среди ближайших гомологов не выявил белков, связанных с регуляцией экспрессии генов ионами металлов, было принято решение провести анализ более отдаленных гомологов, для чего использовали поиск среди аминокислотных последовательностей, заложенных в базах данных NCBI GenBank и UniProtKB/Swiss-Prot.

С помощью алгоритма SmartBLAST NCBI было обнаружено 106 гомологичных белков, причем большинство белков были обозначены как белки, содержащие субстрат-связывающий

домен. Из полученных данных было сформировано филогенетическое дерево с помощью ресурса COBALT NCBI [147], для построения использован метод минимальной эволюции и эволюционная дистанция Гришина, общий вид дерева показан на Рисунке 3.2, ветвь наиболее близких гомологов белка NhmC более детально показана на Рисунке 3.3.

Данный метод построения филогенетического дерева показывает удаленность гомологов друг от друга согласно рассчитанному количеству эволюционных событий. Видно, что наиболее близкие гомологи белка NhmC ожидаемо происходили из бактерий рода *Rhodococcus*, более отдаленные – из родов *Gordonia* и *Streptomyces*. Наиболее отдаленные гомологи относились к семейству белков, транспортирующих мочевины.

Для уточнения функций гомологов дополнительно провели поиск функциональных доменов с помощью ресурса InterProScan [144]. Среди найденных доменов наиболее часто встречались следующие родственные домены (в порядке убывания): IPR028082 – периплазматических белков, связывающих субстрат, IPR028081 – лейцин связывающий и IPR000709 – лейцин/изолейцин/валин связывающий. При этом не было найдено доменов, отвечающих за взаимодействие белков с металлами.

Дополнительно в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot был проведен поиск гомологов среди экспериментально изученных белков. Оказалось, что наибольшей гомологией среди них обладал белок AmiC из *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, номер P27017.5 (24,17 % при 90%-ом покрытии). Данный белок является достаточно далеким по гомологии (отмечен красным треугольником на филогенетическом дереве на Рисунке 3.2) негативным регулятором экспрессии алифатической амидазы [157]. Молекулярный механизм регуляции оперона алифатической амидазы основан на чувствительности к амидам белкового комплекса AmiC-AmiR, в котором также находится РНК-связывающий белок AmiR, проявляющий антитерминирующую транскрипционную активность в отношении оперона алифатической амидазы. В связанном с AmiC состоянии белок AmiR активности не проявляет из-за чего экспрессия алифатической амидазы не происходит. Амиды, взаимодействующие с комплексом AmiC-AmiR, выступают в качестве индукторов экспрессии. Описанный механизм не имеет чувствительности к металлам.

Исходя из проведенного анализа было предположено, что белок NhmC, являющийся позитивным регулятором экспрессии нитрилгидратазы, может быть вовлечен в амид-зависимую регуляцию, и при этом, вероятно, не вовлечен в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы.

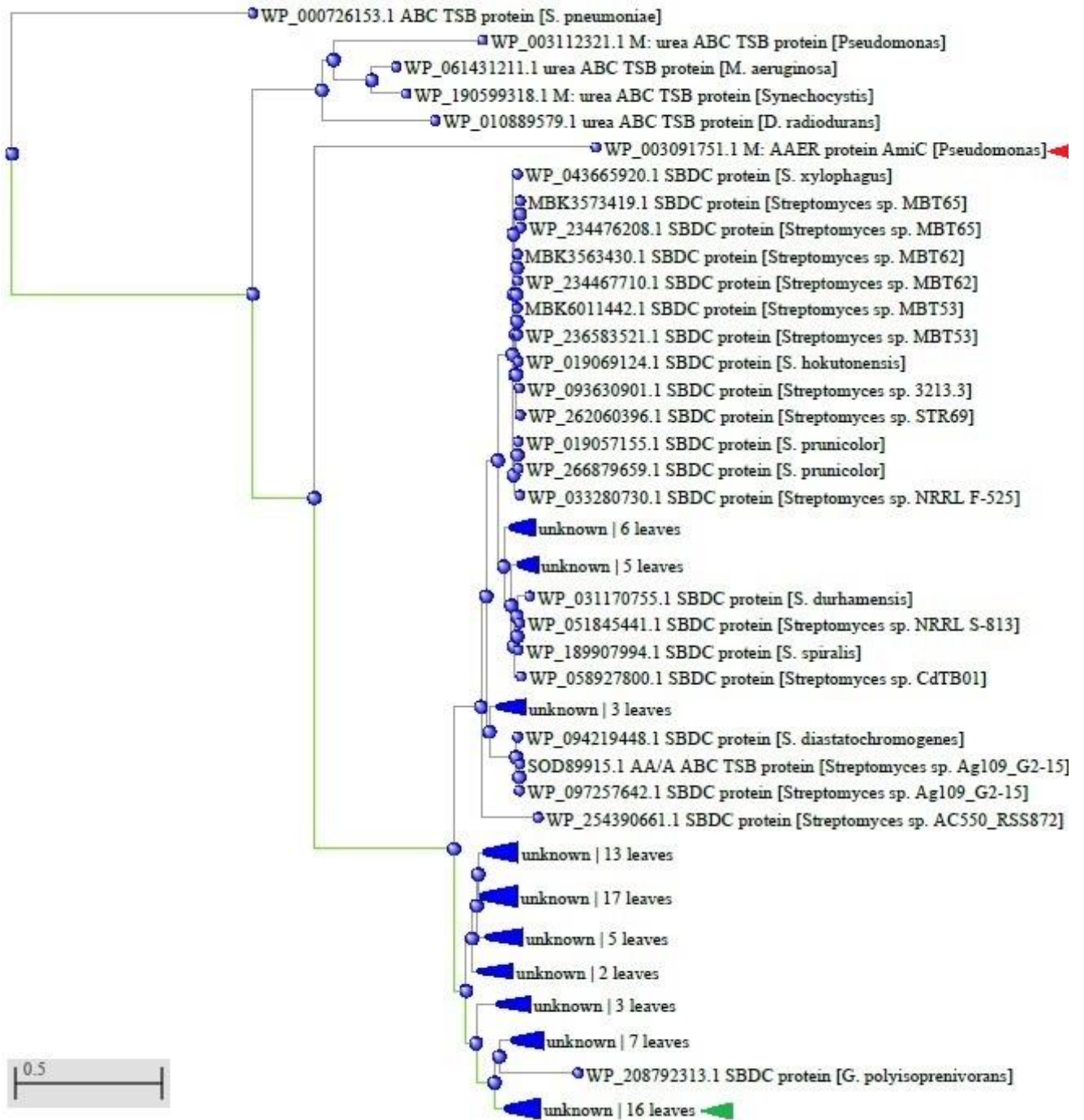


Рисунок 3.2 – Филогенетическое дерево белка NhmC. Ветви, содержащие близкородственные белки (листья) скрыты под общим обозначением unknown с указанием количества содержащихся в них белков. Белок NhmC находится в ветви, отмеченной зеленым треугольником. Красным треугольником отмечен белок AmiC из *P. aeruginosa* PAO1. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)

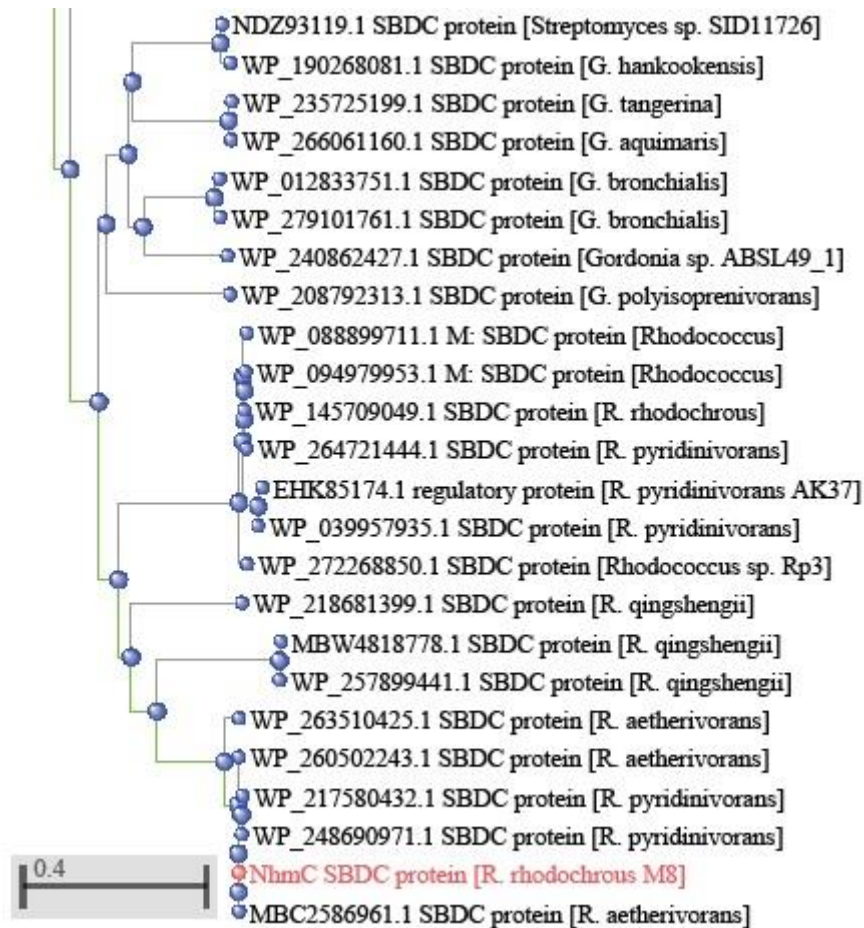


Рисунок 3.3 – Филогенетическое дерево белка NhmC: ветвь наиболее близких гомологов. Белок NhmC отмечен красным цветом. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений.

Изображение создано на сайте URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)

### 3.1.3. Биоинформатический анализ ORF №13, кодирующей НТН транскрипционный регулятор семейства MarR

Анализ ORF №13 проводили согласно описанному выше алгоритму действий. Результаты поиска высокогомологичных нуклеотидных последовательностей приведены в Таблице 3.3.

Оказалось, что все наиболее близкие по гомологии последовательности принадлежали тем локусам, где были найдены ближайшие гомологи белка NhmC. Таким образом единственным из ближайших гомологов, описанных в литературе, являлся позитивный регулятор экспрессии нитрилгидратазы NhhD из штамма *R. rhodochrous* J1 [105] (отмечен красным треугольником на Рисунке 3.4). Механизм регуляции экспрессии данным белком ранее не изучался, поэтому далее был проведен поиск более отдаленных гомологов белка, транслируемого с ORF №13, в базах данных NCBI GenBank [141] и UniProtKB/Swiss-Prot [146]. По аналогии с белками NhmC, NhmB и NhmA белок, транслируемый с ORF №13, был назван NhmD.

Таблица 3.3 – Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для ORF №13

Описание	Покрытие, %	Идентичность, %	Номер в NCBI GenBank
последовательность, кодирующая регулятор экспрессии нитрилгидратазы, из штамма <i>R. aetherivorans</i> VKPM AC-2063	100	100,00	LC385649.1
последовательность, кодирующая транскрипционный регулятор семейства MarR; автоматически аннотирована в плазмиде <i>plas-1</i> штамма <i>Rhodococcus</i> sp. DMF-1	100	99,12	CP090443.1
последовательность, кодирующая транскрипционный регулятор семейства MarR; автоматически аннотирована в плазмиде pPE111 штамма <i>R. pyridinivorans</i> PE41	100	98,23	CP096584.1
последовательность, кодирующая транскрипционный регулятор семейства MarR; автоматически аннотирована в плазмиде pRJH2 штамма <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2	100	97,94	CP050180.1
последовательность, кодирующая регулятор экспрессии нитрилгидратазы NhhD, из штамма <i>R. rhodochrous</i> J1	100	97,94	D67027.1
последовательность, кодирующая транскрипционный регулятор семейства MarR; автоматически аннотирована в плазмиде pN2 штамма <i>R. aetherivorans</i> N1	99	91,72	CP106983.1

С помощью алгоритма SmartBLAST NCBI было обнаружено 20 гомологичных белков, относящихся к MarR семейству транскрипционных регуляторов. Из полученных данных было сформировано филогенетическое дерево с помощью ресурса COBALT NCBI [147], для построения использован метод минимальной эволюции и эволюционная дистанция Гришина (Рисунок 3.4).



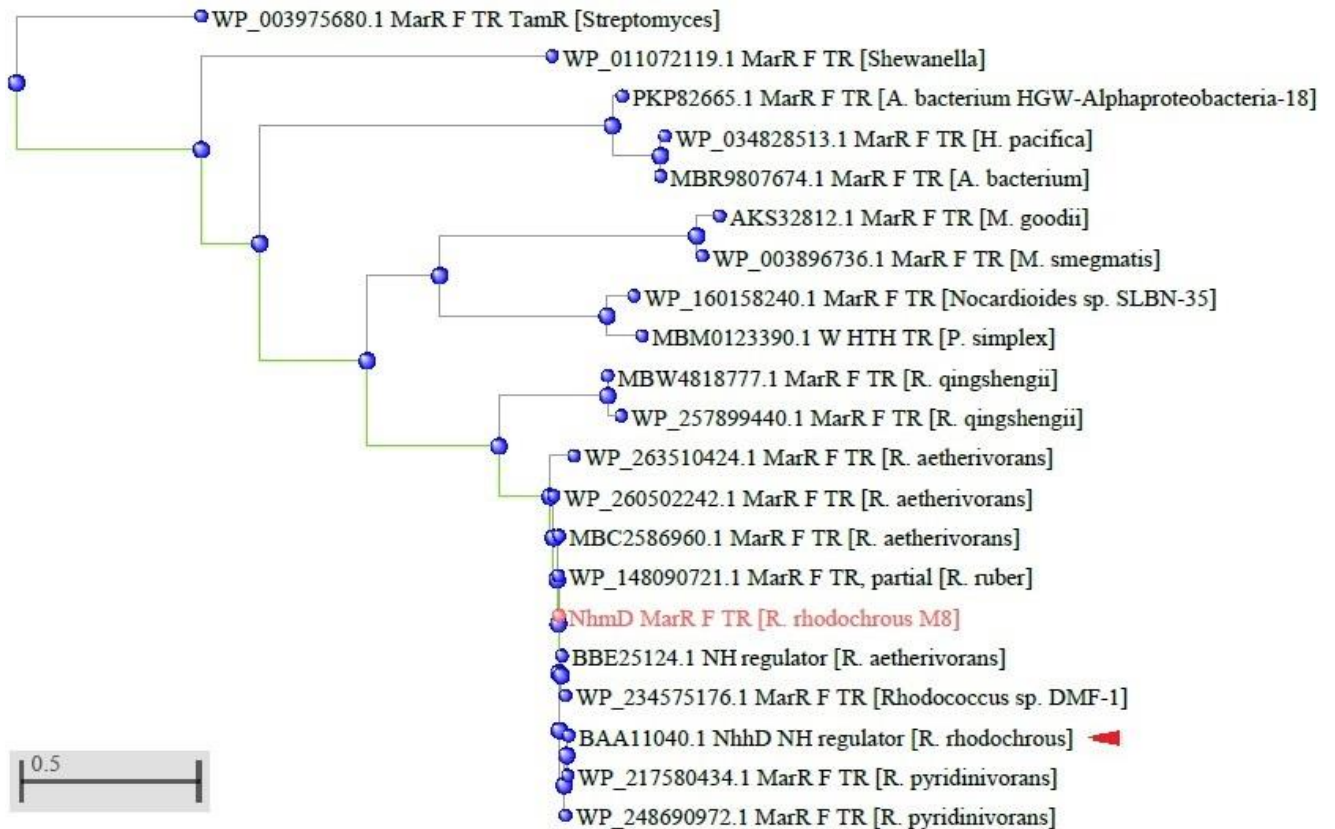


Рисунок 3.4 – Филогенетическое дерево белка NhmD. Белок NhmD отмечен красным цветом.

Белок NhhD из штамма *R. rhodochrous* J1 отмечен красным треугольником. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте

URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)

Семейство MarR включает в себя транскрипционные регуляторы, имеющие в своей структуре мотив спираль-поворот-спираль (НТН) и «крыло» из антипараллельных  $\beta$ -листов. Данные белки чаще всего формируют димеры, способные связываться с ДНК, которые регулируют экспрессию генов устойчивости к антибиотикам, ответа на оксидативный стресс и добавку различных токсичных соединений [158]. Поскольку кобальт является тяжелым металлом, высокая концентрация которого токсична для клеток микроорганизм, белок NhmD, принадлежащий семейству MarR, может быть вовлечен в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции.

Для уточнения, есть ли среди гомологов NhmD белки, содержащие домены, ассоциированные с металло-регуляцией, использовали ресурс InterProScan [144]. Среди найденных доменов наиболее часто встречались следующие родственные домены (в порядке убывания): IPR000835 – спираль-поворот-спираль семейства MarR, IPR036388 и IPR036390 – крылатые спираль-поворот-спираль мотивы. При этом не было найдено доменов, отвечающих за



взаимодействие белков с металлами. Поиск экспериментально изученных гомологов по базе данных UniProtKB/Swiss-Prot [146] не дал результатов.

Полученные результаты указывали на то, что белок NhmD либо содержит неизвестные домены металло-регуляции транскрипции, либо не вовлечен в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы.

*3.1.4. Биоинформатический анализ ORF №17, кодирующей белок NhmG, являющийся гомологом  $\beta$ -субъединицы нитрилгидратазы*

Анализ ORF №17 проводили согласно описанному выше алгоритму действий. Результаты поиска высокогомологичных нуклеотидных последовательностей приведены в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для ORF №17

Описание	Покрытие, %	Идентичность, %	Номер в NCBI GenBank
последовательность, кодирующая вспомогательный белок-активатор нитрилгидратазы, из штамма <i>R. aetherivorans</i> VKPM AC-2063	100	100,00	LC385649.1
последовательность, кодирующая вспомогательный белок нитрилгидратазы; автоматически аннотирована в плазмиде pPE111 штамма <i>R. pyridinivorans</i> PE41	100	100,00	CP096584.1
последовательность, кодирующая вспомогательный белок нитрилгидратазы; автоматически аннотирована в плазмиде pRJH2 штамма <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2	100	100,00	CP050180.1
последовательность нуклеотидов в геноме штамма <i>Nocardia</i> sp. JBRs	100	100,00	AY141130.1
последовательность, кодирующая гомолог $\beta$ – субъединицы нитрилгидратазы NhhG, из штамма <i>R. rhodochrous</i> J1	100	100,00	D67027.1

Продолжение Таблицы 3.4

Описание	Покрытие, %	Идентичность, %	Номер в NCBI GenBank
последовательность, кодирующая вспомогательный белок нитрилгидратазы; автоматически аннотирована в плазмиде <i>plas-1</i> штамма <i>Rhodococcus</i> sp. DMF-1	100	99,05	CP090443.1
последовательность, кодирующая вспомогательный белок нитрилгидратазы; автоматически аннотирована в плазмиде <i>pN2</i> штамма <i>R. aetherivorans</i> N1	99	92,06	CP106983.1

Как и в случае белков NhmC и NhmD, единственная описанная в литературе высокогомологичная (в данном случае идентичная) последовательность принадлежала белку из штамма *R. rhodochrous* J1. Белок NhhG изучен достаточно хорошо: известен молекулярный механизм сборки белкового комплекса нитрилгидратазы и роль белка NhhG в его формировании [103]. Белок NhhG является металло-шапероном, инкорпорирующим ионы кобальта в активный центр нитрилгидратазы, а также участвует в процессе посттрансляционного созревания активного ферментного комплекса, называемого «самообмен субъединицами» [103]. Таким образом можно было предположить, что белок NhmG выполняет схожие функции, необходимые для формирования металло-фермента нитрилгидратазы, но затруднительно было сказать, участвует ли он в металло-зависимой регуляции экспрессии на транскрипционном уровне.

Поиск более отдаленных по гомологии белков, выполненный с помощью алгоритма SmartBLAST NCBI, позволил найти 26 белков, описанных как «вспомогательный белок нитрилгидратазы». Из полученных данных было сформировано филогенетическое дерево с помощью ресурса COBALT NCBI [147], для построения использован метод минимальной эволюции и эволюционная дистанция Гришина (Рисунок 3.5).

Для уточнения функций найденных гомологов по содержащимся в них функциональным доменам использовали ресурс InterProScan [144]. Среди найденных доменов наиболее часто встречались следующие родственные домены (в порядке убывания): IPR024690 –  $\beta$ -субъединицы нитрилгидратазы, IPR042262 – N-конца  $\beta$ -субъединицы нитрилгидратазы, IPR008990 – суперсемейство вспомогательных для транспорта электронов доменов и IPR023808 – вспомогательного белка нитрилгидратазы. Доменов, ассоциированных с металло-зависимой регуляцией транскрипции или связыванием с ДНК выявлено не было. Дополнительный поиск

экспериментально изученных гомологов по базе данных UniProtKB/Swiss-Prot [146] не дал результатов.

На основе идентичности аминокислотной последовательности белков NhmG из штамма *R. rhodochrous* M8 и NhhG из штамма *R. rhodochrous* J1 можно было предположить, что белки выполняют сходные функции, то есть белок NhmG необходим для созревания фермента нитрилгидратазы, но при этом не участвует в кобальт-зависимой регуляции транскрипции его генов.

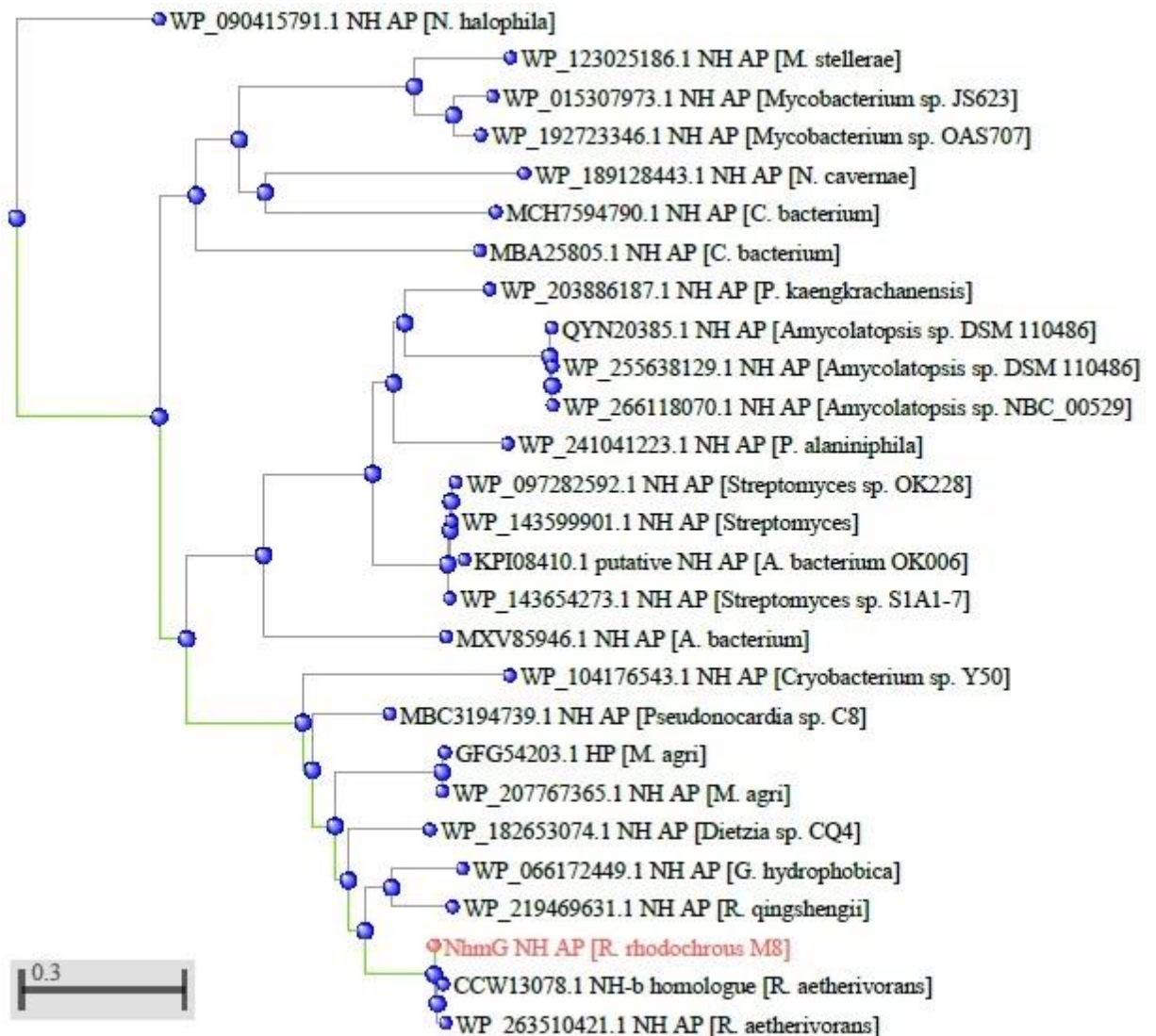


Рисунок 3.5 – Филогенетическое дерево белка NhmG. Белок NhmG отмечен красным цветом.

Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте

URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)

3.1.5. Биоинформатический анализ ORF №18, кодирующей НТН транскрипционный регулятор семейства *ArsR-SmtB*

Анализ ORF №18 проводили согласно описанному выше алгоритму действий. Результаты поиска высокогомологических нуклеотидных последовательностей приведены в Таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для ORF №18

Описание	Покрытие, %	Идентичность, %	Номер в NCBI GenBank
последовательность, кодирующая транскрипционный металло-регулятор <i>ArsR-SmtB</i> семейства; автоматически аннотирована в плазмиде pPE111 штамма <i>R. pyridinivorans</i> PE41	100	98,89	CP096584.1
последовательность, кодирующая НТН транскрипционный регулятор; автоматически аннотирована в плазмиде pRJH2 штамма <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2	100	98,61	CP050180.1
последовательность, кодирующая транскрипционный металло-регулятор <i>ArsR-SmtB</i> семейства; автоматически аннотирована в плазмиде plas-1 штамма <i>Rhodococcus</i> sp. DMF-1	99	98,32	CP090443.1
неполная последовательность, кодирующая транскрипционный регулятор <i>ArsR</i> -типа, из штамма <i>R. aetherivorans</i> VKPM AC-2063	77	100,00	LC385649.1
последовательность, кодирующая транскрипционный металло-регулятор <i>ArsR-SmtB</i> семейства; автоматически аннотирована в плазмиде pN2 штамма <i>R. aetherivorans</i> N1	100	91,94	CP106983.1

Несмотря на то, что идентичная последовательность из штамма *R. aetherivorans* VKPM AC-2063 и все ближайшие гомологи были автоматически аннотированы как «транскрипционный металло-регулятор *ArsR-SmtB* семейства» или «НТН транскрипционный регулятор», среди них не было ни одного экспериментально изученного белка.

Как и для остальных проанализированных ранее белков, для аминокислотной последовательности, транслируемой с ORF №18 (впоследствии названа CblA, а кодирующая последовательность – геном *cblA*), был произведен поиск более далеких гомологов, выполненный с помощью алгоритма SmartBLAST NCBI. 15 найденных гомологов использовали для формирования филогенетического дерева с помощью ресурса COBALT NCBI [147], для построения использован метод минимальной эволюции и эволюционная дистанция Гришина (Рисунок 3.6).

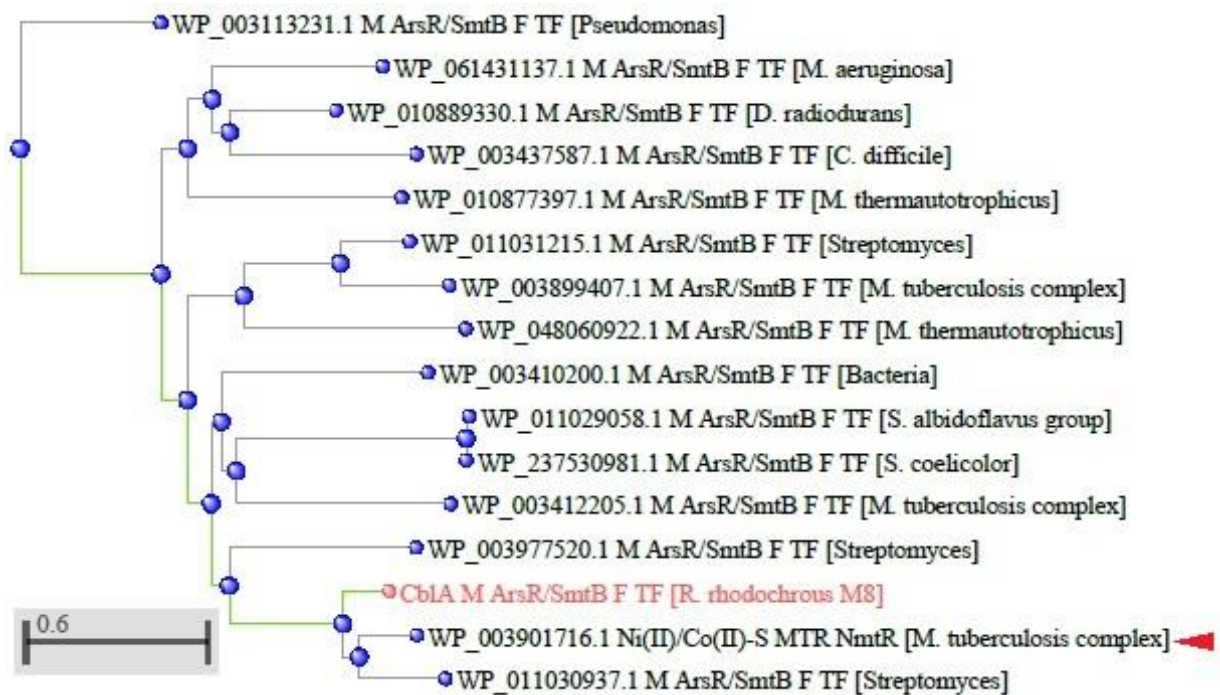


Рисунок 3.6 – Филогенетическое дерево белка CblA. Белок CblA отмечен красным цветом.

Белок NmtR из штамма *M. tuberculosis* отмечен красным треугольником. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте

URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)

Для уточнения функций найденных гомологов по содержащимся в них функциональным доменам использовали ресурс InterProScan [144]. Среди найденных доменов наиболее часто встречались следующие родственные домены (в порядке убывания): IPR001845 и IPR011991 – ДНК-связывающий спираль-поворот-спираль ArsR типа, IPR036388 и IPR036390 – суперсемейства ДНК-связывающих крылатых спиралей.

К семейству транскрипционных металло-регуляторов ArsR-SmtB относятся белки, чувствительные к присутствию различных металлов (Раздел 1.4), однако особый интерес среди всех найденных гомологов CblA представляет белок из штамма *M. tuberculosis*, описанный как транскрипционный репрессор NmtR, чувствительный к ионам Ni<sup>2+</sup> и Co<sup>2+</sup>, который при этом

являлся одним из самых близких по гомологии к CblA (64 % гомологии аминокислотной последовательности) [159, 160]. Выравнивание белков CblA и NmtR представлено на Рисунке 3.7.

```

CblA 1  MGHGMRVRSATPVVALDPAAAATVAETLQALASPNRLILARLRQGPCGVTELAEAVG 58
NmtR 1  MGHGVEGRNR-PSAPLDSQAAQVASTLQALATPSRLMILTQLRNGPLPVTDLAEAIG 57

CblA 59  MEQPAVSHQLRLLRALRLVIGERSGRSVVYSLYDSHVASLLDEAVYHIEHLRLGAPES 116
NmtR 58  MEQSAVSHQLRVLRNLGLVVGDRAGRSIVYSLYDTHVAQLLDEAIYHSEHLHLGLSDR 115

CblA 117 HLP----- 119
NmtR 116 HPSAG----- 120

```

Рисунок 3.7 – Выравнивание аминокислотной последовательности CblA с ближайшим экспериментально изученным гомологом NmtR. Красным цветом показаны идентичные аминокислоты. Подчеркнутые аминокислоты NmtR входят в сайт связывания ионов металла

Структура белка NmtR и механизм регуляции, которую он осуществляет, описан достаточно подробно [159, 160]. Известно, что связывание NmtR с ионами металла происходит в  $\alpha 5$ -сайте, образованным аминокислотными остатками Asp91, His93, His104 и His107, входящим в  $\alpha 5$  спираль, а также остатками His109 и His116 в С-концевом участке белка. Альтернативный сайт связывания формируется при участии мотива Gly2-His3-Gly4 вместо остатков His109 и His116, причем остаток His3 играет ведущую роль в  $Ni^{2+}/Co^{2+}$ -зависимой регуляции. Идентичные аминокислоты в соответствующих положениях присутствуют в последовательности белка CblA, за исключением His109. При этом консервативная последовательность ELCVC, формирующая сайты связывания с ионами металлов  $\alpha 3$  и  $\alpha 3N$ , найденная в некоторых других белках семейства ArsR-SmtB (Раздел 1.4), в белках NmtR и CblA отсутствует.

Таким образом можно было сделать предположение о том, что белок CblA вовлечен в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы.

Проведенный биоинформатический анализ позволил сформировать список генов для экспериментальной проверки их участия в кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы: *nhtC*, *nhtD*, *nhtG* и *cblA*.

*3.1.6. Биоинформатический анализ регуляторной области  $P_{nh569}$ , предположительно содержащей промотор оперона *nhtBAG**

Между изучаемым опероном генов нитрилгидратазы *nhtBAG* и расположенным перед ним ORF №14, кодирующим фрагмент белка NhmE, находилась последовательность длиной 604 п.н. (Рисунок 3.1). Прилегающая к ORF №14 область содержала фланкирующие последовательности мобильного элемента IS1164, оставшаяся часть длиной 569 п.н. была обозначена  $P_{nh569}$  (регуляторная область генов нитрилгидратазы длиной 569 п.н.). Несмотря на то, что промоторы



бактериальных генов обычно расположены вплотную к экспрессируемым генам, известны случаи, когда функциональные боксы промоторов отдалены на значительное расстояние от старт-кодона гена. Учитывая возможность отдаленного расположения боксов посадки РНК-полимеразы от старт-кодона гена, на начальном этапе анализа за регуляторную область генов нитрилгидратазы был принят полный фрагмент P<sub>nh569</sub>.

Поиск высокоомологичных последовательностей в базе данных NCBI GenBank [141] показал, что идентичные и схожие последовательности были найдены в геномах различных штаммов родококков и *Nocardia* sp. YS-2002 перед генами нитрилгидратазы (Таблица 3.6). Покрытие менее 100 % для некоторых из найденных последовательностей означает, что представленные в базе данных фрагменты содержат только 3'- части предполагаемых регуляторных областей, примыкающие к старт-кодону  $\beta$ -субъединицы фермента нитрилгидратазы. Структура данных участков ранее не изучалась, поэтому для локализации функциональных участков внутри фрагмента P<sub>nh569</sub> необходимо было использовать специализированные биоинформатические ресурсы.

Таблица 3.6 – Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для регуляторной области P<sub>nh569</sub>

Описание	Покрытие, %	Идентичность, %	Номер в NCBI GenBank
последовательность перед генами $\beta$ -субъединицы фермента нитрилгидратазы из штамма <i>R. aetherivorans</i> VKPM AC-2063	100	100,00	LC385649.1
последовательность перед автоматически аннотированной $\beta$ -субъединицей фермента нитрилгидратазы в плазмиде pPE111 штамма <i>R. pyridinivorans</i> PE41	100	98,77	CP096584.1
последовательность перед автоматически аннотированной $\beta$ -субъединицей фермента нитрилгидратазы в плазмиде pRJH2 штамма <i>R. pyridinivorans</i> YC-JH2	100	98,59	CP050180.1
последовательность перед генами $\beta$ -субъединицы фермента нитрилгидратазы из штамма <i>R. rhodochrous</i> J1	100	98,59	D67027.1

Продолжение Таблицы 3.6

Описание	Покрытие, %	Идентичность, %	Номер в NCBI GenBank
последовательность перед автоматически аннотированной $\beta$ -субъединицей фермента нитрилгидратазы в плазмиде <i>plas-1</i> штамма <i>Rhodococcus</i> sp. DMF-1	100	97,89	CP090443.1
промотор генов нитрилгидратазы из штамма <i>R. ruber</i> TH3	83	100	MG407683.1
последовательность перед генами $\beta$ -субъединицы фермента нитрилгидратазы в плазмиде <i>pN2</i> штамма <i>R. aetherivorans</i> N1	99	83,22	CP106983.1
последовательность перед генами $\beta$ -субъединицы фермента нитрилгидратазы в штамме <i>Nocardia</i> sp. YS-2002	46	99,25	AY168347.1
последовательность перед генами $\beta$ -субъединицы фермента нитрилгидратазы в штамме <i>Rhodococcus</i> sp. BX2	40	98,26	HQ388836.1
последовательность перед генами $\beta$ -субъединицы фермента нитрилгидратазы в штамме <i>R. pyridinivorans</i> MW3	31	98,90	AJ582605.1
последовательность перед генами $\beta$ -субъединицы фермента нитрилгидратазы в штамме <i>R. pyridinivorans</i> S85-2	28	99,39	AB211984.1

Для локализации сайтов связывания с РНК-полимеразой использовали несколько независимых биоинформатических ресурсов: BПРОМ [81], NNPP (для прокариотических организмов) [82], PromoterHunter (со стандартными настройками) [83], SAPPHIRE.CNN [84]. Важно отметить, что эффективность предсказания промоторов с помощью этих программ для различных организмов может отличаться, так в случае родококков точность предсказания может быть снижена из-за высокого содержания GC пар (около 70 % для штамма *R. rhodochrous* M8). Результаты предсказания приведены на Рисунке 3.8 и в Таблице 3.7.





Рисунок 3.8 – Схема расположения предсказанных промоторов на участке  $P_{nh569}$ . Желтым и оранжевым цветом обозначен результат, полученный с помощью программы BPROM (rpoD15 – дополнительный сайт связывания  $\sigma^{70}$ , -35 и -10 – сайты связывания РНК-полимеразы), голубым – NNPP, зеленым – PromoterHunter, синим – SAPPHIRE.CNN. Сверху указаны координаты усредненных промоторов P1 и P2

Таблица 3.7 – Результат поиска функциональных промоторов в регуляторной области  $P_{nh569}$

Программа	Сайт, координаты, последовательность 5' – 3'	
	Область P1	Область P2
BPROM	rpoD15 <sub>1</sub> , [-482; -475], AGGATТАА; rpoD15 <sub>2</sub> , [-478; -471], ТТААСАСА; -35, [-462; -457], ТТGАСА; -10, [-441; -433], АGТAAAAАТ	-35, [-75; -70], ТТGАСА; -10, [-57; -49], GAGTAGAAG
NNPP	промотор, [-468; -419], ТАСАСАТТGАСАТССGТТССGАТ GТGАAGТAAAAАТТGТCАСGТA GGGCG	–
PromoterHunter	промотор, [-472; -424], САТСТАСАСАТТGАСАТССGТТC CGАТGТGАAGТAAAAАТТGТCА CGТA	промотор, [-85; -39], GCCGGAACАТТТGАСАССТТСТC CCTACGAGTAGAAGCCAGCTGG AC
SAPPHIRE.CNN	промотор, [-462; -434], ТТGАСАТССGТТССGАТGТGАAG ТАAAAA	промотор, [-32; -4], ТТGAGCCСAGCTССGАТGААAG GAATGAG

Предсказанные разными программами промоторы оказались сгруппированными в двух областях: отдаленной от старт-кодона P1 и прилегающей к старт-кодону P2. В области P1 промотор предсказали все 4 программы, алгоритм BPROM определил как -35 и -10 сайты

связывания РНК-полимеразы (промежуток между сайтами 15 п.н.), так и дополнительные перекрывающиеся сайты связывания с  $\sigma^{70}$  (rpoD15<sub>1</sub> и rpoD15<sub>2</sub>). В области P2 промотор был предсказан двумя программами: BPROM и NNPP, причем предсказанное BPROM расстояние между боксами -35 и -10 составляло 12 п.н., что значительно меньше обычного расстояния для бактериальных промоторов, распознаваемых фактором  $\sigma^{70}$ . Также программа SAPPHERE.CNN предсказала наличие промотора в фрагменте [-32; -4], расположение которого перекрывается с предполагаемым сайтом Шайна-Дальгарно (SD), который располагается на транскрибируемой мРНК за 6 – 7 нуклеотидов до старт-кодона гена, что снижает вероятность нахождения функционального промотора в данном месте. Исходя из этого были установлены следующие границы областей P1 и P2: [-472; -419] и [-85; -39]. Определение того, какая из предсказанных областей проявляет транскрипционную активность, и локализация функционального участка, достаточного для достижения максимального уровня экспрессии целевого гена, требовали экспериментального исследования.

Согласно результату проведенного поиска генов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы, белок CblA является предполагаемым ТФ. Из литературных данных известно, что белки семейства ArsR-SmtB, к которому принадлежит белок CblA, обычно связываются с ДНК в районе регуляторной области. При этом сайты их посадки могут как перекрываться с сайтами посадки РНК-полимеразы (боксами -35 и -10), так и располагаться на небольшом отдалении до или после них. Поскольку белки семейства ArsR-SmtB взаимодействуют с ДНК в форме гомодимеров, их сайты посадки представляют из себя несовершенные инвертированные повторы (палиндромы). Белки, наиболее близкие по гомологии к CblA (NmtR из *M. tuberculosis* и другие) имеют общую структуру сайтов посадки «12-2-12», где 12 – количество нуклеотидов, составляющих повторяющийся участок (плечо палиндрома) и 2 – количество нуклеотидов между двумя повторяющимися участками [112]. Описаны белки, имеющие отличающуюся структуру сайтов посадки, например «13-4-13» для белка KmtR из *M. tuberculosis* [112]. Известные последовательности сайтов посадки заметно отличаются друг от друга, поэтому консенсусную последовательность для них определить затруднительно.

Так как провести прямой поиск консенсусной последовательности сайтов посадки белка CblA было невозможно, фрагмент P<sub>nh569</sub>, предположительно являющийся регуляторной областью оперона *nhmBAG*, проверили на наличие несовершенных инвертированных повторов с помощью ресурса EMBOSS palindrome. Поиск проводили со следующими параметрами: длина плеча палиндрома не более 14 нуклеотидов, расстояние между плечами не более 4 нуклеотидов, количество несопадающих нуклеотидов не более 5. Найденные повторы приведены в

Таблице 3.8 с указанием их длины, количеством нуклеотидов между повторяющимися участками и точности палиндрома, а их расположение показано на Рисунке 3.9.

Таблица 3.8 – Результат поиска несовершенных инвертированных повторов в регуляторной области P<sub>nh569</sub>

Обозначение палиндрома на Рисунке 3.9	Длина плеча палиндрома, п.н.	Расстояние между плечами палиндрома, п.н.	Количество несовпадающих нуклеотидов
1	13	0	5
2	12	3	5
3	12	2	5
4	13	4	4
5	13	1	5
6	13	3	4
7	14	3	5
8	12	3	3
9	13	3	3
10	12	1	5
11	13	0	5
12	12	1	5
13	12	0	5
14	12	0	4

Все длины плеч палиндрома, расстояние между ними и количество несовпадающих нуклеотидов, приведенные в Таблице 3.8, для унификации записаны в том виде, в котором они были получены в ходе работы ресурса EMBOSS palindrome. При этом каждый палиндром можно представить также приведенным к виду общей структуры сайтов посадки «m-n-m», где n будет соответствовать наиболее часто встречающимся количествам нуклеотидов между плечами (2, 4, реже 3), а m примет соответствующее значение длины плеча. Например, палиндром 1 может быть записан как «13-0-13», так и «12-2-12» без изменения последовательностей найденный сайтов посадки регуляторного белка. С точки зрения физического расположения сайтов посадки димерного регулятора транскрипции второй вариант, вероятно, является более точным, так как

подразумевает существование промежутка между плечами палиндрома, необходимого для правильного расположения белковой молекулы регулятора (Раздел 1.4).

Поскольку большинство металло-регуляторов транскрипции, гомологичных белку CblA, имеют четное количество нуклеотидов между плечами палиндрома (2 или реже 4), то найденные палиндромы с нечетным количеством нуклеотидов между плечами были признаны менее вероятными (на Рисунке 3.9 отмечены бордовым цветом). Оказалось, что большая часть найденных палиндромов была сгруппирована вокруг предполагаемых промоторов P1 и P2, что соответствует обычному расположению сайтов посадки металло-регуляторов семейства ArsR-SmtB.



Рисунок 3.9 – Схема расположения несовершенных инвертированных повторов на участке  $P_{nh569}$ . Желтым цветом обозначены предполагаемые промоторы P1 и P2 с указанием -35 и -10 – сайтов связывания РНК-полимеразы, зеленым – несовершенные инвертированные повторы с четным количеством нуклеотидов между плечами палиндрома, бордовым – с нечетным

Достоверное определение нуклеотидов, вступающих во взаимодействие с белком-регулятором, требовало бы экспериментального изучения, например с помощью метода фингерпринта. В ходе данной работы проведения такого определения не предполагалось, поскольку локализовать расположение сайтов посадки регуляторного белка в первую очередь требовалось для оценки возможности использования полностью функциональной регуляторной области с сохранением кобальт-зависимого механизма регуляции транскрипции.

Дополнительно фрагмент  $P_{nh569}$  был проанализирован на содержание известных рибопереключателей с помощью ресурсов Riboswitch Scanner [148, 149] и Infernal [150], которые не выявили наличия структур, относящихся к известным семействам рибопереключателей. При этом согласно ресурсу RNAstructure [151], 5'-нетранслируемая область мРНК, которая будет являться результатом транскрипции с регуляторной области  $P_{nh569}$ , может образовывать множественные вторичные структуры, наиболее вероятными (90 – 99 % вероятности) из которых являются 2 шпильки с длиной стебля от 8 до 10 нуклеотидов (Рисунок 3.10). Найденные шпильки расположены между областями P1 и P2, что делает возможным их влияние на функционирование 5'-нетранслируемой области мРНК в том случае, если транскрипция инициируется в области P1.

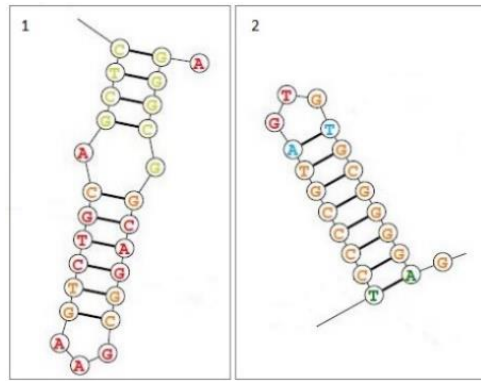


Рисунок 3.10 – Предсказанные вторичные структуры в составе 5'-нетранслируемой области мРНК, являющейся результатом транскрипции с регуляторной области  $P_{nh569}$ . Цветами обозначены степени вероятности формирования данных структур: синий – 60 – 70 %, зеленый – 80 – 90 %, желтый – 90 – 95 %, оранжевый – 95 – 99 %, красный – более 99 %. Изображение создано с помощью ресурса RNAstructure

Таким образом анализ региона  $P_{nh569}$ , предположительно являющегося регуляторной областью оперона *nhmBAG*, позволил составить возможную схему функциональных участков, представленную на Рисунке 3.11. Регион содержит два участка с предсказанной способностью инициировать транскрипцию: P1 [-472; -419] и P2 [-85; -39]. В непосредственной близости к обоим участкам, в том числе с частичным перекрытием, находятся несколько несовершенных инвертированных повторов, которые потенциально могут выступать в качестве сайтов посадки белка металло-регулятора CblA. В случае транскрипционной активности участка P1, происходит синтез мРНК, содержащей протяженную 5'-нетранслируемую область, которая может формировать сложную вторичную структуру, не содержащую известных на данный момент рибопереклюателей.

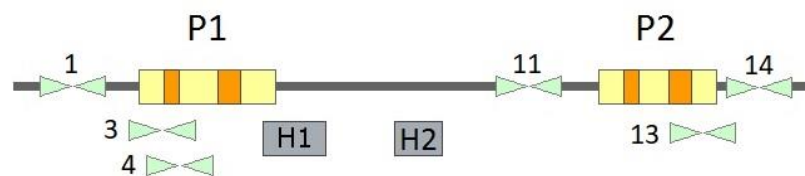


Рисунок 3.11 – Схема расположения предсказанных функциональных участков в составе области  $P_{nh569}$ . Желтым цветом обозначены предполагаемые промоторы P1 и P2 с указанием -35 и -10 – сайтов связывания РНК-полимеразы (оранжевый), зеленым – несовершенные инвертированные повторы с четным количеством нуклеотидов между плечами палиндрома, серым – возможные вторичные структуры, формируемые в 5'-нетранслируемой области мРНК; масштаб не сохранен

В результате биоинформатического анализа окружения генов нитрилгидратазы были выявлены следующие генетические элементы, потенциально вовлечённые в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции этих генов: ген предполагаемого металло-чувствительного транскрипционного регулятора *cblA*, ген предполагаемого металло-шаперона *nhmG*, гены предполагаемых транскрипционных регуляторов *nhmC* и *nhmD*, регуляторная область генов нитрилгидратазы  $P_{nh569}$ .

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

#### *3.2.1. Замена генов нитрилгидратазы на ген ациламидазы в штамме Rhodococcus rhodochrous M33 – получение штамма Rhodococcus rhodochrous M33 aam*

Для изучения кобальт-зависимой транскрипции генов нитрилгидратазы в штамме *R. rhodochrous* M8 (то есть для оценки транскрипционной активности регуляторной области  $P_{nh569}$ ) было необходимо создать генетическую тест-систему, основанную на репортёрном белке, не являющимся металло-ферментом. Фермент нитрилгидратаза в данном случае не мог выступать в качестве репортёрного белка, так как кобальт является его кофактором, необходимым для осуществления ферментативной активности.

Ранее в лаборатории №22 НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов был открыт и описан фермент ациламидаза Aam из штамма *R. qingshengii* TA37 [133]. Этот фермент обладает рядом преимуществ по сравнению с известными репортёрными белками, ранее использованными в различных видах родококков (Таблица 1.4). Ген *aam*, кодирующий ациламидазу, происходит из близкородственного микроорганизма, что позволяет предполагать отсутствие затруднений, связанных с рекомбинантной экспрессией: неоптимального для штамма-хозяина GC-состава ДНК, разницы в кодонных предпочтениях и редких кодонах. Определение активности фермента не требует выделения и очистки репортёрного белка и может быть произведено спектрофотометрическим методом с использованием целых клеток с помощью измерения концентрации окрашенного продукта ферментативной реакции гидролиза п-нитроацетанилида – п-нитроанилина (п-НА). За 1 единицу ациламидазной активности принимают такое количество фермента, которое требуется для получения 1 мкМ п-НА за 1 минуту в расчете на 1 мг с.в.кл. при оптимальных условиях. Для расчета ациламидазной активности клеток использовали формулу (2.1).

К моменту начала исследований с помощью ненаправленного мутагенеза из дикого штамма *R. rhodochrous* M8 было получено два производных штамма: *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M50, отличающихся изменениями, произошедшими в структуре кластера генов нитрилгидратазы

и близлежащих областях генома (Рисунок 1.3). Для конструирования генетической системы для тестирования генетических регуляторных элементов в качестве модельного штамма был выбран штамм *R. rhodochrous* M33, в котором ген *nhmC* был полностью делетирован, ген *nhmD* – нарушен частичной делецией, оперон *nhmBAG* и ген *cblA* не содержали изменений.

Получение штамма *R. rhodochrous* M33 аам было основано на способности родококков к гомологичной рекомбинации без введения в клетку экзогенных рекомбиназ [140]. Для интеграции целевого участка ДНК использовали плазмиду pRY1 [140], не способную к автономной репликации в клетках родококков, которую вводили в штамм-реципиент *R. rhodochrous* M33 с помощью конъюгативного переноса. Подробная схема конструирования штамма *R. rhodochrous* M33 аам приведена на Рисунке 3.12 и Рисунке 3.13.

Ген *aam* ациламидазы амплифицировали с помощью праймеров NcoI-AA и AA-SacI-3, используя в качестве матрицы хромосому штамма *R. qingshengii* TA37. При этом вторая аминокислота белка была заменена с треонина на аланин для вставки сайта рестрикции *NcoI*. Фрагменты ДНК, выступавшие в роли плечей для гомологичной рекомбинации, амплифицировали с помощью праймеров BamHI-M8-3 и M33-NcoI для первого плеча и SacI-nhmG-3 и nhmG-EcoRI-3 для второго плеча, используя в качестве матрицы хромосому штамма *R. rhodochrous* M33. Первое плечо, являющееся фрагментом регуляторной области P<sub>nh</sub> длиной 512 п.н., содержало замену в двух последних нуклеотидах, введенную для формирования сайта рестрикции *NcoI*. Второе плечо содержало ген *nhmG*, область, фланкирующую его с 3'-стороны, а также область длиной 50 п.н. перед геном *nhmG*, взятую для сохранения нативного RBS гена.

Соединение полученных последовательностей ДНК проводили в два этапа (Рисунок 3.12). На первом этапе P<sub>nh</sub>-плечо и ген ациламидазы клонировали в плазмидный вектор pUC19 по сайтам рестрикции *BamHI* и *SacI*, между собой фрагменты были соединены сайтом рестрикции *NcoI*. На втором этапе конструирования в полученную плазмиду pUC-P<sub>nh</sub>-AA клонировали фрагмент ДНК, содержащий *nhmG*-плечо, используя сайты рестрикции *SacI* и *EcoRI*. Из полученной плазмиды pUC-P<sub>nh</sub>-AA-nhmG, после проверки последовательности собранной кассеты секвенированием, фрагмент P<sub>nh512</sub>-*aam-nhmG* вырезали по сайтам рестрикции *BamHI* и *EcoRI* и клонировали в плазмидный вектор pRY1. Мобилизуемый вектор pRY1-P<sub>nh</sub>-AA-nhmG ввели в штамм *R. rhodochrous* M33.

Клоны, в которых произошел первый кросс гомологичной рекомбинации, отбирали по устойчивости к тиострептому, интеграцию гена *aam* подтверждали секвенированием, а также измеряя ациламидазную активность клеток. Интеграция кассеты во время первого кросса могла происходить как по первому, так и по второму плечу (Рисунок 3.13). Всего было получено 3 интегранта первого типа, где интеграция произошла по P<sub>nh</sub>-плечу, и 1 интегрант второго типа,

где интеграция произошла по *nhmG*-плечу. Полученные штаммы назвали *R. rhodochrous* M33 aam I и M33 aam II соответственно.

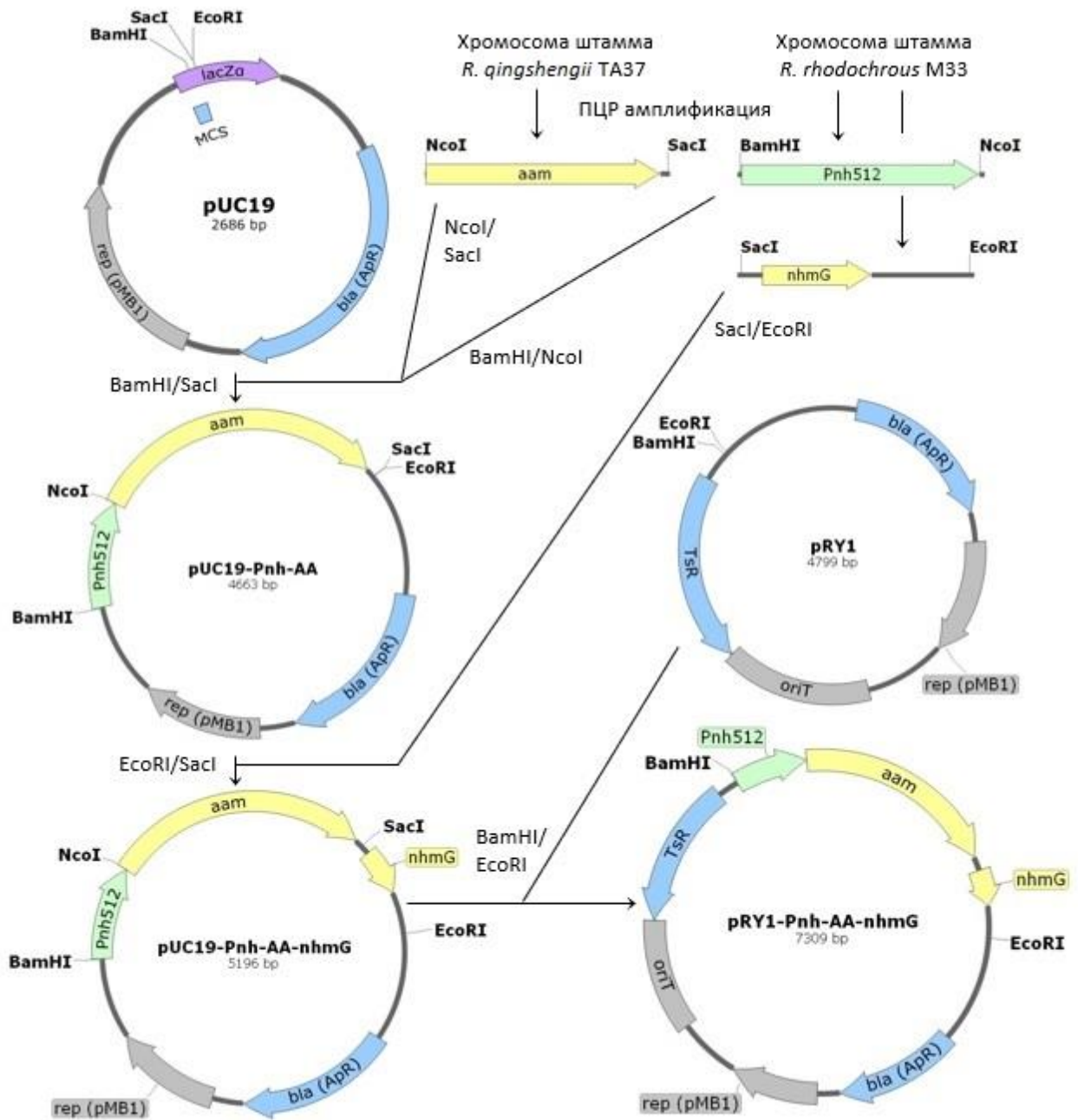


Рисунок 3.12 – Схема конструирования плазмидного вектора pRY1-P<sub>nh</sub>-AA-nhmG. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *EcoRI*, *SacI*, *NcoI*, *BamHI*; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов



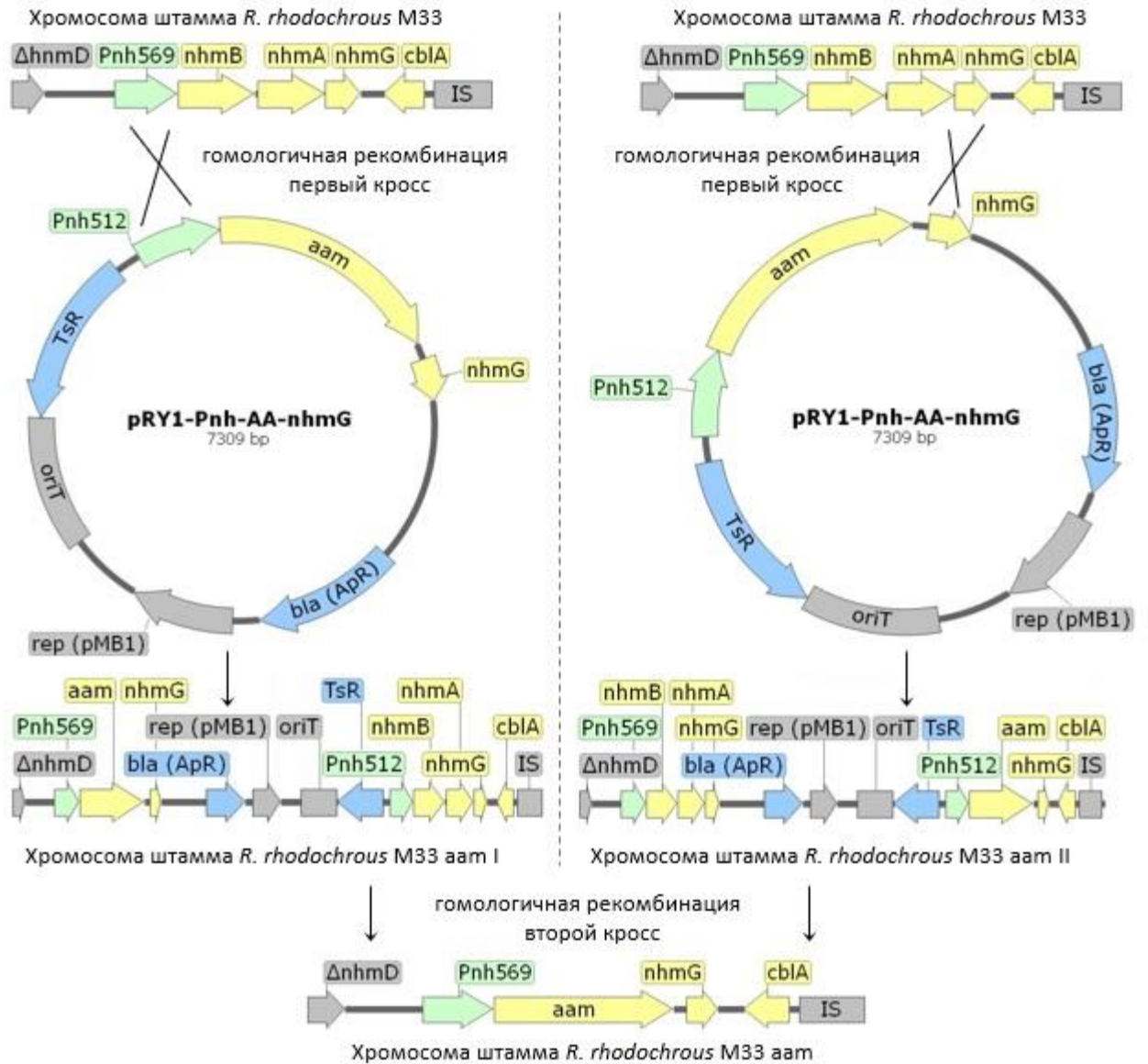


Рисунок 3.13 – Схема конструирования штамма *R. rhodochrous* M33 aam. Слева: рекомбинация по P<sub>nh</sub>-плечу; справа: рекомбинация по nhmG-плечу. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

Интегранты обоих типов было решено проверить на наличие целевой ациламидазной активности. Для этого штаммы *R. rhodochrous* M33 aam I и M33 aam II выращивали в течение 48 часов при стандартных условиях в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в среде. Результаты измерения ациламидазной активности клеток штаммов представлены в Таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Ациламидазная активность клеток штаммов *R. rhodochrous* M33 aam I и *R. rhodochrous* M33 aam II

Штамм	Ациламидазная активность клеток, ед.	
	42 мкМ Co <sup>2+</sup>	0 мкМ Co <sup>2+</sup>
<i>R. rhodochrous</i> M33 aam I	3,7 ± 0,6	1,5 ± 0,1
<i>R. rhodochrous</i> M33 aam II	3,7 ± 0,5	1,6 ± 0,1

Уровни активностей клеток штаммов *R. rhodochrous* M33 aam I и M33 aam II не отличались не смотря на различия в длине регуляторной области перед целевым геном *aam*: 569 п.н. в первом случае и 512 п.н. во втором. Индукция активности ионами кобальта также наблюдалась в обоих штаммах, степень индуцибельности составляла примерно 2,5 раза.

Для исключения из состава хромосомы генов нитрилгидратазы проводили выщепление плазмиды pRY1 из хромосом штаммов M33 aam I и M33 aam II с помощью второго кросса гомологичной рекомбинации. Так в хромосоме штамма M33 aam I должна была произойти рекомбинация по *nhmG*-плечу, а в хромосоме штамма M33 aam II – по *P<sub>nh</sub>*-плечу. Клоны, утратившие устойчивость к тиострептон и нитрилгидратазную активность, при этом сохранившие ациламидазную активность, проверили секвенированием для подтверждения последовательности замененного участка ДНК. Таким образом было получено 14 клонов, в которых гены нитрилгидратазы *nhmVA* были заменены на ген ациламидазы *aam*.

Полученные клоны выращивали в жидкой культуре при стандартных условиях в присутствии ионов кобальта в течение 48 часов для выявления клона с максимальной ациламидазной активностью (Рисунок 3.14). Клон *R. rhodochrous* M33 aam 113-8, продемонстрировавший максимальную ациламидазную активность, был назван *R. rhodochrous* M33 aam и использовался в дальнейшей работе в качестве контрольного штамма.

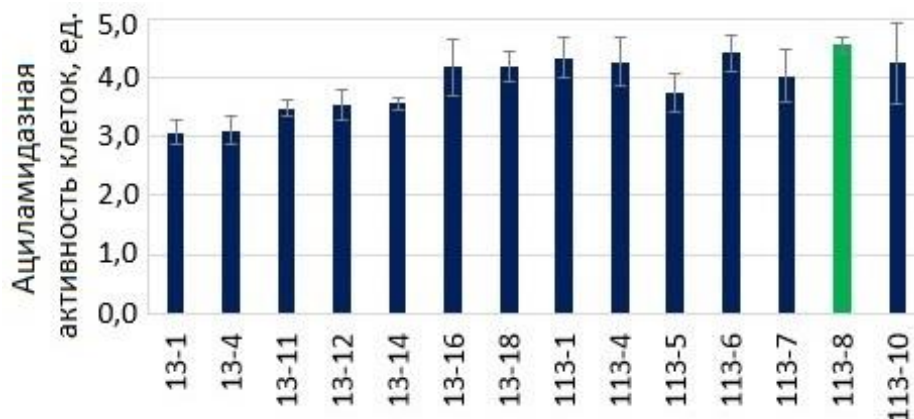


Рисунок 3.14 – Ациламидазная активность клеток клонов штамма *R. rhodochrous* M33 аам. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 48 часов, концентрация ионов кобальта в среде составляла 42 мкМ

3.2.2. Оценка влияния присутствия ионов кобальта в среде на транскрипционную активность регуляторной области  $P_{nh569}$  в штамме *Rhodococcus rhodochrous* M33 аам; оценка влияния генов *nhmC*, *nhmD* на транскрипционную активность регуляторной области  $P_{nh569}$

На первом этапе экспериментальной работы с новой тест-системой было необходимо убедиться в том, что в сконструированном штамме *R. rhodochrous* M33 аам транскрипционная активность регуляторной области  $P_{nh569}$  регулируется ионами кобальта аналогично тому, как это происходило в исходном штамме *R. rhodochrous* M33. Для этого транскрипционная активность регуляторной области  $P_{nh569}$  в обоих штаммах оценивалась с помощью метода RT-qPCR и с помощью измерения целевых ферментативных активностей клеток штаммов (ациламидазной в случае штамма *R. rhodochrous* M33 аам и нитрилгидратазной в случае штамма *R. rhodochrous* M33). Дополнительно, штаммы *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 сравнили по динамике роста в жидкой среде, так как сравнение транскрипционной активности регуляторной области  $P_{nh569}$  в этих штаммах было необходимо проводить на одинаковых стадиях роста культуры.

Динамика роста штамма *R. rhodochrous* M33 аам в стандартных условиях не отличалась от исходного штамма *R. rhodochrous* M33, типичный график кривой роста штаммов приведен на Рисунке 3.15. Логарифмической стадии роста культур соответствовал отрезок от 12 до 24 часов. После 24 часов выращивания культуры обоих штаммов переходили в стационарную фазу роста.

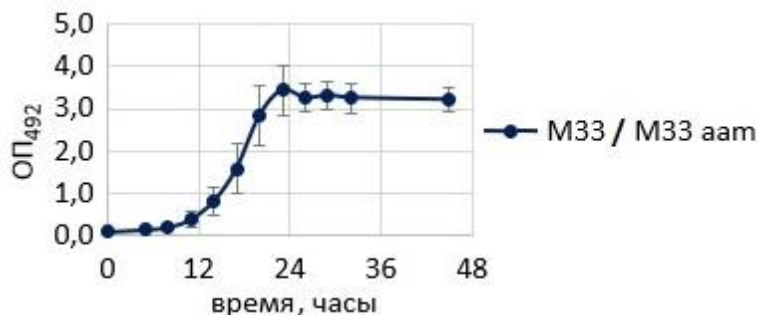


Рисунок 3.15 – Кривая роста штаммов *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 aam. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях, концентрация ионов кобальта в среде составляла 42 мкМ

Степень индуцибельности транскрипции ионами кобальта измерялся по относительному количеству специфической мРНК в клетках с помощью метода RT-qPCR. Для штамма *R. rhodochrous* M8 ранее было показано, что гены *nhmB*, *nhmA* и *nhmG* транскрибировались в составе единой полицистронной матрицы (Раздел 1.3). Структура оперона *nhmBAG* в штамме *R. rhodochrous* M33 не изменилась по сравнению со штаммом *R. rhodochrous* M8, поэтому ожидалось, что в нем гены нитрилгидратазы и ген *nhmG* также будут транскрибироваться единым транскриптом. При конструировании штамма *R. rhodochrous* M33 aam замену генов нитрилгидратазы на ген ациламидазы проводили таким образом, чтобы сохранить транскрипционное сопряжение репортёрного гена *aam* с геном *nhmG*. Ожидалось, что 3'-конец транскрипта, содержащий ген *nhmG*, можно будет использовать для отжига праймеров *nhmG-F* и *nhmG-R* при проведении RT-qPCR (Рисунок 3.16). Относительное количество специфической мРНК гена *nhmG* рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta CT}$  и выражали в условных единицах (у.е.). В качестве референсного гена для нормирования использовали ген гиразы *gyrB*, амплификацию которого проводили с праймеров *gyrB-M8-F* и *gyrB-M8-R*. Анализ относительного количества мРНК проводился для культур, находящихся в экспоненциальной фазе роста, для чего штаммы *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 aam выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 20 часов. Дополнительно в качестве контроля эффективности проведения анализа (выбранного специфического мРНК, референсного гена и праймеров) был проведен анализ штамма *R. rhodochrous* M8, выращенного в тех же условиях. Для каждого штамма количество специфической мРНК гена *nhmG* в клетках, выращенных в отсутствие ионов кобальта в среде, было принято за единицу.

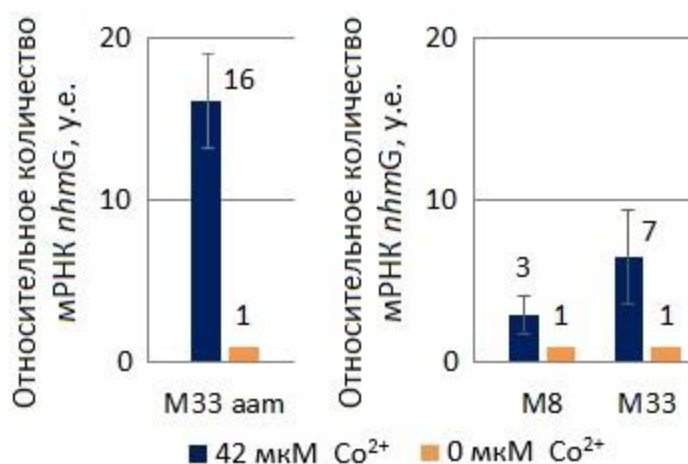


Рисунок 3.16 – RT-qPCR анализ индукции транскрипции в штаммах *R. rhodochrous* M33 aam, *R. rhodochrous* M8 и *R. rhodochrous* M33 в присутствии ионов кобальта. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 20 часов

Ферментативную активность клеток измеряли в динамике во время выращивания культур в жидкой среде MS при стандартных условиях (Рисунок 3.17). В клетках штамма *R. rhodochrous* M33 измеряли активность фермента нитрилгидратазы, *R. rhodochrous* M33 aam – ациламидазы. За 1 единицу нитрилгидратазной активности принимали такое количество фермента, которое требовалось для получения 1 мкМ АА за 1 минуту в расчете на 1 мг с.в.кл. при оптимальных условиях. Для расчета нитрилгидратазной активности клеток использовали формулу (2.3). Поскольку нитрилгидратаза является кобальт-зависимым ферментом, нитрилгидратазная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33, выращенного в отсутствие ионов кобальта в среде, не детектировалась (была ниже порогового значения в 1 ед.), что в свою очередь не позволяло оценить степень индуцибельности транскрипционной активности регуляторной области  $P_{nh569}$  в присутствии ионов кобальта в этом штамме. Замена нитрилгидратазы на репортёрный белок ациламидазу позволила измерить ферментативную активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 aam как в присутствии, так и в отсутствие ионов кобальта в среде. Степень индуцибельности в штамме *R. rhodochrous* M33 aam, измеренная с помощью ферментативной реакции ( $14 \pm 3$  раза), соответствовала результатам RT-qPCR анализа ( $16 \pm 3$  раза), полученным для экспоненциальной стадии роста культур (20 часов роста). Исходя из этого можно было заключить, что изменение ферментативной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 aam отражало изменение транскрипционной активности регуляторной области  $P_{nh569}$ . Максимальный уровень ферментативной активности клеток достигался в стационарной фазе роста культур (48 часов роста).

Количество растворенных целевых белков в клетках оценивали с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата

натрия (ДСН-ПААГ) (Рисунок 3.18). Для получения бесклеточных экстрактов использовали биомассу штаммов *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 аам, выращиваемых в жидкой среде в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в среде в течение 20 часов. В обоих штаммах видимые пятна, соответствовавшие весу целевых белков, наблюдались только при выращивании клеток в присутствии в среде ионов кобальта. Количество целевого белка в рекомбинантном штамме наблюдалось на высоком уровне, соответствовавшем штамму *R. rhodochrous* M33. Дополнительно количество белка оценивали в обоих штаммах, выращенных в присутствии в среде ионов кобальта, в стационарной фазе роста культуры на 48-ом часу роста, когда ферментативные активности клеток штаммов достигали максимальных значений.

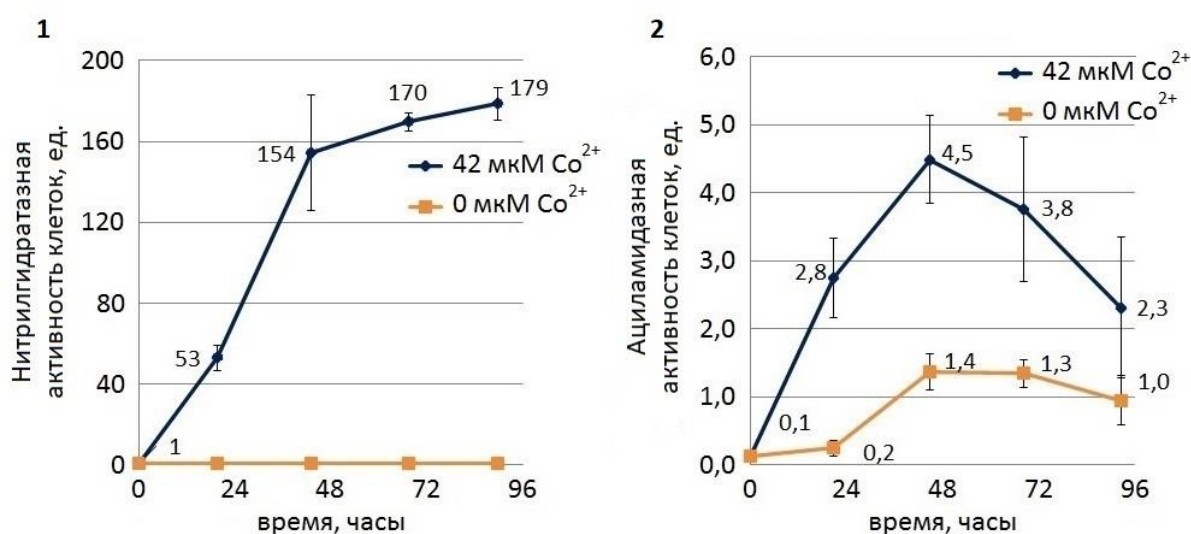


Рисунок 3.17 – Динамика нитрилгидратазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 (1) и ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 аам (2). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях

Проведенный анализ полученного штамма *R. rhodochrous* M33 аам показал, что замена генов нитрилгидратазы на ген ациламидазы не повлияла на функционирование изучаемой системы транскрипции. Индукция транскрипции ионами кобальта детектировалась, что подтверждалось результатами измерения количества целевого белка и ферментативной активности клеток. Результаты анализа относительного количества мРНК целевого транскрипта указывали на то, что регуляция экспрессии осуществлялась на стадии транскрипции, что соответствовало полученным данным для штамма *R. rhodochrous* M8. Количество белка ациламидазы в штамме *R. rhodochrous* M33 аам, соответствовало количеству белка нитрилгидратазы в исходном штамме *R. rhodochrous* M33.



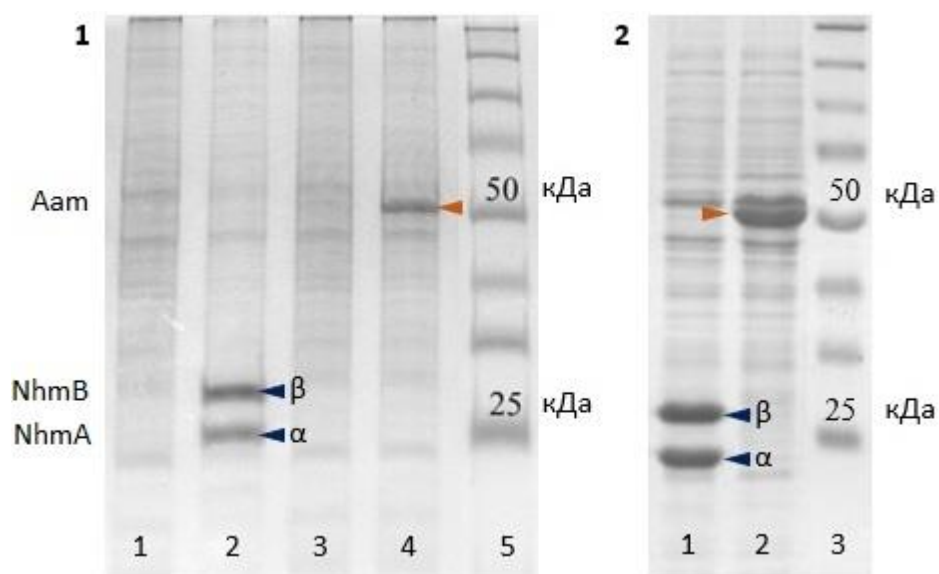


Рисунок 3.18 – Денатурирующий ДСН-ПААГ электрофорез внутриклеточных растворенных белков штаммов *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 aam. (1): логарифмическая фаза роста: штамм *R. rhodochrous* M33 (дорожки 1 и 2); штамм *R. rhodochrous* M33 aam (дорожки 3 и 4). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях, концентрация ионов кобальта составляла 0 мкМ (дорожки 1 и 3) и 42 мкМ (дорожки 2 и 4). Дорожка 5: маркер молекулярного веса. (2): стационарная фаза роста: штамм *R. rhodochrous* M33 (дорожка 1); штамм *R. rhodochrous* M33 aam (дорожка 2). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях, концентрация ионов кобальта составляла 42 мкМ. Дорожка 3: маркер молекулярного веса. Синими стрелками обозначены  $\beta$  и  $\alpha$  субъединицы белка нитрилгидратазы, оранжевой – белок ациламидазы, маркер – Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder

Использование репортёрного белка ациламидазы позволило детектировать ферментативную активность рекомбинантного штамма в отсутствие ионов кобальта в среде и использовать такое измерение для оценки транскрипционной активности регуляторной области  $P_{nh569}$ . С помощью такого подхода удалось выяснить, что в отсутствие ионов кобальта в среде в стандартных условиях регуляторная область  $P_{nh569}$  начинала проявлять транскрипционную активность в стационарной фазе роста культуры, уровень которой, однако, не достигал максимального уровня, детектируемого в присутствии ионов кобальта.

Таким образом, тест-система на основе фермента ациламидазы могла быть использована для изучения кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности регуляторной области  $P_{nh569}$  и для выявления генов, участвующих в этой регуляции.

Поскольку штамм *R. rhodochrous* M33 aam не содержал функциональных продуктов генов *nhmC* (полностью делетирован в исходном штамме *R. rhodochrous* M33) и *nhmD* (нарушен частичной делецией в исходном штамме *R. rhodochrous* M33), но демонстрировал изучаемую

кобальт-зависимую регуляцию транскрипции, был сделан вывод о том, что гены *nhmC* и *nhmD* не являются необходимыми элементами кобальт-зависимого механизма регуляции транскрипционной активности регуляторной области  $P_{nh569}$ .

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

#### *3.3.1. Исследование регуляторной области $P_{nh569}$*

3.3.1.1. Конструирование автономных плазмид серии pRY16-n с набором делеционных вариантов регуляторной области  $P_{nh569}$

Для проверки функционирования предполагаемых промоторов P1 и P2, содержащихся в составе участка  $P_{nh569}$ , был создан следующий ряд делеционных вариантов регуляторной области:  $P_{nh408}$ ,  $P_{nh235}$ ,  $P_{nh157}$ ,  $P_{nh31}$ ; цифры в названии вариантов соответствуют сохранённому количеству нуклеотидов регуляторной области с её 3'-конца. Полная регуляторная область длиной 569 п.н. была использована в качестве положительного контроля. Вариант  $P_{nh31}$ , включающий в себя последовательность Шайна-Дальгарно (SD), необходимую для синтеза белка Aam, не содержал боксов предполагаемых промоторов и использовался в качестве отрицательного контроля на протекание транскрипции (Рисунок 3.19).

Все исследуемые варианты регуляторной области использовали для экспрессии репортёрного белка ациламидазы. 3'-конец транскрипта, содержащий ген *nhmG*, оставили неизменным относительно штамма *R. rhodochrous* M33 aam; участок, содержащий предполагаемый ген-регулятор транскрипции *cblA*, также был сохранен. Таким образом предполагалось, что исследуемая кассета будет демонстрировать регуляцию транскрипции ионами кобальта, так как гены, предположительно осуществляющие эту регуляцию, были включены во все исследуемые варианты. Напротив, изменение длины регуляторной области и возможное исключение из ее состава сайтов посадки транскрипционного регулятора CblA, должно было привести к нарушению механизма регуляции транскрипции.

Экспрессионные кассеты были размещены на автономном бирепликонном векторе pRY16, способном к автономной репликации в клетках *Rhodococcus* и *E. coli* [135], созданном ранее в лаборатории №22 НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Данный плазмидный вектор был выбран из-за своей способности к конъюгативному переносу, обеспечивавшейся участком *oriT*, поскольку для штаммов *R. rhodochrous* в период приведения исследования не было разработано эффективной методики введения ДНК в клетки с помощью электропорации.



Для исключения возможности протекания транскрипции с вышерасположенных промоторов, входящих в состав плазмиды pRY16, перед целевым вариантом регуляторной области был помещен фрагмент ДНК, содержащий двойной терминатор транскрипции из бактериофага *fd* [161], обозначенный как 2Tfd. Терминатор *fd* ранее показал эффективность терминации равную 98,8 % при использовании в микроорганизмах, близкородственных *R. rhodochrous* – *Streptomyces* sp. [162] – и использовался для эффективного подавления экспрессии, вызванной протеканием транскрипции с вышерасположенных промоторов в штамме *R. rhodochrous* J1 [163]. Известно, что расположение двух терминаторов транскрипции из бактериофага *fd* один за другим увеличивало их эффективность [164], что также использовалось в данной работе.

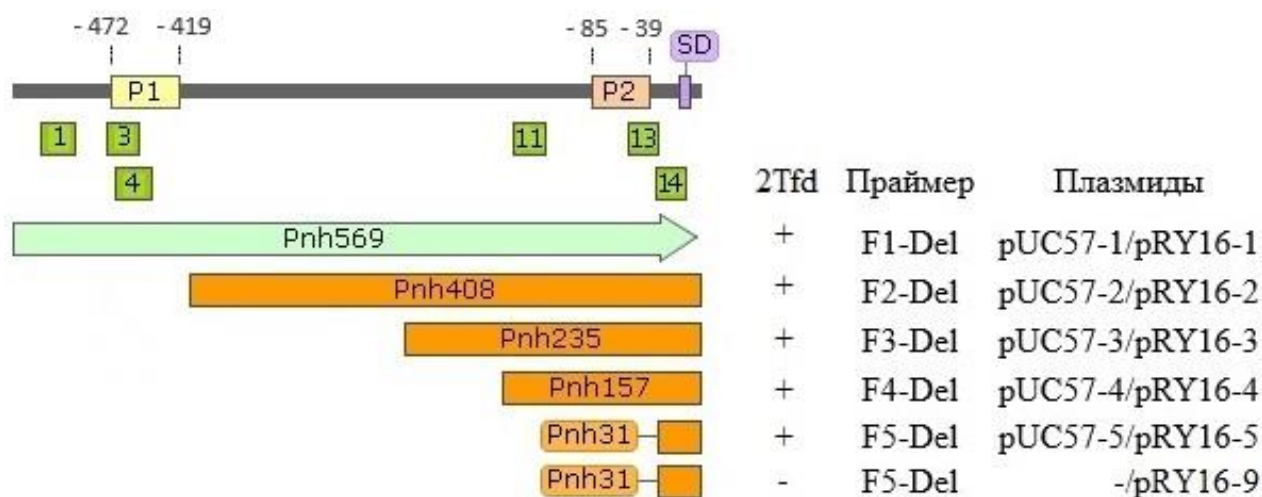


Рисунок 3.19 – Схема делеционных вариантов регуляторной области  $P_{nh569}$ , праймеры, используемые для их амплификации и плазмиды, содержащие данные делеционные варианты.

P1, P2 – предполагаемые промоторы; 1, 3, 4, 11, 13, 14 – несовершенные инвертированные повторы с четным количеством нуклеотидов между плечами палиндрома; SD – последовательность Шайна-Дальгарно

Соединение фрагментов 2Tfd и экспрессионных кассет  $P_{nhN}$ -*aam-nhmG-cblA* проводили с помощью клонирования в вектор pUC57 (Рисунок 3.20). Фрагмент 2Tfd нарабатывали ПЦР амплификацией с ДНК плазмиды pM17, предоставленной профессором Машко С.В. (АО «АГРИ»), с помощью праймеров For-2Tfd и Rev-2Tfd. Праймер For-2Tfd содержал в своем составе сайт рестрикции *Bam*HI, который использовали для клонирования фрагмента в вектор pUC57, рестрицированный по сайтам *Bam*HI и *Eco*RV, для получения плазмиды pUC57-2Tfd. Фрагменты  $P_{nh569}$ -*aam-nhmG-cblA*,  $P_{nh408}$ -*aam-nhmG-cblA*,  $P_{nh235}$ -*aam-nhmG-cblA*,  $P_{nh157}$ -*aam-nhmG-cblA* и  $P_{nh31}$ -*aam-nhmG-cblA* амплифицировали с хромосомной ДНК штамма

*R. rhodochrous* M33 аам с помощью праймеров F1-Del, F2-Del, F3-Del, F4-Del, F5-Del и R1-Del соответственно, внося в составе праймера R1-Del сайт рестрикции *EcoRI*. После этого фрагменты клонировали в плазмиду pUC57-2Tfd, рестрицированную по сайтам *Bsp68I* и *EcoRI*, с получением плазмид серии pUC57-n, где n равно числам от 1 до 5 соответственно.

Затем фрагменты 2Tfd-P<sub>nhN</sub>-*aam-nhmG-cblA* амплифицировали с плазмидной ДНК pUC57-n с помощью праймеров For-2Tfd и R1-Del и клонировали в вектор pRY16, из которого предварительно по сайтам рестрикции *EcoRI* и *EcoRV* вырезали фрагмент, содержащий гены нитрилгидратазы *nhmBA*. Полученную серию плазмид назвали pRY16-n, где n равно числам от 1 до 5 соответственно (Рисунок 3.20).

Для проверки терминирующей способности фрагмента 2Tfd дополнительно была сконструирована плазида pRY16-9, содержащая кассету, аналогичную плазмиде pRY16-5, за исключением отсутствия перед областью P<sub>nh31</sub> фрагмента 2Tfd (Рисунок 3.21). Для этого фрагмент P<sub>nh31</sub>-*aam-nhmG-cblA* амплифицировали с хромосомной ДНК штамма *R. rhodochrous* M33 аам с помощью праймеров F5-Del и R1-Del, внося в составе праймера R1-Del сайт рестрикции *EcoRI*. Полученный фрагмент клонировали в вектор pRY16, из которого предварительно по сайтам рестрикции *EcoRI* и *EcoRV* вырезали фрагмент, содержащий гены нитрилгидратазы *nhmBA*. Полученную плазмиду назвали pRY16-9.

3.3.1.2. Введение плазмид pRY16-n в штамм *R. rhodochrous* M50. Локализация функционального промотора внутри регуляторной области P<sub>nh569</sub>

Плазмиды серии pRY16-n ввели в штамм *R. rhodochrous* M50, полученный ранее в лаборатории №22 НИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Данный штамм, являющийся производным от штамма *R. rhodochrous* M33, был получен с помощью мутагенеза, в ходе которого произошла делеция, захватывающая оперон генов нитрилгидратазы *nhmBAG*, ген предполагаемого транскрипционного регулятора *cblA*, а также гены *nhmC* и *nhmD* (Раздел 1.3). Перенос плазмид проводили с помощью метода конъюгации. Полученные штаммы назвали *R. rhodochrous* M50 pRY16-n соответственно.

Штаммы *R. rhodochrous* M50 pRY16-n выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в среде в течение 96 часов. Оказалось, что ни один из штаммов с укороченным вариантом регуляторной области не проявлял ациламидазную активность (активность клеток не детектировались, будучи менее порогового значения измерений 0,01 ед.) (Таблица 3.10). При этом контрольный штамм *R. rhodochrous* M50 pRY16-9 демонстрировал минимальные значения активности, незначительно превышавшие пороговое значение измерений 0,01 ед., что означало незначительное протекание транскрипции с вышерасположенных промоторов.

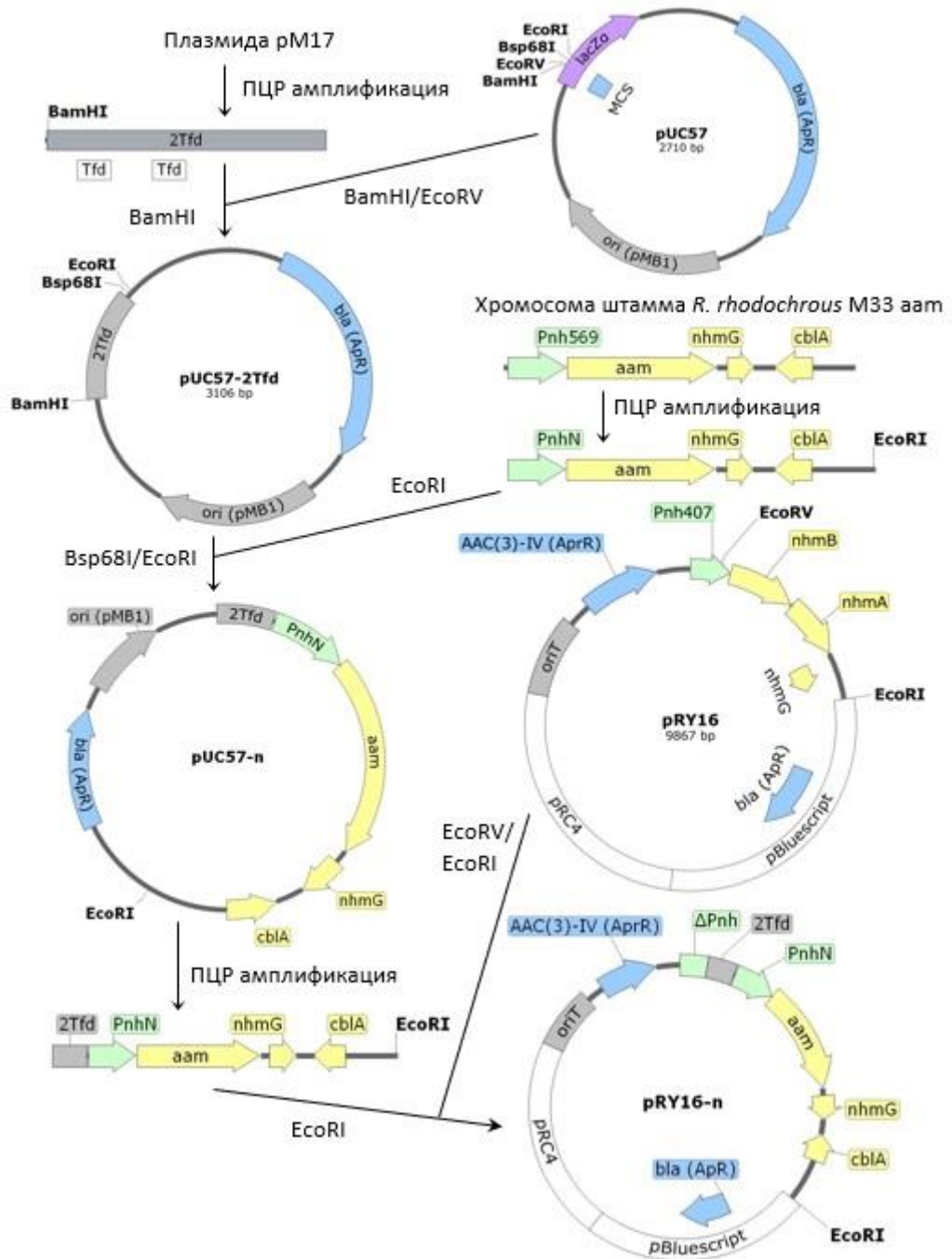


Рисунок 3.20 – Схема конструирования векторов серии pRY16-n. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *EcoRI*, *Bsp68I*, *EcoRV*, *BamHI*; P<sub>nhN</sub> обозначает фрагменты P<sub>nh569</sub>, P<sub>nh408</sub>, P<sub>nh235</sub>, P<sub>nh157</sub>, P<sub>nh31</sub> в зависимости от номера плазмиды n (n от 1 до 5 соответственно); расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов



как и особенностями штамма *R. rhodochrous* M50, так и расположением целевого гена не в хромосоме штамма хозяина, а в составе автономной плазмиды.

Отсутствие ациламидазной активности у штаммов с делеционными вариантами регуляторной области позволило сделать вывод о том, что для инициации транскрипции требовался регион ДНК, содержащий промотор P1.

3.3.1.3. Конструирование штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh190</sub>-aam с сокращенным вариантом регуляторной области P<sub>nh190</sub>

Для искусственно сконструированных экспрессионных систем удобнее использовать регуляторные области минимальной длины, была предпринята попытка выявить минимальную длину регуляторной области P<sub>nh</sub>, позволяющую достичь максимального уровня экспрессии гена и при этом сохранить способность к регуляции транскрипции ионами кобальта.

В качестве такого сокращенного варианта был выбран регион длиной 165 п.н., 5'-конец которого соответствовал 5'-концу области P<sub>nh569</sub>. Для сохранения эффективности инициации трансляции был также сохранен участок длиной 25 п.н., примыкающий к старт-кодону и содержащий последовательность сайта SD (Рисунок 3.22). Сшитый таким образом фрагмент назвали P<sub>nh190</sub>.

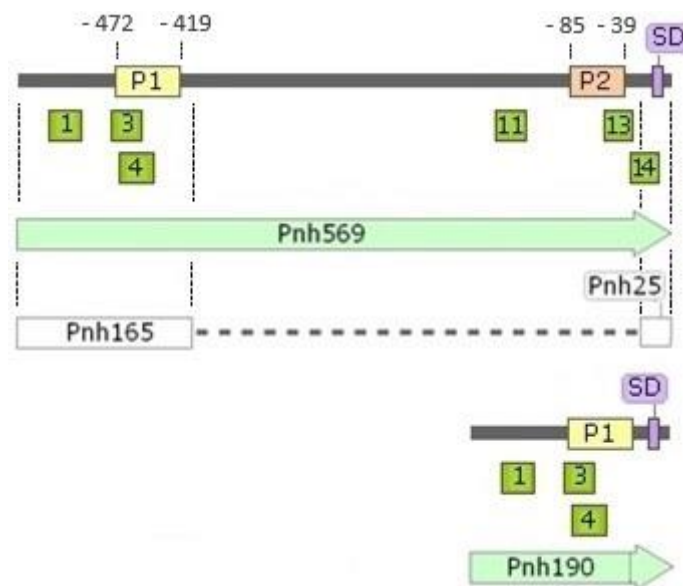


Рисунок 3.22 – Схема сокращенного варианта регуляторной области P<sub>nh190</sub>. P<sub>nh165</sub>, P<sub>nh25</sub> – участки регуляторной области P<sub>nh569</sub> длиной 165 п.н и 25 п.н. соответственно; P1, P2 – предполагаемые промоторы; 1, 3, 4, 11, 13, 14 – несовершенные инвертированные повторы с четным количеством нуклеотидов между плечами палиндрома; SD – последовательность Шайна-

Дальгарно

Для стабилизации экспрессии кассету  $P_{nh190}$ -*aam*-*nhmG*-*cblA* решили разместить не на автономной плазмиде, а интегрировать в хромосому штамма хозяина. Для этого использовали метод гомологичной рекомбинации, который позволил заменить исходную регуляторную область  $P_{nh569}$  в штамме *R. rhodochrous* M33 *aam* на её сокращенный вариант  $P_{nh190}$  (Рисунок 3.23). В качестве плеча для рекомбинации использовали фрагмент гена *aam* длиной 509 п.н. Выщепления тела плазмиды из состава хромосомы не проводили, полученный штамм назвали *R. rhodochrous* M33  $P_{nh190}$ -*aam*. В качестве контроля был создан изогенный штамм *R. rhodochrous* M33  $P_{nh569}$ -*aam*, также содержащий тело плазмиды перед исследуемой кассетой.

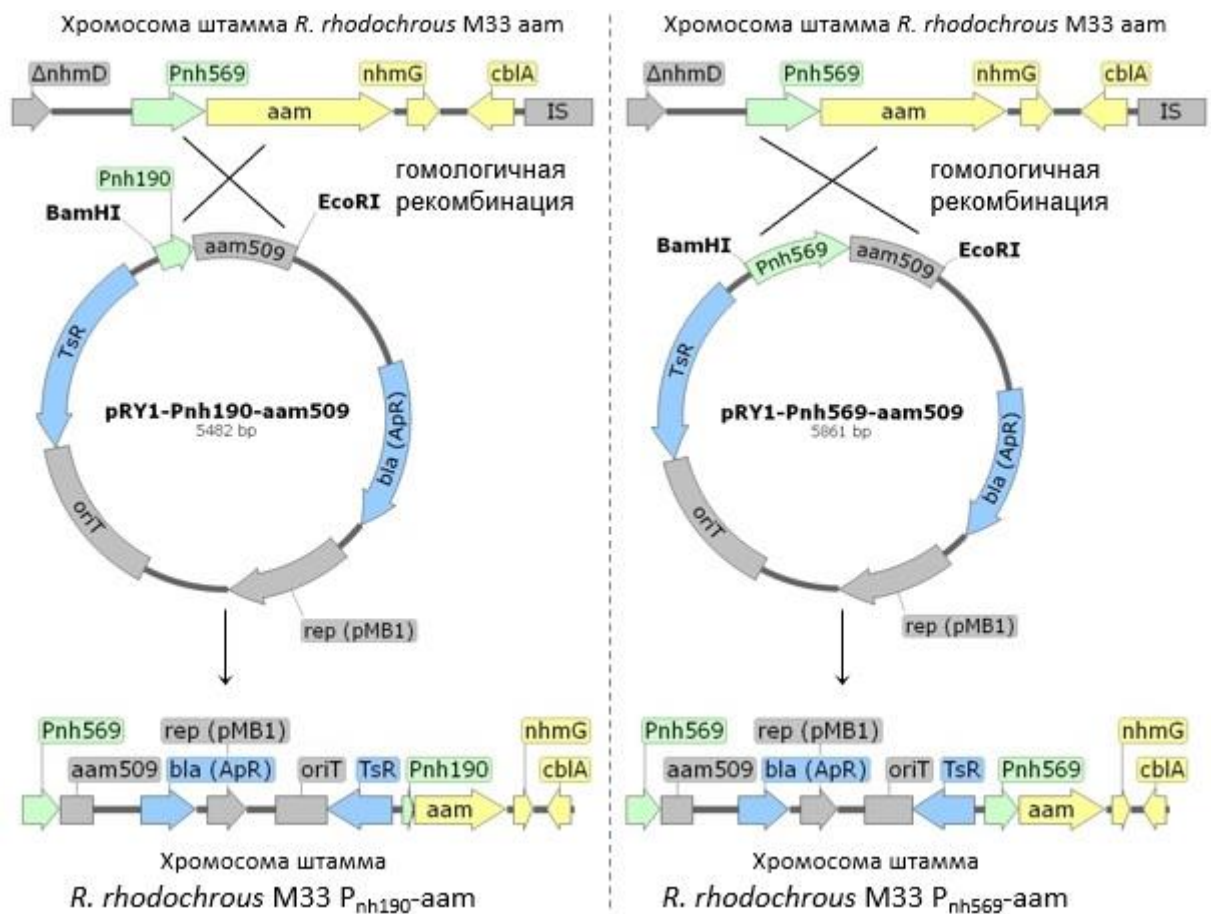


Рисунок 3.23 – Схема конструирования штаммов *R. rhodochrous* M33  $P_{nh190}$ -*aam* (слева) и *R. rhodochrous* M33  $P_{nh569}$ -*aam* (справа). Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

Схема получения векторов  $pRY1$ - $P_{nh190}$ -*aam* и  $pRY1$ - $P_{nh569}$ -*aam* представлена на Рисунке 3.24. Фрагменты  $P_{nh165}$ , *aam*<sub>509</sub> и  $P_{nh569}$ -*aam*<sub>509</sub>, нарабатывали ПЦР амплификацией с хромосомы штамма *R. rhodochrous* M33 *aam* с помощью следующих пар праймеров: ForPng и Rev-*aam*Png, For-Png*aam* и Rev, ForPng и Rev. Фрагменты  $P_{nh165}$  и *aam*<sub>509</sub> имели область перекрытия длиной 40 п.н., которая использовалась для проведения ПЦР объединения и



получения фрагмента P<sub>nh190</sub>-aam<sub>509</sub>. Фрагменты P<sub>nh569</sub>-aam<sub>509</sub> и P<sub>nh190</sub>-aam<sub>509</sub> клонировали в вектор pRY1 по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Eco*RI с получением векторов pRY1-P<sub>nh569</sub>-aam<sub>509</sub> и pRY1-P<sub>nh190</sub>-aam<sub>509</sub> соответственно.

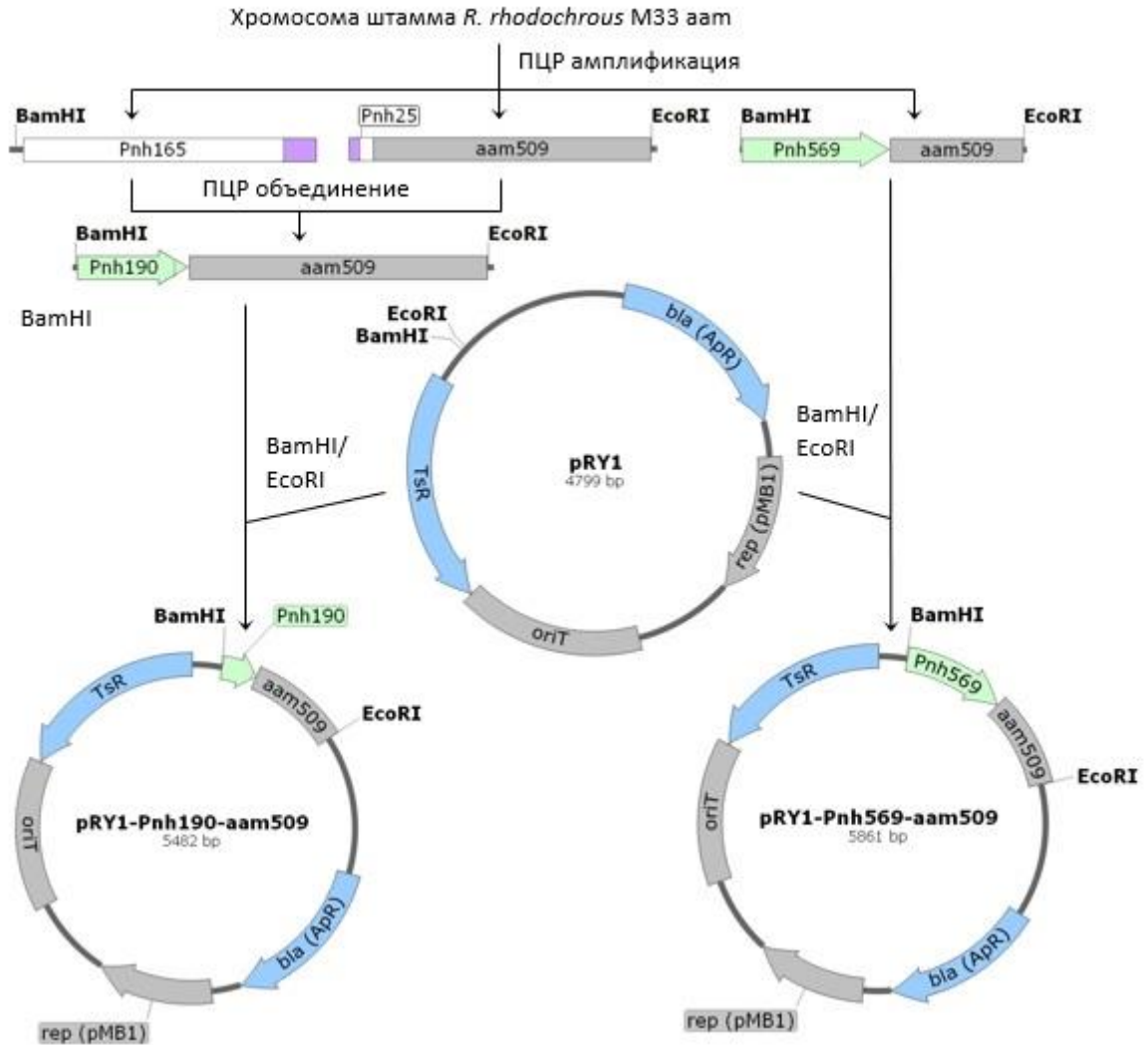


Рисунок 3.24 – Схема конструирования векторов pRY1-P<sub>nh569</sub>-aam<sub>509</sub> и pRY1-P<sub>nh190</sub>-aam<sub>509</sub>. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *Eco*RI, *Bam*HI; фиолетовым цветом показана область перекрытия для ПЦР объединения фрагментов; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

#### 3.3.1.4. Изучение функционирования сокращенного варианта регуляторной области P<sub>nh190</sub>

Изогенные штаммы с полным и сокращенным вариантами регуляторной области выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в присутствии и в отсутствие ионов кобальта (Рисунок 3.25). Оба штамма демонстрировали способность к индукции ациламидазной активности ионами кобальта, при этом активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh190</sub>-aam оказалась значительно ниже, чем у контрольного штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam. Таким

образом можно было сделать вывод о том, что регион P1 действительно обладал транскрипционной активностью и был необходим для осуществления регуляции транскрипции ионами кобальта. Этот вывод согласуется с распространенным в бактериях механизмом регуляции транскрипции, при котором места посадки регуляторных белков (ТФ) перекрываются с боксами -35 и -10 (Раздел 1.4). При этом сокращенного варианта регуляторной области  $P_{nh190}$  оказалось недостаточно для достижения уровня активности контрольного штамма, что указывало на возможную роль 5'-нетранслируемой области мРНК, которая была делетирована в варианте  $P_{nh190}$ .

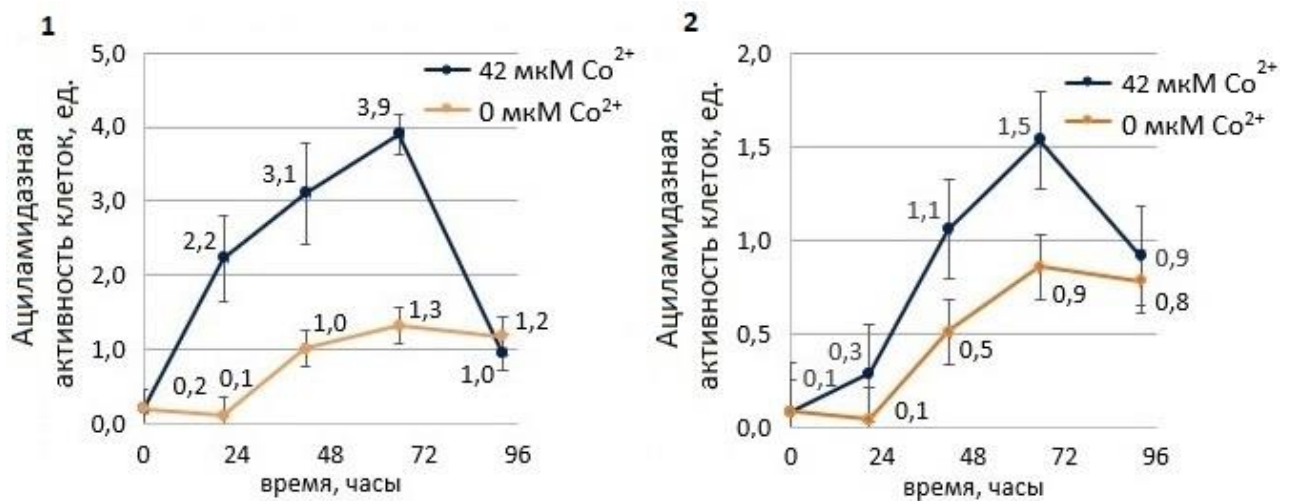


Рисунок 3.25 – Динамика ациламидазной активности клеток штаммов *R. rhodochrous* M33  $P_{nh569}$ -аам (1) и *R. rhodochrous* M33  $P_{nh190}$ -аам (2). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях

Причиной снижения ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33  $P_{nh190}$ -аам по сравнению со штаммом *R. rhodochrous* M33  $P_{nh569}$ -аам могла быть сниженная эффективность инициации трансляции ациламидазы, вызванная нарушением структуры RBS, так как правая граница делеции области [-404; -26] располагалась рядом с этим сайтом. Для проверки этого предположения были оценены уровни транскрипционной активности регуляторных областей  $P_{nh569}$  и  $P_{nh190}$  в соответствующих штаммах с помощью RT-qPCR (Рисунок 3.26 и Таблица 3.11). Исследуемые штаммы выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течение 20 часов. Количество специфической мРНК гена *nhmG* в клетках штамма *R. rhodochrous* M33  $P_{nh569}$ -аам, выращенных в отсутствие ионов кобальта в среде было принято за единицу.

Оказалось, что в присутствии ионов кобальта в среде уровни транскрипционной активности штаммов различались на порядок ( $28,0 \pm 1,5$  и  $2,8 \pm 0,1$  у.е., соответственно). Ациламидазные



активности клеток штаммов в этих условиях различались также на порядок ( $2,23 \pm 0,57$  и  $0,29 \pm 0,03$  ед., соответственно), что указывало на ненарушенную эффективность инициации трансляции белка ациламидазы в штамме *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh190</sub>-aam. Это заключение подтверждалось также при сравнении уровней транскрипционной активности и ациламидазной активности клеток штаммов при выращивании культур в отсутствие ионов кобальта.

Известно, что помимо связывания с рибосомой и инициации трансляции, 5'-нетранслируемая область мРНК может содержать вторичные структуры, влияющие на стабильность молекулы мРНК. Делеция в этой области могла снизить стабильность мРНК, что выражалось в уменьшении количества целевой мРНК, видимом при RT-qPCR анализе, и приводило к уменьшению количества синтезируемого белка и ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh190</sub>-aam. Согласно данным биоинформатического анализа 5'-нетранслируемая область действительно могла содержать вторичные структуры (шпильки H1 и H2, показаны на Рисунке 3.10 и Рисунке 3.11), которые были удалены в варианте P<sub>nh190</sub>, однако стабильность молекул мРНК в данной работе не проверялась.

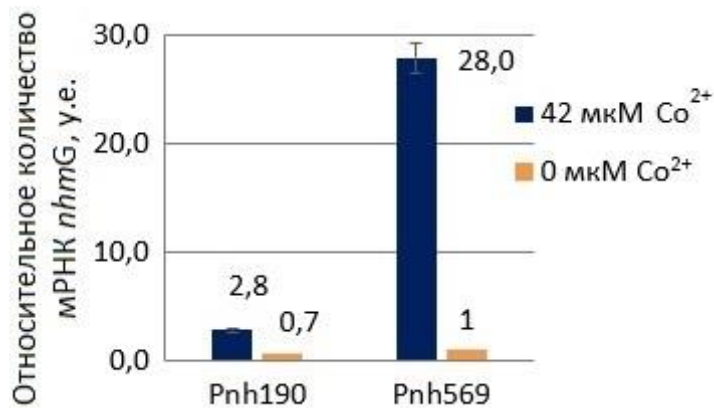


Рисунок 3.26 – RT-qPCR анализ индукции транскрипции в штаммах *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh190</sub>-aam и *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam в присутствии ионов кобальта. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 20 часов

Таблица 3.11 – Сравнение транскрипционной активности регуляторных областей P<sub>nh190</sub> и P<sub>nh569</sub>

Штамм	Ациламидазная активность клеток, ед.		Относительное количество мРНК <i>nhmG</i> , у.е.	
	42 мкМ Co <sup>2+</sup>	0 мкМ Co <sup>2+</sup>	42 мкМ Co <sup>2+</sup>	0 мкМ Co <sup>2+</sup>
<i>R. rhodochrous</i> M33 P <sub>nh190</sub> -aam	$0,29 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,01$	$2,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
<i>R. rhodochrous</i> M33 P <sub>nh569</sub> -aam	$2,23 \pm 0,57$	$0,12 \pm 0,07$	$28,0 \pm 1,5$	1

Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что укороченный вариант регуляторной области  $P_{nh190}$  может быть использован при конструировании штаммов родококков для минимизации целевой кассеты, однако он не подходит для создания штаммов с максимальной ферментативной активностью.

3.3.1.5. Схема регуляторной области  $P_{nh569}$  с локализованными функциональными участками

Полученные экспериментальные результаты позволили локализовать функционально значимые участки регуляторной области  $P_{nh569}$  (Рисунок 3.27). Из двух предсказанных промоторов P1 и P2 транскрипционной активностью обладал участок P1, в то время как участок P2 не проявил транскрипционную активность в изучаемых условиях. Минимизация длины регуляторной области с удалением участка P2 и близлежащей последовательности ДНК позволила получить сокращенную регуляторную область  $P_{nh190}$  длиной 190 п.н., которая сохранила индуцибельный характер транскрипции (область  $P_{nh190}$  выделена зелеными областями на Рисунке 3.27). Таким образом область, ответственная за индукцию транскрипции ионами кобальта, была расположена также в составе участка  $P_{190}$ . 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] ( $P_{165}$ ).

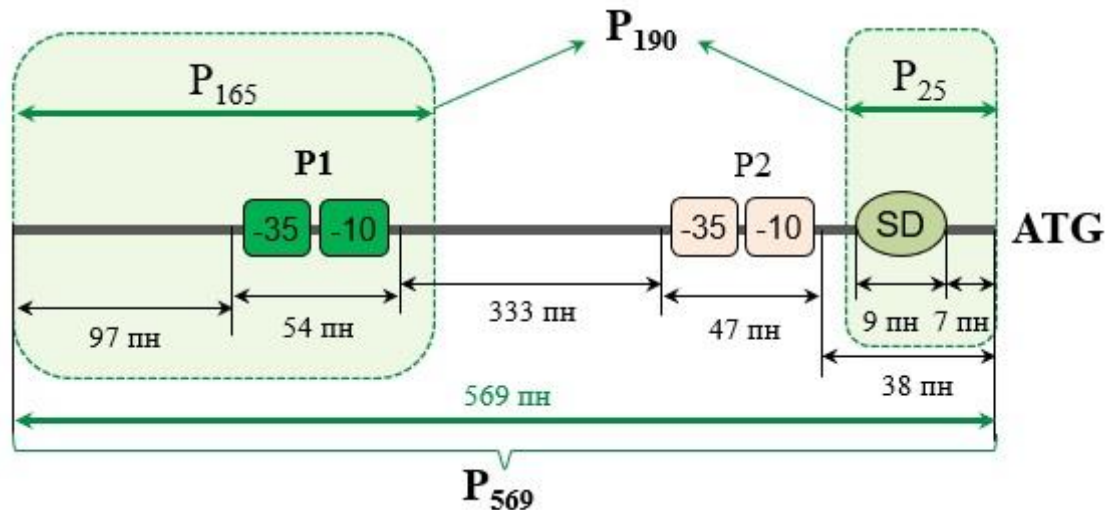


Рисунок 3.27 – Схема расположения функциональных участков в составе регуляторных областей  $P_{nh569}$  и  $P_{nh190}$ . P1 – функциональный промотор, P2 – нефункциональный предсказанный промотор; -35, -10 – предсказанные сайты посадки  $\sigma^{70}$  фактора РНК-полимеразы; SD – последовательность Шайна-Дальгарно

Внутренняя делеция в регуляторной области привела к изменениям в 5'-нетранслируемой области мРНК и снижению уровня экспрессии целевого гена, что указывало на значительную

роль внутреннего участка регуляторной области с координатами [-404; -26]. Для достижения максимального уровня экспрессии при конструировании штаммов продуцентов необходимо использовать полную регуляторную область  $P_{nh569}$  длиной 569 п.н.

### 3.3.2. Изучение роли генов *nhmG* и *cblA* в кобальт-зависимой регуляции транскрипции

#### 3.3.2.1. Конструирование штамма *R. rhodochrous* M33 del с делецией кластера генов *aam-cblA*

Для повышения стабильности экспрессии при изучении различных экспрессионных кассет было принято решение отказаться от использования автономных плазмид и интегрировать изучаемые кассеты в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 aam. Штамм M50 не подходил для этой задачи, так как в процессе его получения в хромосоме происходили протяженные делеции, которые могли повлиять на различные свойства клеток.

Кластер генов *aam-nhmG-cblA* в хромосоме штамма *R. rhodochrous* M33 aam делетировали с помощью двух кроссов гомологичной рекомбинации с получением штамма *R. rhodochrous* M33 del (Рисунок 3.28 и Рисунок 3.29).

Хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 aam использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР-амплификации плечей для рекомбинации UP и IS с помощью праймеров ForE, RevE и ForIS, RevIS соответственно (Рисунок 3.28). Амплифицированные фрагменты UP и IS имели область перекрывания длиной 20 п.н., которую использовали для проведения ПЦР-объединения для получения фрагмента UP-IS. Фрагмент UP-IS был клонирован в интеграционный вектор pRY1 по сайтам рестрикции *BamHI* и *EcoRI*, введенными праймерами ForE и RevIS, с получением плазмиды pRY1-UP-IS.

Плазмиду pRY1-UP-IS ввели в штамм *R. rhodochrous* M33 aam при помощи конъюгативного переноса. Интеграция плазмиды в хромосому хозяина могла происходить двумя способами – по UP или IS плечу, оба варианта показаны на Рисунке 3.29. После проведения первого кросса рекомбинации было получено 3 клон *R. rhodochrous* M33 del I, в которых рекомбинация прошла по плечу UP. После проведения второго кросса был получен 1 клон *R. rhodochrous* M33 del с делецией экспрессионной кассеты  $P_{nh569}$ -*aam-nhmG-cblA*. Оказалось, что при выщеплении тела плазмиды из хромосомы произошла делеция длиной 1352 п.н., захватившая плечо UP и фрагмент ДНК перед ним. В этой области не было предсказано функционирующих ORF, поэтому было принято решение использовать полученный клон в дальнейшей работе. Ациламидазная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 del, выращенного в стандартных условиях, не детектировалась, будучи менее порогового значения измерений 0,01 ед., как в присутствии, так и в отсутствие ионов кобальта в среде.

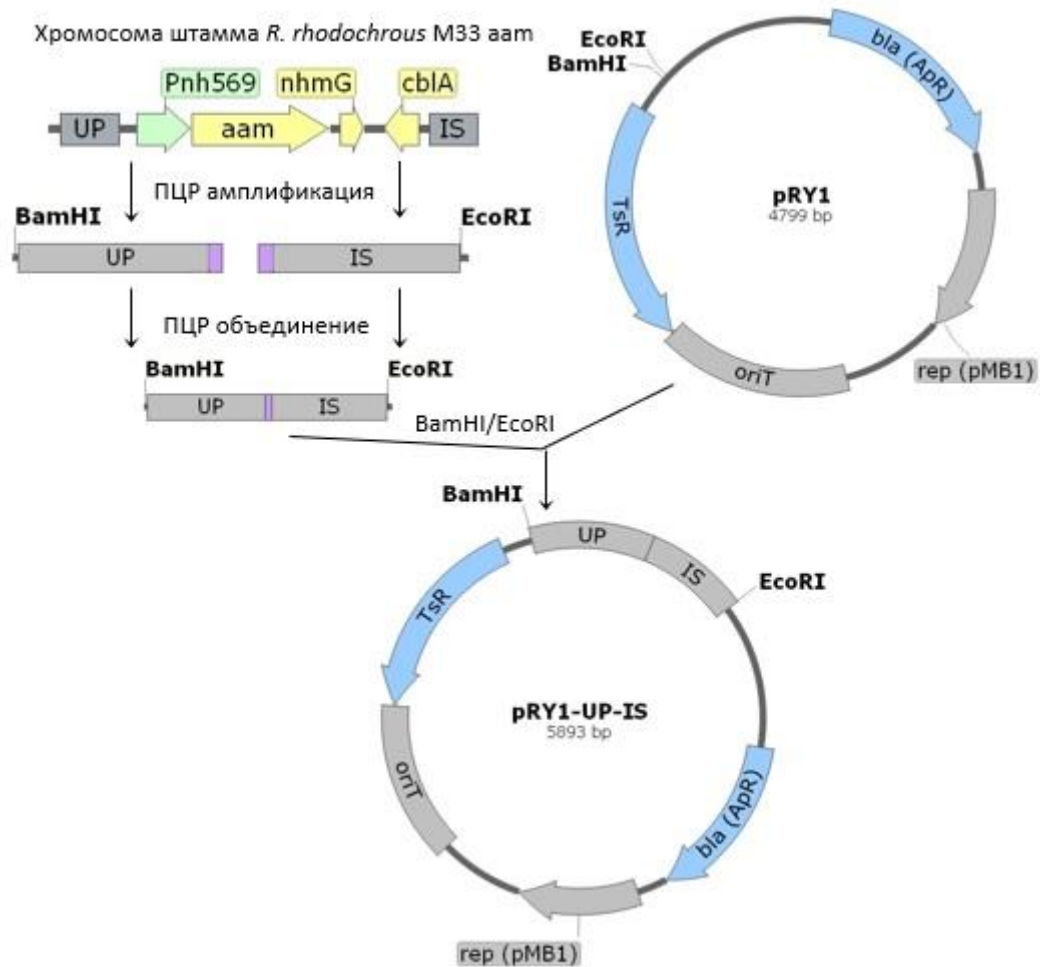


Рисунок 3.28 – Схема конструирования плазмидного вектора pRY1-UP-IS. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *BamHI* и *EcoRI*; участок для ПЦР-объединения фрагментов показан фиолетовым цветом; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

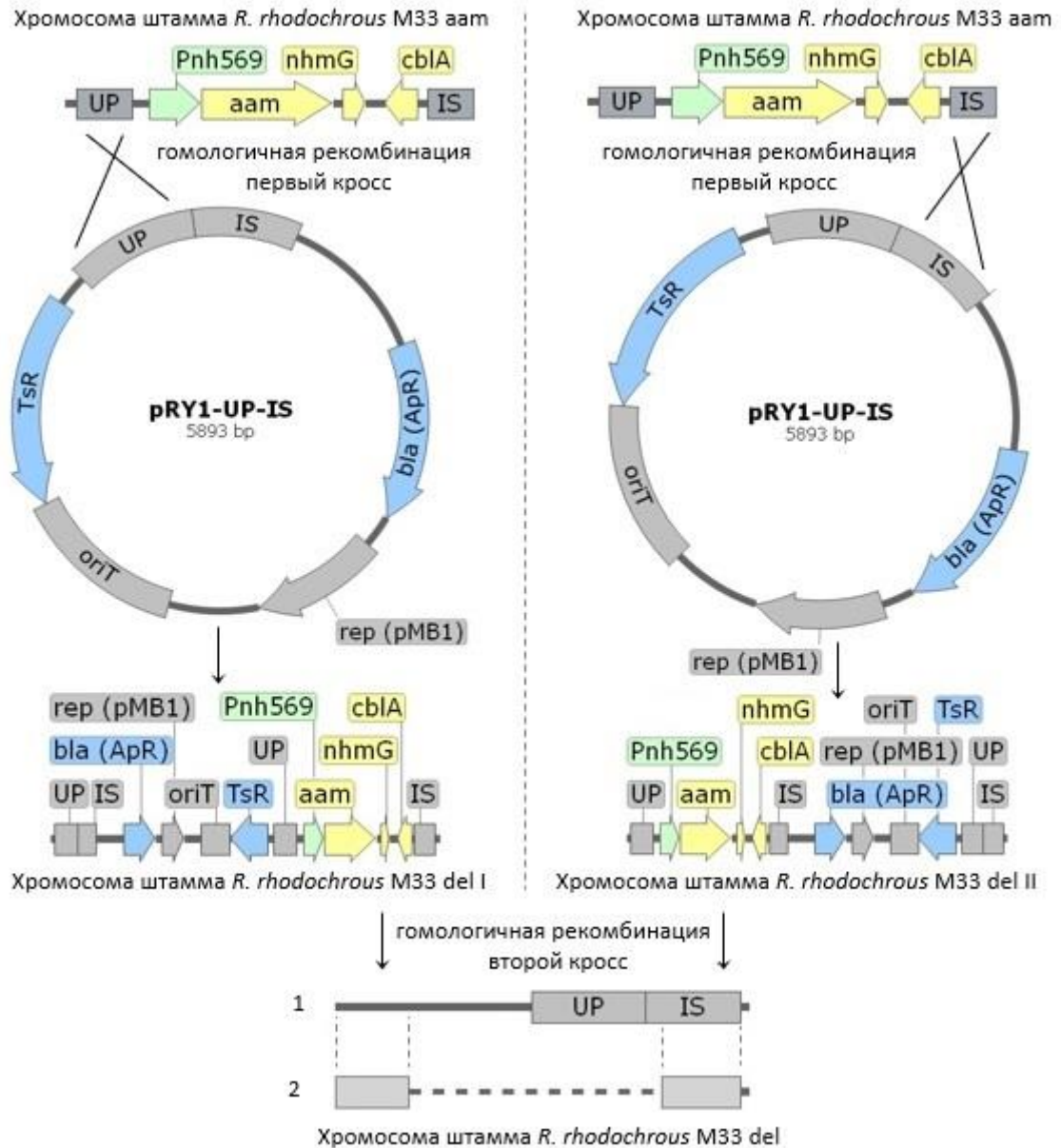


Рисунок 3.29 – Схема конструирования штамма *R. rhodochrous* M33 del. Слева: рекомбинация по UP-плечу; справа: рекомбинация по IS-плечу; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов. (1): ожидаемая структура хромосомы штамма *R. rhodochrous* M33 del; (2): структура полученного штамма *R. rhodochrous* M33 del, где пунктирной линией обозначена делеция длиной 1352 п.н.

### 3.3.2.2. Конструирование интеграционных плазмид pRY1-m с вариантами кластера P<sub>nh569</sub>-aam-nhmG-cblA, лишенными генов nhmG и cblA

Согласно результатам биоинформатического анализа, продукт гена *nhmG* являлся белком металло-шапероном, необходимым для правильного фолдинга фермента нитрилгидратазы и включения ионов кобальта в активный центр этого металло-фермента, поэтому предполагалось,

что он не влияет на функционирование кобальт-зависимой регуляции транскрипции гена *aam*. Продукт гена *cblA* предположительно являлся металло-регулятором транскрипции.

Для проверки этих предположений в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 del были введены следующие варианты изучаемого кластера: P<sub>nh569</sub>-*aam-nhmG-cblA* (контрольный, аналог pRY16-1), P<sub>nh569</sub>-*aam-nhmG* и P<sub>nh569</sub>-*aam-cblA* (Таблица 3.12). Дополнительно была сконструирована кассета P<sub>nh569</sub>-*aam-STOP-nhmG*, которая позволяла сохранить 3'-конец целевой мРНК таким же, как в конструкции P<sub>nh569</sub>-*aam-nhmG*, но при этом синтеза белка NhmG не происходило. Для этого первые шесть нуклеотидов гена *nhmG* были изменены с ATGAGT (старт-кодона) на TAGTGA (стоп-кодона, обозначены как участок STOP). Схема создания плазмид показана на Рисунке 3.30.

ДНК плазмиды pRY16-1 использовали в качестве матрицы для ПЦР амплификации фрагментов 2Tfd-P<sub>nh569</sub>-*aam-nhmG-cblA*, 2Tfd-P<sub>nh569</sub>-*aam-nhmG*, 2Tfd-P<sub>nh569</sub>-*aam*, 2Tfd-P<sub>nh569</sub>-*aam-STOP*, *STOP-nhmG* и *cblA* с помощью следующих пар праймеров: For-2Tfd и R1-Del, For-2Tfd и R2-Del, For-2Tfd и R4-Del, For-2Tfd и Rev-ST, For-ST и R2-Del, ArsR-ass-2 и R1-Del. Фрагменты 2Tfd-P<sub>nh569</sub>-*aam* и *cblA* были сконструированы таким образом, что содержали область перекрытия длиной 20 п.н., которая использовалась для проведения ПЦР объединения и получения фрагмента 2Tfd-P<sub>nh569</sub>-*aam-cblA*. Фрагмент 2Tfd-P<sub>nh569</sub>-*aam-STOP-nhmG* получали ПЦР объединением аналогичным образом из фрагментов 2Tfd-P<sub>nh569</sub>-*aam-STOP* и *STOP-nhmG*.

ДНК хромосомы штамма *R. rhodochrous* M33 del использовали в качестве матрицы для ПЦР амплификации фрагмента Int с помощью праймеров ForInt и RevInt. Данный фрагмент был выбран как плечо для дальнейшей гомологичной рекомбинации в штамм *R. rhodochrous* M33 del. Место для интеграции соответствовало области делеции кластера *aam-cblA* для того, чтобы избежать возможных эффектов от расположения экспрессионной кассеты в другом регионе хромосомы. Праймер ForInt использовался для внесения сайта рестрикции *KpnI*. Праймер RevInt содержал в своем составе область длиной 20 п.н., которую затем использовали для ПЦР объединения с фрагментами экспрессионной кассеты.

Объединенные фрагменты клонировали в плазмидный вектор pRY1 по сайтам рестрикции *KpnI* и *EcoRI* с получением плазмид серии pRY1-m, где m обозначает номера плазмид 1, 6, 6,5 и 8 (Таблица 3.12).



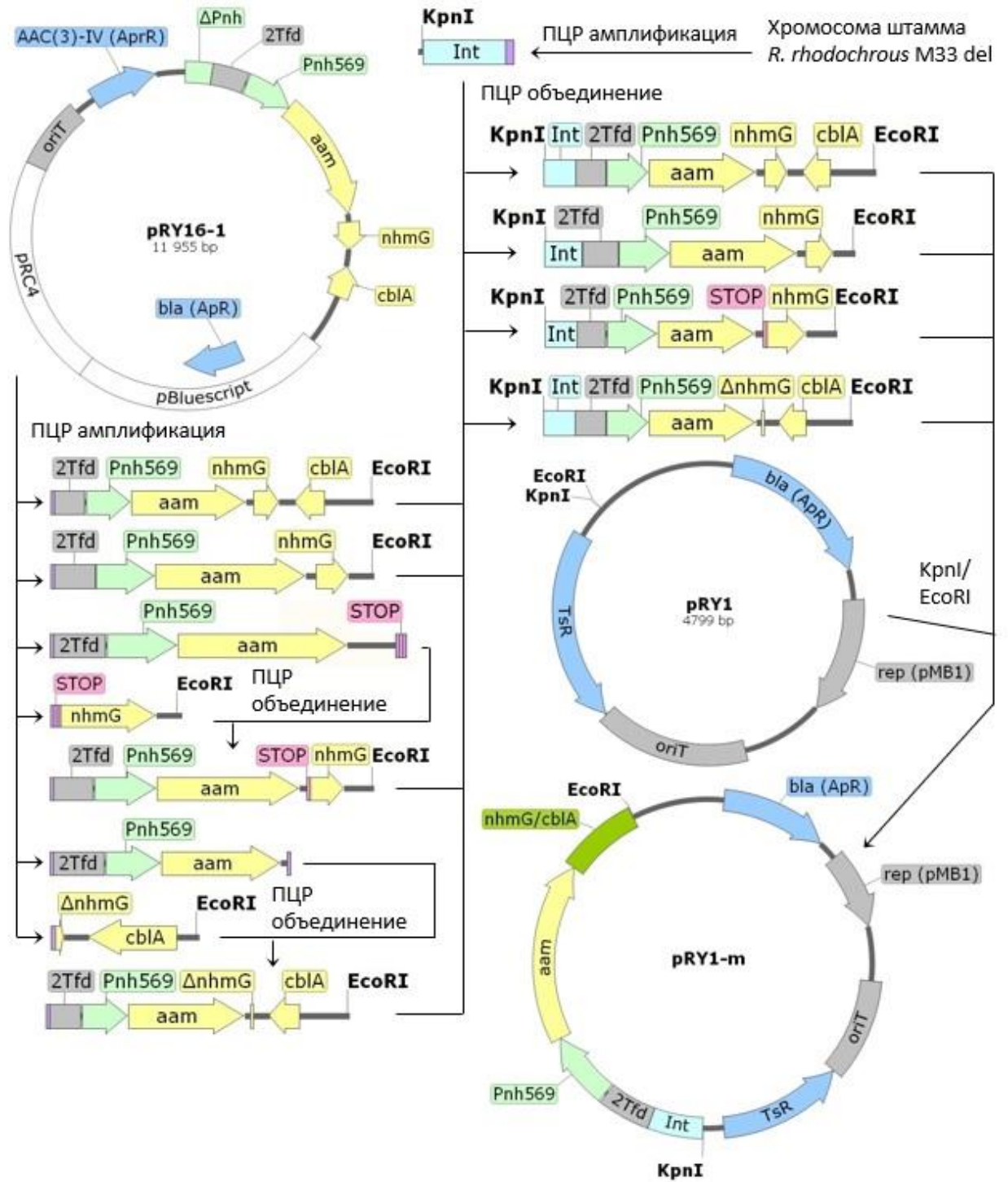


Рисунок 3.30 – Схема конструирования векторов серии pRY1-m. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *KpnI* и *EcoRI*; участки для ПЦР-объединения фрагментов показаны фиолетовым цветом; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

Таблица 3.12 – Интеграционные плазмиды серии pRY1-m

Экспрессионная кассета	Интеграционная плаزمида
2Tfd-P <sub>nh569</sub> - <i>aam-nhmG-cblA</i>	pRY1-1
2Tfd-P <sub>nh569</sub> - <i>aam-nhmG</i>	pRY1-6
2Tfd-P <sub>nh569</sub> - <i>aam-STOP-nhmG</i>	pRY1-6,5
2Tfd-P <sub>nh569</sub> - <i>aam-cblA</i>	pRY1-8

3.3.2.3. Конструирование штаммов *R. rhodochrous* del pRY1-m с вариантами кластера P<sub>nh569</sub>-*aam-nhmG-cblA*, лишенными генов *nhmG* и *cblA*, и изучение регуляции транскрипционной активности регуляторной области P<sub>nh569</sub> в этих штаммах

Интеграционные плазмиды серии pRY1-m ввели в штамм *R. rhodochrous* M33 del с помощью конъюгативного переноса. Селекцию клонов проводили после первого кросса гомологичной рекомбинации, так как конструкция векторов не предусматривала проведения второго кросса и выщепления тела плазмиды из состава хромосомы. Таким образом были получены штаммы *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1, *R. rhodochrous* M33 del pRY1-6, *R. rhodochrous* M33 del pRY1-6,5 и *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8 (Рисунок 3.31).

Штаммы *R. rhodochrous* M33 del pRY1-m выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в среде в течение 96 часов. Результаты измерения ациламидазной активности клеток штаммов представлены на Рисунке 3.32.

Индукция ациламидазной активности ионами кобальта наблюдалась в контрольном штамме *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1 и в штамме с делецией гена *nhmG* *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8 (степень индуцибельности в обоих штаммах составляла примерно 2 раза). Ациламидазная активность клеток штаммов *R. rhodochrous* M33 del pRY1-6 и *R. rhodochrous* M33 del pRY1-6,5, в которых ген *cblA* отсутствовал, не зависела от наличия белка NhmG и присутствия ионов кобальта в среде и соответствовала уровню активности клеток контрольного штамма в условиях индукции.



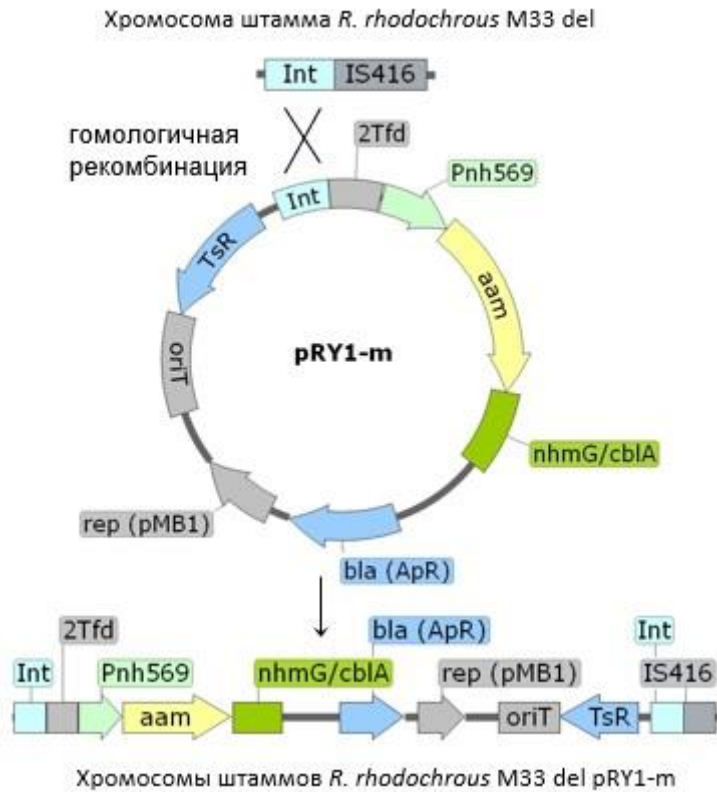


Рисунок 3.31 – Схема конструирования штаммов серии *R. rhodochrous* M33 del pRY1-m.

Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

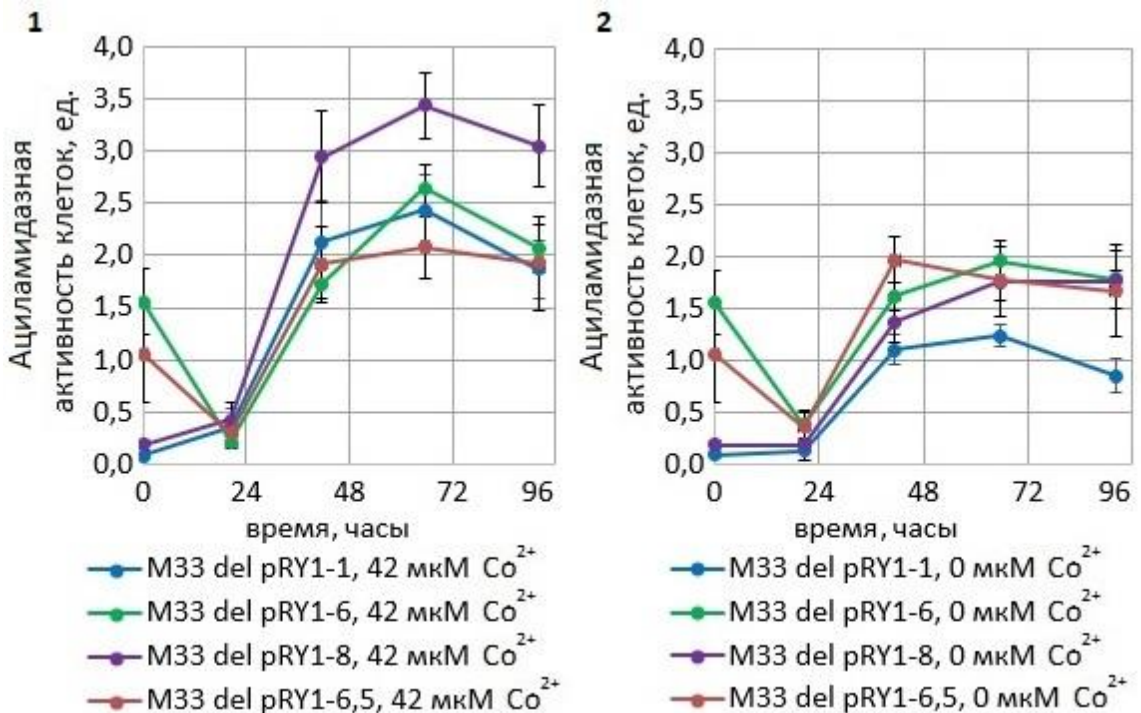


Рисунок 3.32 – Динамика ациламидазной активности клеток штаммов серии *R. rhodochrous* M33 del pRY1-m. (1): в присутствии ионов кобальта (2): в отсутствие ионов кобальта. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях

Данные наблюдения позволили предположить, что продукт гена *cblA* является репрессором транскрипции. Таким образом отсутствие гена *cblA* и его продукта приводило к тому, что инициация транскрипции происходила конститутивно на том же уровне, как и в условиях полной дерепрессии в присутствии ионов кобальта в штаммах, содержащих ген *cblA*.

Экспериментальные результаты подтвердили предположения биоинформатического анализа: продукт гена *nhmG* не участвует в механизме кобальт-зависимой регуляции транскрипции, в то время как продукт гена *cblA* является репрессором транскрипции, чувствительным к присутствию ионов кобальта в среде.

Ациламидазная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8 превышала активность клеток контрольного штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1. 3'-конец транскрипта мРНК целевого гена в штамме *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8 содержал фрагмент с нефункциональным концом гена *nhmG* и областью после него. Известно, что 3'-конец транскрипта может влиять на стабильность мРНК и экспрессию целевого гена, поэтому при дальнейшем конструировании штамма с максимальной конститутивной активностью данный фрагмент решили добавить в состав экспрессионной кассеты (см. далее Раздел 3.4)

Несмотря на то, что в контрольном штамме *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1 экспрессионная кассета была интегрирована в состав хромосомы, ациламидазная активность его клеток ( $2,4 \pm 0,3$ ) была значительно ниже, чем активность клеток штаммов *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam ( $3,9 \pm 0,3$ ) и *R. rhodochrous* M33 aam II ( $3,7 \pm 0,5$ ), содержащих сходные кассеты экспрессии (Таблица 3.9). При этом высокая активность штамма *R. rhodochrous* M33 aam II достигалась при использовании регуляторной области длиной 512 п.н. (Раздел 3.2.1). Из этого можно было заключить, что сниженная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1 не может объясняться недостаточной протяженностью регуляторной области. При этом штаммы серии pRY1-m и pRY16-n содержали перед регуляторной областью регион, включающий двойной терминатор транскрипции 2Tfd. Данный регион использовали для предотвращения протекания транскрипции от вышерасположенных промоторов для более точного изучения эффектов инициации транскрипции и регуляции в области P<sub>nh</sub>, однако оказалось, что он понизил ациламидазную активность клеток всех рекомбинантных штаммов, содержащих участок 2Tfd-P<sub>nh569</sub>. При дальнейшем конструировании штаммов-биокатализаторов этого эффекта удалось избежать за счет отдаления региона 2Tfd от регуляторной области P<sub>nh569</sub> (участок 2Tfd-upP<sub>nh569</sub>, см. далее Раздел 3.4).

Дополнительно провели оценку количества целевого белка в рекомбинантных штаммах с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (Рисунок 3.33). Для этого штаммы серии *R. rhodochrous* M33 del pRY1-m выращивали в жидкой среде при стандартных условиях в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в течении 48 часов (время, при котором

достигалась максимальная активность клеток). Штамм *R. rhodochrous* M33 aam использовали в качестве контрольного. Во всех случаях индукция ациламидазной активности в клетках штаммов, выращенных в присутствии ионов кобальта, соответствовала увеличению количества целевого белка ациламидазы.

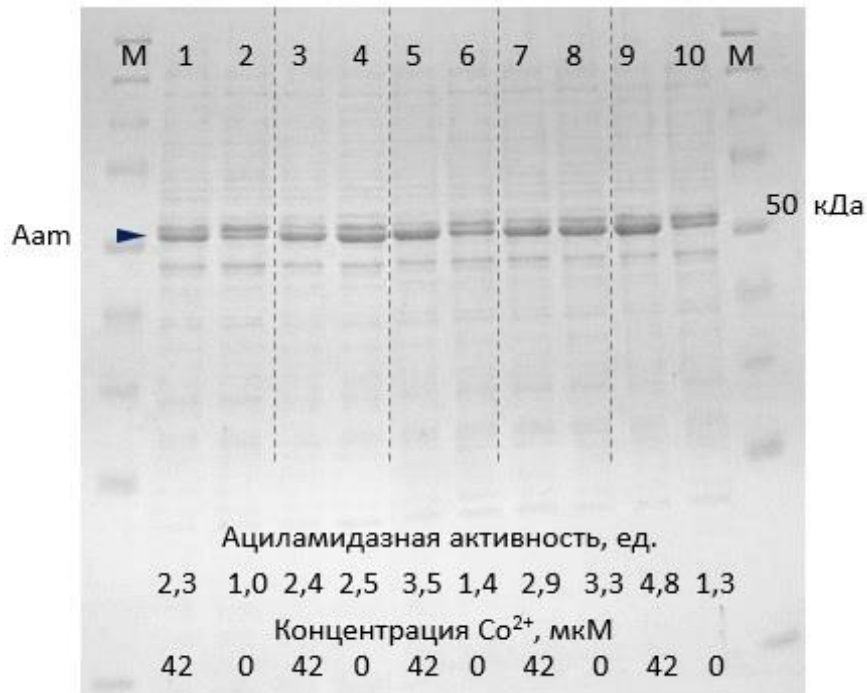


Рисунок 3.33 – Денатурирующий ДСН-ПААГ электрофорез внутриклеточных растворенных белков штаммов серии *R. rhodochrous* M33 del pRY1-m. Дорожки 1, 2: штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1; дорожки 3, 4: штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-6; дорожки 5, 6: штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8; дорожки 7, 8: штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-6,5; дорожки 9, 10: штамм *R. rhodochrous* M33 aam. Синяя стрелка обозначает белок ациламидазу. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 48 часов. Концентрация ионов кобальта в среде и ациламидазные активности клеток указаны под каждой дорожкой.

Дорожки М: маркер молекулярного веса Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder

### 3.3.3 Определение степени индуцибельности системы экспрессии « $P_{nh569} - cblA$ » при различных условиях выращивания

3.3.3.1. Определение степени индуцибельности системы экспрессии « $P_{nh569} - cblA$ » в зависимости от источников углерода и азота

Главным параметром индуцибельной системы экспрессии является степень индуцибельности, то есть отношение максимально достижимого уровня экспрессии в условиях индукции к минимальному – «базовому» – уровню экспрессии без добавки индуктора. Для более точного определения степени индуцибельности изучаемой системы был выбран штамм

*R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aat, в котором изучаемая система была представлена в полном виде, при этом штамм обладал высоким уровнем ациламидазной активности клеток, а структура интегрированной кассеты исключала протечку транскрипции с вышерасположенных промоторов (Рисунок 3.23).

Для определения влияния компонентов стандартной среды на ациламидазную активность, штамм выращивали на различных источниках углерода и азота в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в течение 62 часов. В качестве источника углерода помимо стандартной глюкозы, 5 г/л, использовали ацетат натрия, 4 г/л, и сочетание этих компонентов в той же концентрации. В качестве источника азота помимо стандартной мочевины, 6 г/л, использовали нитрат аммония, 2 г/л, и сочетание этих компонентов в той же концентрации. Также штамм выращивали в богатых средах ВН и LB в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в течение 62 часов. Результаты измерения ациламидазной активности клеток штамма, выращенного в различных условиях, представлены на Рисунке 3.34. Рассчитанные степени индуцибельности для каждого варианта среды приведены в Таблице 3.13.

Степени индуцибельности ионами кобальта варьировались от 3,0 до 17,6 раз в зависимости от использованных источников углерода и азота. Наибольшая степень индуцибельности ионами кобальта (от 17,0 до 17,6 раз) достигалась при использовании нитрата аммония и глюкозы (варианты 8/1 и 10/3), поскольку «базовый» уровень ациламидазной активности клеток в отсутствие ионов кобальта был минимальным. Минимальная степень индуцибельности (от 3,0 до 3,2 раз) наблюдалась при использовании глюкозы и мочевины (варианты 11/4 и 12/5), что напротив было обусловлено повышением «базового» уровня активности. При выращивании в богатых питательных средах степень индуцибельности составила от 9,6 до 11,5 раз.

Очевидно, что такой диапазон рассчитанных степеней индуцибельности был вызван влиянием используемых источников углерода и азота. Клетки с минимальной ациламидазной активностью были получены при выращивании на глюкозе и нитрате аммония (варианты 1 и 8). Использование ацетата натрия вместо глюкозы позволяло увеличить ациламидазную активность клеток в 16 раз (вариант 2 по сравнению с вариантом 1), однако сочетание глюкозы и ацетата натрия (вариант 3) приводило к снижению активности до уровня, близкому к варианту 1. Данное наблюдение указывало на действие глюкозы как катаболитного репрессора. Соответствующий эффект был виден также в клетках, выращенных в присутствии ионов кобальта в среде (варианты 8, 9, 10).

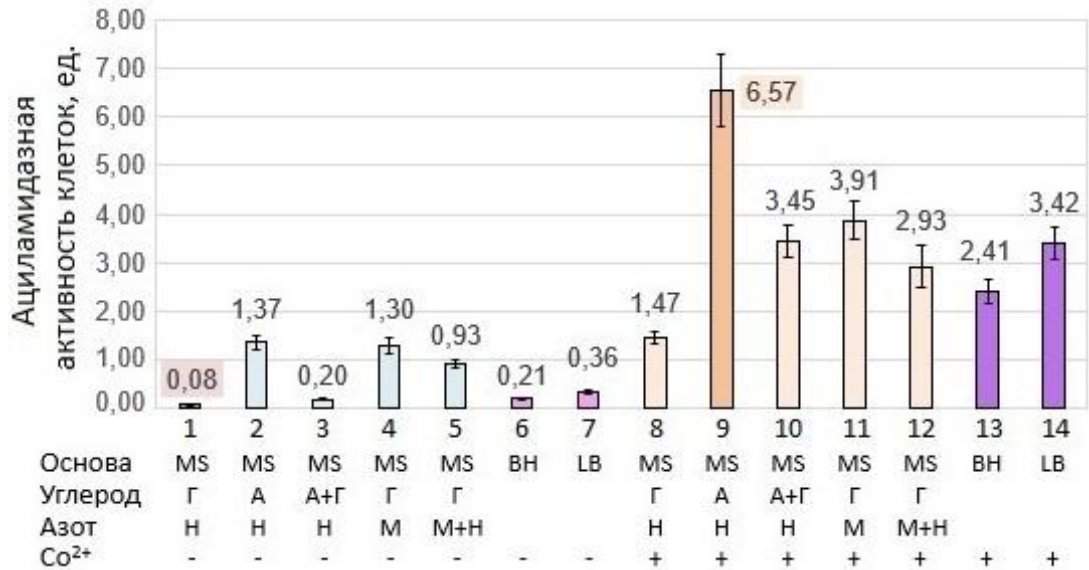


Рисунок 3.34 – Ациламидазная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam, выращенного в жидких средах различного состава. Г – глюкоза, 5 г/л; М – мочевины, 6 г/л; Н – нитрат аммония, 2 г/л; А – ацетат натрия, 4 г/л. Культуры выращивали в течение 62 часов.

Номера вариантов среды указаны под гистограммой

Таблица 3.13 – Степень индуцибельности ионами кобальта ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam

Номера вариантов среды*	Степень индуцибельности, разы
8/1	17,6
9/2	4,8
10/3	17,0
11/4	3,0
12/5	3,2
13/6	11,5
14/7	9,6

\*номера вариантов сред соответствуют номерам, приведенным на Рисунке 3.34

Использованные источники азота по-разному влияли на ациламидазную активность клеток штамма. С одной стороны, использование мочевины или сочетания мочевины и нитрата аммония позволяло повысить уровень ациламидазной активности (варианты 4 и 5) по сравнению с клетками, выращенными в среде, содержащей только нитрат аммония (вариант 1) в 15,6 и 11,1 раз соответственно. Полученные данные указывали на то, что мочевины выступала в качестве индуктора экспрессии, независимого от ионов кобальта. С другой стороны, клетки, выращенные

в среде, сочетающей мочевины и нитрат аммония (вариант 5), демонстрировали более низкий уровень активности по сравнению с клетками, выращенными на мочеvine в отсутствие нитрата аммония (вариант 4), что указывало на действие нитрата аммония в качестве репрессора экспрессии. Сходные эффекты наблюдались в клетках, выращенных в присутствии ионов кобальта в среде (варианты 8, 11, 12).

В целом, полученные результаты продемонстрировали широкий диапазон между минимальным (вариант 1) и максимально достижимым (вариант 9) уровнями ациламидазной активности клеток равный 79 разам. Механизмы регуляции экспрессии источниками углерода и азота вероятно были связаны с общеклеточным углеродным и азотным контролем и в данной работе не изучались.

3.3.3.2. Изучение профиля индуцибельности системы экспрессии «P<sub>nh569</sub> – *cbIA*» в зависимости от источников углерода и азота

Известно, что регуляция транскрипции может отличаться на разных стадиях роста культуры. Для изучения динамики ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam культуры выращивали в том же наборе сред, что и в Разделе 3.3.3.1 в течение 62 часов. Результаты измерения ациламидазной активности клеток представлены на Рисунке 3.35.

Оказалось, что влияние ионов кобальта было видно уже в логарифмической фазе роста на 9-ом часу выращивания (наиболее наглядно было выражено в среде с глюкозой и нитратом аммония и в богатых средах). Присутствие ацетата натрия увеличивало активность также в логарифмической фазе роста и давало пик активности на 24-ом часу роста (наиболее наглядно было выражено в среде с ацетатом натрия и нитратом аммония). Присутствие мочевины напротив повышало активность клеток, находившихся в стационарной фазе роста культуры, после 36 – 62 часов роста (наиболее наглядно было выражено в среде с глюкозой и мочевиной).

Таким образом удалось выяснить, что система экспрессии индуцировалась ионами кобальта и ацетатом натрия в логарифмической фазе роста культуры, а мочевиной – в стационарной фазе роста.

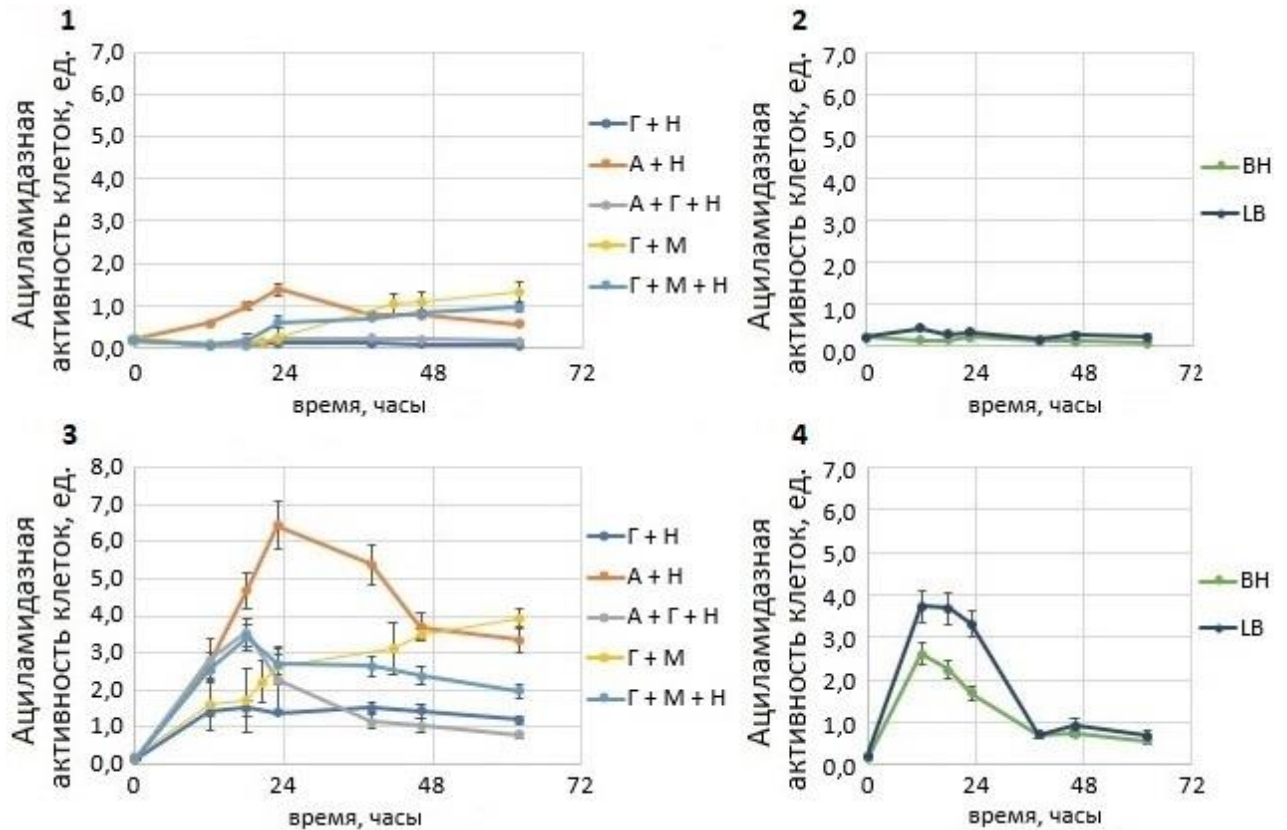


Рисунок 3.35 – Динамика ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam при выращивании в жидких средах различного состава. (1, 2): в отсутствие ионов кобальта; (3, 4): в присутствии ионов кобальта; Г – глюкоза, 5 г/л; М – мочевины, 6 г/л; Н – нитрат аммония, 2 г/л; А – ацетат натрия, 4 г/л

### 3.3.3.3. Определение условий выращивания культуры для получения максимальной ациламидазной активности культуры

Для практического использования штамма важна не только величина ферментативной активности его клеток, но и активность всей выращенной культуры. Величина ациламидазной активности культуры выражалась в условных единицах и рассчитывалась по формуле (2.2) как произведение ациламидазной активности клеток на оптическую плотность клеточной суспензии. Кривые роста штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam, выращенного в различных условиях приведены на Рисунке 3.36. Кривые роста клеток, выращенных в средах с глюкозой и нитратом аммония (Г + Н), с глюкозой и мочевиной (Г + М), с глюкозой, мочевиной и нитратом аммония (Г + М + Н) не отличалась друг от друга (обозначены на графике как Г + Н / Г + М / Г + М + Н). Величины ациламидазной активности культуры штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam, рассчитанные по формуле (2.2), приведены в динамике на Рисунке 3.37.



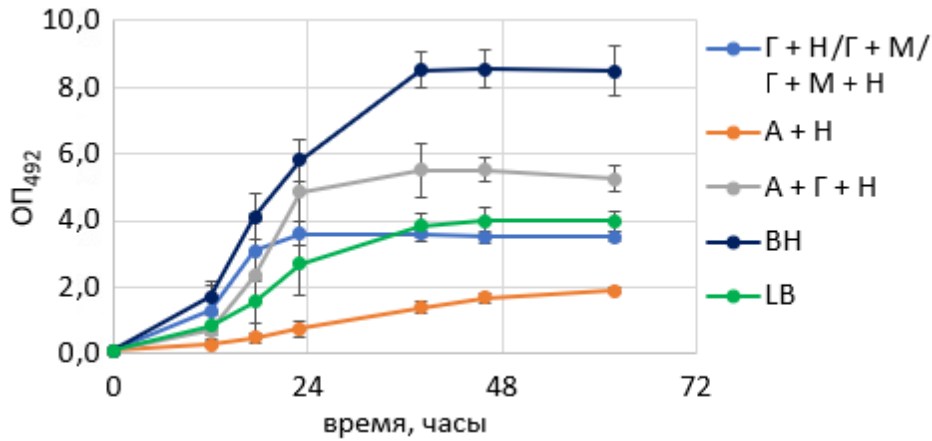


Рисунок 3.36 – Кривые роста штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-аам при выращивании в жидких средах различного состава. Г – глюкоза, 5 г/л; М – мочевины, 6 г/л; Н – нитрат аммония, 2 г/л; А – ацетат натрия, 4 г/л. Концентрация ионов кобальта в среде составляла 42 мкМ

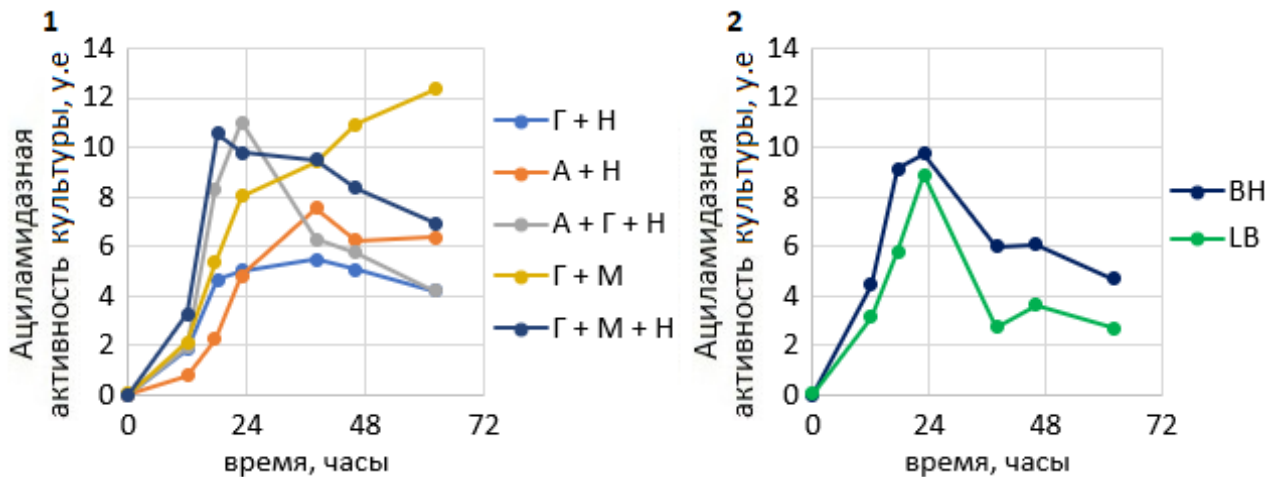


Рисунок 3.37 – Рассчитанная ациламидазная активность культуры штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-аам при выращивании в жидких средах различного состава. (1): в минимальной среде с различными источниками углерода и азота; (2): в богатых средах. Г – глюкоза, 5 г/л; М – мочевины, 6 г/л; Н – нитрат аммония, 2 г/л; А – ацетат натрия, 4 г/л. Концентрация ионов кобальта в среде составляла 42 мкМ

Исходя из рассчитанных величин ациламидазной активности культуры, сочетание глюкозы и мочевины (Г + М) являлось наиболее выгодным составом среды, так как позволяло добиться наибольшей ациламидазной активности культуры (более 12 у.е.). Среда с ацетатом натрия и нитрата аммония, позволяющая получить максимально высокий уровень удельной ациламидазной активности клеток, ограничивала рост клеток до оптической плотности вдвое меньшей по сравнению с культурой клеток, выращенных при стандартных условиях, из-за чего ациламидазная активность культуры не превышала 8 у.е. Использование богатых питательных



сред и сред с комбинированными источниками углерода (ацетат натрия, глюкоза и нитрат аммония) и азота (глюкоза, мочеви́на и нитрат аммония) позволяло добиться высокого пика ациламидазной активности культуры порядка 9 – 11 у.е. в логарифмической фазе роста, однако после этого удельная активность клеток снижалась, что приводило к уменьшению ациламидазной активности культуры в стационарной фазе роста культур.

#### 3.3.4. Оценка специфичности системы экспрессии « $P_{nh569} - cblA$ » в отношении двухвалентных ионов тяжелых металлов

3.3.4.1. Изучение влияния присутствия двухвалентных ионов тяжелых металлов на рост штамма *R. rhodochrous* M33 del

Исходя из литературных данных по металло-специфичности ТФ в бактериях можно было предположить, что белок CblA может взаимодействовать с ионами различных двухвалентных металлов. В таком случае система экспрессии, состоящая из регуляторной области  $P_{nh569}$  и гена *cblA*, могла бы реагировать на присутствие ионов различных металлов.

Поскольку высокие концентрации тяжелых металлов в среде могут быть токсичными для бактерий, для изучения металло-специфичности в первую очередь решили проверить, будет ли присутствие двухвалентных ионов металлов влиять на скорость роста изучаемого микроорганизма. Для проверки использовали двухвалентные ионы следующих металлов:  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $As^{2+}$ . Концентрацию ионов металлов в среде варьировали от 42 мкМ (стандартные условия) до 504 мкМ. В качестве объекта изучения выбрали штамм *R. rhodochrous* M33 del с делетированной кобальт-индуцируемой системой экспрессии, чтобы исключить влияние этой системы на устойчивость штамма к металлам.

Эксперименты по выращиванию культур проводили по следующей схеме. Культуры штамма *R. rhodochrous* M33 del, в жидкой среде при стандартных условиях в отсутствие ионов металлов до достижения экспоненциальной фазы роста. После этого выращенную культуру пересеивали в стерильную среду, содержащую ионы металлов в заданной концентрации, стартовая оптической плотность культуры составляла 0,08 единиц. Оптическую плотность культур измеряли после 10 и 26 часов культивирования при стандартных условиях. Полученные данные приведены на Рисунке 3.38. Оптические плотности культур приведены к относительным значениям, за 1 условную единицу принято значение оптической плотности контрольной культуры штамма *R. rhodochrous* M33 del, выращенной в отсутствие ионов металлов, измеренное в той же временной точке.

По приведенным данным видно, что присутствие ионов  $Cu^{2+}$  в среде полностью ингибировало рост культуры даже при минимальных концентрациях металла. Присутствие ионов  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $As^{2+}$  замедляло рост культуры при стандартных концентрациях 42 мкМ и более и полностью останавливало рост при наибольших концентрациях ионов  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ .

Присутствие ионов  $Zn^{2+}$ , напротив, не сказывалось на росте культуры в изучаемых условиях. Для дальнейшего изучения решили использовать стандартную концентрацию ионов металлов 42 мкМ, которая в наименьшей степени замедляла рост культуры для всех металлов, кроме меди.

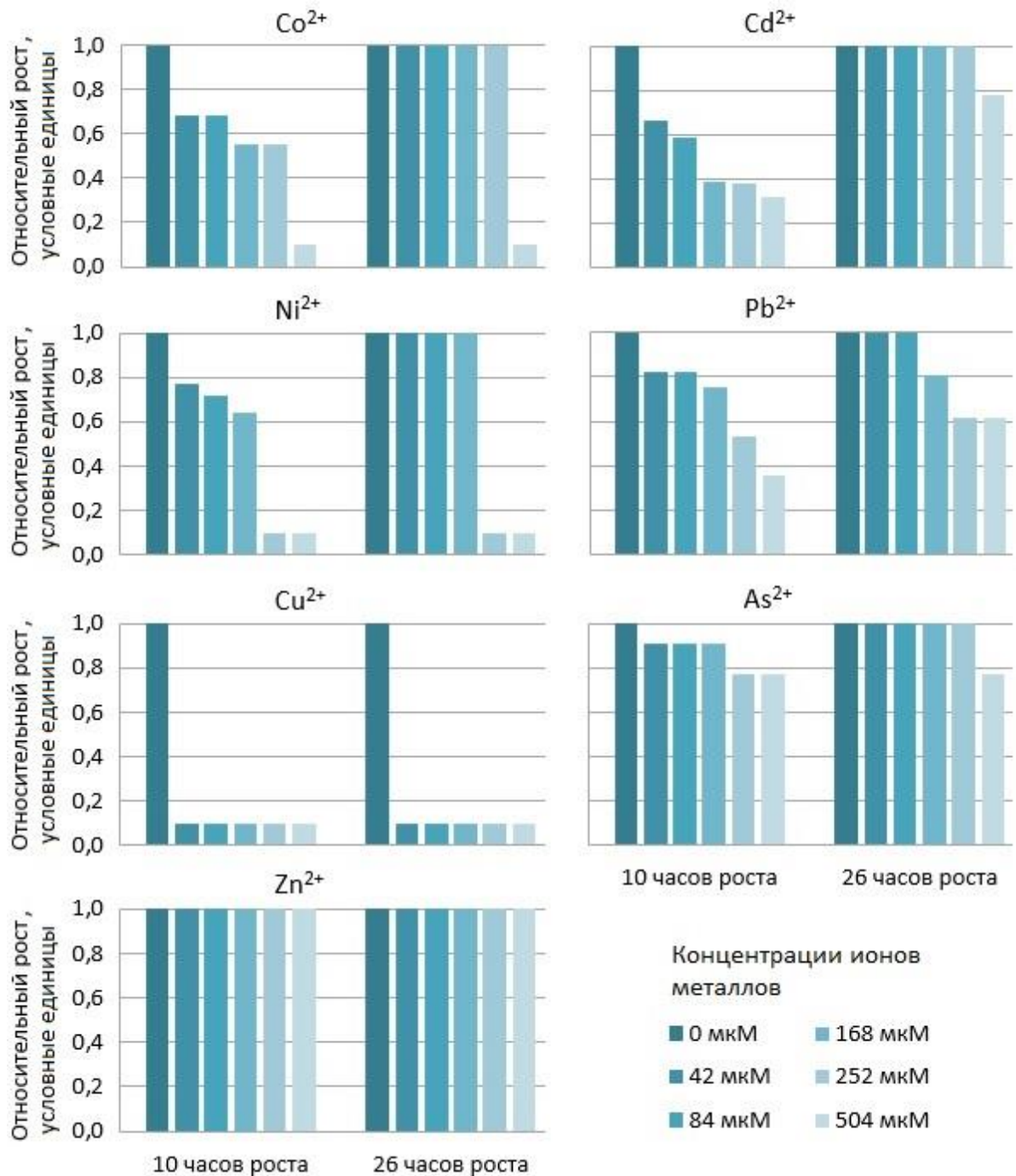


Рисунок 3.38 – Влияние присутствия двухвалентных ионов тяжёлых металлов в среде на рост штамма *R. rhodochrous* M33 del. Культуры выращивали в жидкой среде при стандартных условиях в присутствии ионов  $Co^{2+}/Ni^{2+}/Cu^{2+}/Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}/As^{2+}$ . За 1 у.е. принято значение оптической плотности культуры, выращенной в отсутствие ионов тяжелых металлов в среде

3.3.4.2. Изучение влияния присутствия двухвалентных ионов тяжелых металлов на транскрипционную активность регуляторной области  $P_{nh569}$  в штамме *R. rhodochrous* M33 aam

Штамм *R. rhodochrous* M33 aam выращивали в течении 96 часов при стандартных условиях в присутствии ионов  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  и  $As^{2+}$ . Клетки, выращенные в присутствии ионов кобальта, использовали как положительный контроль. Все ионы металлов в данной серии опытов добавляли до финальной концентрации 42 мкМ. Для получения максимального уровня активности клеток в качестве источника азота использовали мочевины. Результаты измерения ациламидазной активности клеток приведены на Рисунке 3.39.

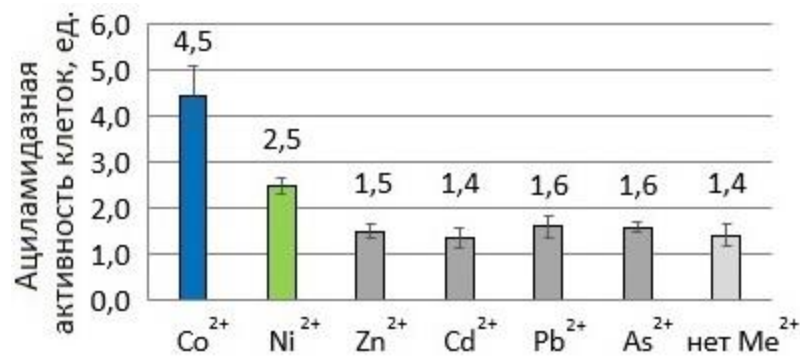


Рисунок 3.39 – Ациламидазная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 aam, выращенного в присутствии двухвалентных ионов тяжёлых металлов. Культуры выращивали в жидкой среде при стандартных условиях в течение 96 часов в присутствии ионов  $Co^{2+}/Ni^{2+}/Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}/As^{2+}$

Из представленных данных видно, что присутствие двухвалентных ионов цинка, кадмия, свинца и мышьяка не приводило к повышению уровня ациламидазной активности клеток по сравнению с клетками, выращенными в отсутствие ионов металлов. С одной стороны, исходя из полученных результатов, нельзя было исключать вероятность того, что ионы данных металлов оказывались недоступными для взаимодействия с белком CblA по причине своей недостаточной концентрации внутри клетки, либо будучи хелатированными другими молекулами. С другой стороны, литературные данные о белках семейства ArsR-SmtB, в том числе ближайшего аминокислотного гомолога CblA, белка NmtR из *M. tuberculosis*, указывают на свойственную данным белкам ограниченную специфичность к ионам металлов (Раздел 1.4 и Раздел 3.1.5). На основе этого можно было с большей вероятностью предполагать, что белок CblA не взаимодействует с двухвалентными ионами цинка, кадмия, свинца и мышьяка, и система экспрессии « $P_{nh569} - cblA$ » находится в состоянии репрессии в их присутствии в среде.

Единственным металлом помимо кобальта, присутствие которого приводило к повышению ациламидазной активности, был никель, что указывало на то, что специфичность белка CblA из

всех исследуемых металлов ограничена двухвалентными ионами кобальта и никеля. При этом присутствие ионов никеля в концентрации 42 мкМ в среде не позволяло достигнуть уровня активности, полученного в присутствии ионов кобальта в той же концентрации, то есть система экспрессии «P<sub>nh569</sub> – cblA» обладала меньшей чувствительностью к ионам никеля по сравнению с ионами кобальта.

3.3.4.3. Оценка чувствительности системы экспрессии «P<sub>nh569</sub> – cblA» по отношению к ионам Co<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup>

Для более точного определения чувствительности системы экспрессии «P<sub>nh569</sub> – cblA» к ионам кобальта и никеля штамм *R. rhodochrous* M33 аам выращивали в течении 96 часов в отсутствие мочевины в среде, используя в качестве источника азота нитрат аммония. Это изменение в условиях выращивания позволило оценить степень индуцибельности системы при низкой концентрации ионов металлов, так как уровень ациламидазной активности клеток в отсутствие ионов металлов в среде составлял  $0,08 \pm 0,01$  ед. Концентрацию ионов кобальта и никеля в среде варьировали от 0,42 мкМ до 168 мкМ. Результаты измерения ациламидазной активности клеток приведены на Рисунке 3.40.

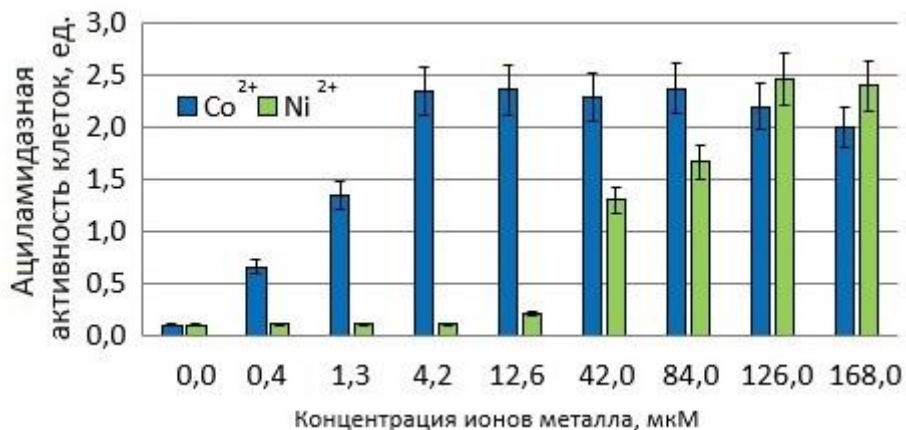


Рисунок 3.40 – Ациламидазная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 аам в зависимости от концентрации ионов Co<sup>2+</sup> или Ni<sup>2+</sup> в среде. Культуры выращивали в жидкой среде в течение 96 часов при стандартных условиях в присутствии ионов Co<sup>2+</sup> или Ni<sup>2+</sup> в концентрации от 0,42 мкМ до 168 мкМ. В качестве источника азота использовали нитрат аммония, 2 г/л

Для достижения максимально возможного в данных условиях уровня экспрессии были необходимые разные концентрации ионов металлов: 4,2 мкМ ионов кобальта и 126 мкМ ионов никеля. Наиболее вероятно это было вызвано тем, что белок CblA обладает большей чувствительностью к ионам кобальта, чем к ионам никеля, однако нельзя также исключить

возможное воздействие каких-либо внутриклеточных компонентов, влияющих на концентрацию данных ионов, доступных для взаимодействия с белком CblA, в клетке. Для окончательного подтверждения сделанного вывода в дальнейшем необходимы *in vitro* тесты с выделенным и очищенным белком CblA. Практическим следствием полученных данных является то, что ионы никеля могут быть использованы для дерепрессии системы экспрессии «P<sub>nh569</sub> – cblA», например в том случае, если ионы кобальта оказывают негативное влияние на экспрессируемый белок, или система используется для синтеза никель-зависимого белка.

#### 3.3.4.4. Модель металло-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы

Полученные результаты позволили предложить модель металло-зависимой системы транскрипции генов нитрилгидратазы, схематично изображенную на Рисунке 3.41.

Система металло-зависимой экспрессии состоит из двух генетических элементов: гена *cblA*, кодирующего ТФ CblA, и регуляторной области P<sub>nh569</sub>, транскрипционная активность которой регулируется белком CblA. Белок CblA связывается с молекулой ДНК в области своих боксов посадки, которые перекрываются с боксами посадки РНК-полимеразы в составе регуляторной области P<sub>nh569</sub>, таким образом не давая РНК-полимеразе инициировать транскрипцию. Это состояние системы является репрессированным.

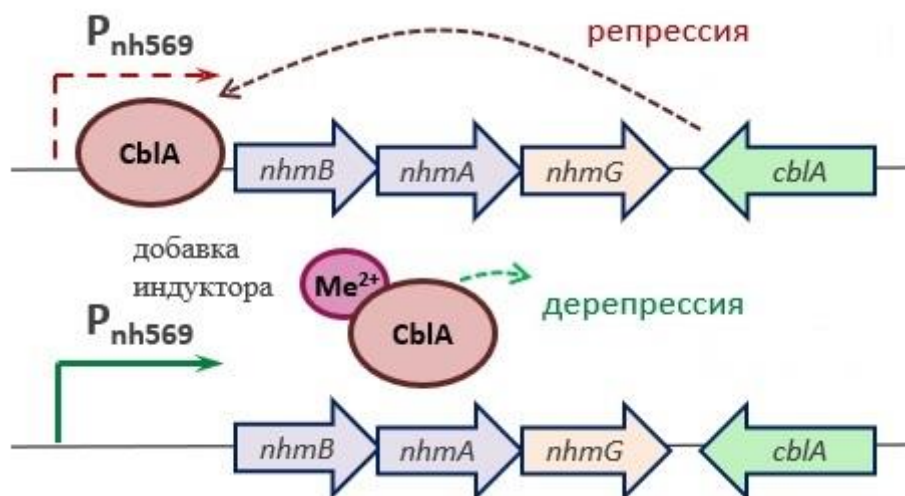


Рисунок 3.41 – Модель металло-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы в штамме *R. rhodochrous* M8. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов; Me<sup>2+</sup> – ионы Co<sup>2+</sup> или Ni<sup>2+</sup>

В присутствии в среде двухвалентных ионов металлов (кобальта и никеля) белок CblA, взаимодействуя с этими ионами, теряет сродство к ДНК и диссоциирует, что приводит к дерепрессии системы и успешной инициации транскрипции в районе регуляторной области P<sub>nh569</sub>. При этом система экспрессии обладает большей чувствительностью к ионам кобальта, чем

к ионам никеля: дерепрессия детектируется при концентрации 0,42 мкМ в случае ионов кобальта и 12,6 мкМ в случае ионов никеля. Полная дерепрессия системы достигается при концентрации 4,2 мкМ ионов кобальта или 126 мкМ ионов никеля в среде. Поскольку прямого исследования способности белка CblA к диссоциации от ДНК в присутствии ионов кобальта и никеля не проводилось, полученные данные с меньшей вероятностью можно интерпретировать как способность белка CblA к изменению конформации в присутствии ионов этих металлов без диссоциации от ДНК, которое также приводит к дерепрессии системы.

Гены *nhmC* и *nhmD* не участвуют в изучаемом металло-зависимом механизме регуляции транскрипции. Ген *nhmG*, кодирующий белок металло-шаперона NhmG и необходимый для правильного фолдинга белков нитрилгидратазы, не участвует в регуляции транскрипции генов. Для конструирования штаммов на основе металло-регулируемой системы экспрессии «P<sub>nh569</sub> – *cblA*» гены *nhmC*, *nhmD* и *nhmG* можно исключать из состава экспрессионной кассеты. Для конструирования штаммов с конститутивным уровнем экспрессии необходимо исключать из состава экспрессионной кассеты ген *cblA*.

3.3.5. Тестирование регулируемости транскрипционной активности области P<sub>nh569</sub> ионами кобальта в присутствии гена *cblA* в клетках *Rhodococcus qingshengii*

3.3.5.1. Конструирование штамма *R. qingshengii* TA37 pRY1-8, содержащего кассету P<sub>nh569</sub>-*aam-cblA*

Возможность использования кобальт-регулируемой системы экспрессии в других видах родококков решили проверить на примере штамма *R. qingshengii* TA37, введя в хромосому штамма экспрессионную кассету P<sub>nh569</sub>-*aam-cblA*. Нативный ген ациламидазы в данном штамме располагался под контролем индуцибельного промотора, входящего в состав регуляторной области P<sub>aam</sub>, индуктором для которого выступал изопропилакриламид (ИПАА). В отсутствие ИПАА в среде ациламидазная активность в штамме дикого типа не детектировалась (Таблица 3.14), то есть данный штамм можно было использовать для изучения регуляции транскрипции в системе экспрессии «P<sub>nh569</sub> – *cblA*».

Плазмида pRY1-8, содержащая кассету P<sub>nh569</sub>-*aam-cblA*, была интегрирована в хромосому штамма *R. qingshengii* TA37 с помощью гомологичной рекомбинации в один кросс (Рисунок 3.42). Плечом для рекомбинации выступал ген ациламидазы, последующего выщепления плазмиды не проводили. Хромосома полученного штамма *R. qingshengii* TA37 pRY1-8 содержала дублированный ген ациламидазы, при этом одна копия гена находилась в составе экспрессионной кассеты P<sub>nh569</sub>-*aam-cblA*, а вторая – под контролем индуцибельного промотора, входящего в состав регуляторной области P<sub>aam</sub>, не проявляющего транскрипционной активности в отсутствие ИППА в среде.

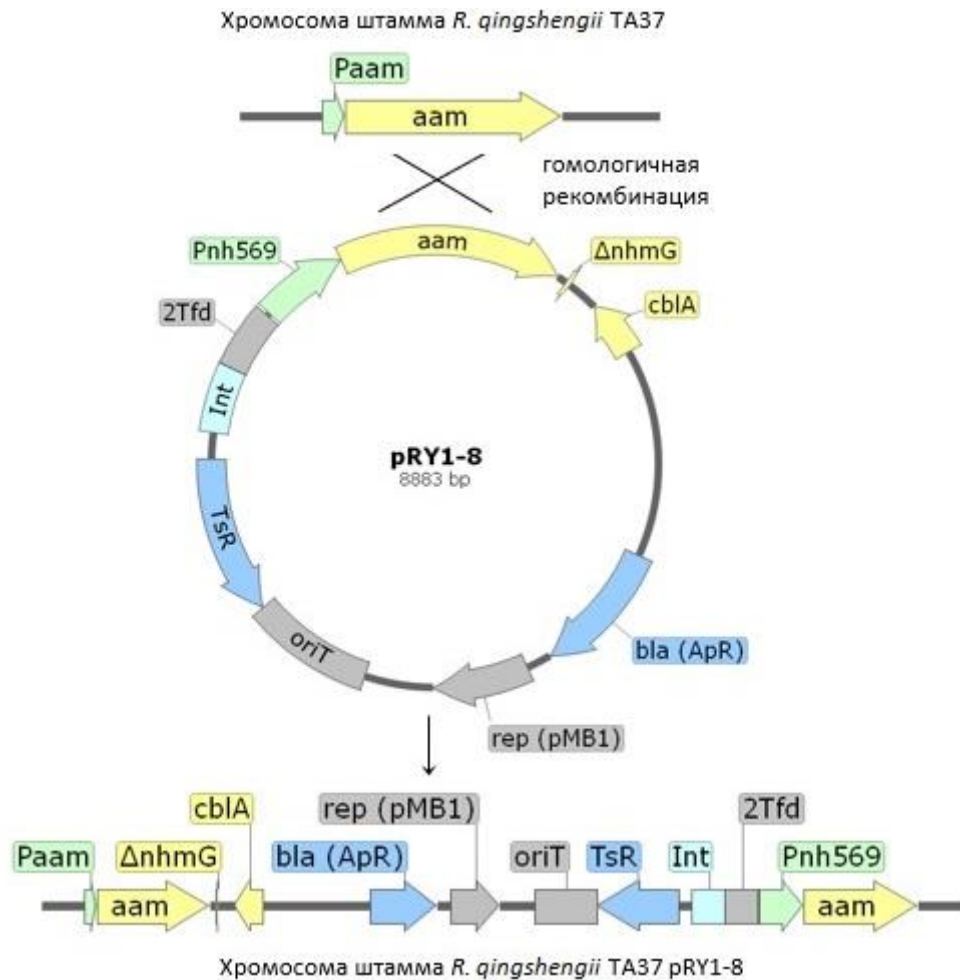


Рисунок 3.42 – Схема конструирования штамма *R. qingshengii* TA37 pRY1-8. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

### 3.3.5.2. Изучение профиля транскрипции гена *aam* в штамме *R. qingshengii* TA37 pRY1-8

Штамм *R. qingshengii* TA37 pRY1-8 выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях с добавкой дрожжевого экстракта (1 г/л), необходимой для роста клеток *R. qingshengii*. Штамм *R. qingshengii* TA37 не мог использовать мочевину в качестве источника азота, поэтому вместо нее в среду добавляли нитрат аммония (2 г/л). В качестве индуктора выступали ионы кобальта в концентрации 42 мкМ в среде, биомассу выращивали в течении 96 часов. Результаты измерения ациламидазной активности клеток представлены в Таблице 3.14.

Ациламидазная активность клеток штамма *R. qingshengii* TA37 pRY1-8 в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в среде отличалась примерно в 2 раза, что подтверждало, что система кобальт-индуцируемой экспрессии, состоящая из регуляторной области P<sub>nh569</sub> и гена регулятора транскрипции *cblA*, была функциональна после переноса в штамм близкородственного микроорганизма, степень индуцибельности ионами кобальта составляла около 2 раз.



Таблица 3.14 – Ациламидазная активность клеток штаммов *R. qingshengii* TA37 и *R. qingshengii* TA37 pRY1-8

Штамм	Ациламидазная активность клеток, ед.	
	42 мкМ Co <sup>2+</sup>	0 мкМ Co <sup>2+</sup>
<i>R. qingshengii</i> TA37 pRY1-8	1,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<i>R. qingshengii</i> TA37	< 0,01	< 0,01

Наличия гена *cblA* было достаточно для кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности области P<sub>nh569</sub> в штамме другого вида родококков, *R. qingshengii* TA37. Эти данные подтвердили гипотезу о том, что в штаммах, производных от штамма *R. rhodochrous* M8, в кобальт-зависимой регуляции транскрипционной активности регуляторной области P<sub>nh569</sub> не участвовали продукты каких-либо других генов.

Важным наблюдением оказалось то, что в отсутствие индукторов в среде (ионов кобальта и мочевины) «базовый» уровень ациламидазной активности клеток штамма *R. qingshengii* TA37 pRY1-8 (0,9 ± 0,1 ед.) был значительно выше, чем «базовый» уровень ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam в соответствующих условиях выращивания (0,08 ± 0,01 ед., Рисунок 3.34). Это могло быть вызвано несколькими причинами:

1. сниженной эффективностью транскрипции и/или трансляции гена *cblA* в штамме *R. qingshengii* TA37, вызванной возможным снижением силы его регуляторной области в этом штамме по сравнению с исходным штаммом *R. rhodochrous* M33. Такое снижение могло привести к синтезу меньшего количества репрессора CblA, которого оказалось недостаточно для полной репрессии транскрипционной активности регуляторной области P<sub>nh569</sub> в отсутствие ионов кобальта в среде;

2. отличиями в геноме штамма *R. qingshengii* TA37 по сравнению со штаммом *R. rhodochrous* M8, в частности наличия регуляторов, прямо или опосредовано влиявших на транскрипционную активность регуляторной области P<sub>nh569</sub>.

Тем не менее, штамм *R. qingshengii* TA37 pRY1-8 продемонстрировал высокий уровень ациламидазной активности клеток, что указывало на высокий уровень транскрипционной активности регуляторной области P<sub>nh569</sub> в этом микроорганизме. Это наблюдение делает регуляторную область P<sub>nh569</sub> перспективной для гетерологичной экспрессии целевых белков в других видах бактерий рода *Rhodococcus*.



### 3.3.6. Тестирование системы экспрессии « $P_{nh569} - cblA$ » в *Escherichia coli*.

#### 3.3.6.1. Выбор репортёрных флуоресцентных белков для тестирования системы « $P_{nh569} - cblA$ » в *E. coli* и *Rhodococcus*

Ранее репортёрный ген ациламидазы *aam* вводили в клетки *E. coli* BLR (DE3) на автономной плазмиде под промотором гена  $\phi 10$  бактериофага T7, сшитым с лактозным оператором *lacO* [134], однако результат гетерологичной экспрессии был неудовлетворительным (ациламидазная активность клеток в условиях индукции составляла от 0,3 до 0,4 ед.). Поэтому для тестирования системы « $P_{nh569} - cblA$ » в клетках *E. coli* было принято решение использовать другой репортёрный белок. Так как одними из самых распространённых репортёрных белков в клетках *E. coli* являются многочисленные варианты флуоресцентных белков, два таких белка были выбраны для дальнейшей работы: TurboGFP [165] и TurboRFP [166]. Оба белка являются улучшенными версиями природных белков: зеленого флуоресцентного белка (GFP) CopGFP из копеподы *Pontellina plumata* и красного флуоресцентного белка (RFP), отличающимися ускоренным фолдингом и небольшой продолжительностью жизни, что делает их удобными для тестирования экспрессионной системы.

Для повышения достоверности выводов об эффективности системы « $P_{nh569} - cblA$ » в *E. coli*, используемую для этого генетическую конструкцию было решено затем протестировать так же в клетках *Rhodococcus*, которые должны были выступить в качестве положительного контроля как экспрессии, так и регуляции транскрипции. В родококках ранее было неоднократно продемонстрировано использование различных вариантов флуоресцентных белков (Таблица 1.4), поэтому ожидалось, что белки TurboGFP и TurboRFP будут подходить для этих целей.

Первым шагом для тестирования системы « $P_{nh569} - cblA$ » в *E. coli* было получение контрольных штаммов клеток *E. coli* XL1, содержащих флуоресцентные белки TurboGFP и TurboRFP и установление параметров измерения интенсивности флуоресценции (ИФ) клеток. Для этого плазмиды pTurboGFP-B и pTurboRFP-B (ЗАО Евроген) ввели в штамм *E. coli* XL1-Blue, получив штаммы *E. coli* XL1 pTurboGFP-B и *E. coli* XL1 pTurboRFP-B.

В этих плаزمиде гены *turboGFP* и *turboRFP* находились под контролем промотора из бактериофага T5, сшитого с лактозным оператором *lacO* (Рисунок 3.43), а ген лактозного репрессора *lacI* был представлен в геноме штамма *E. coli* XL1-Blue. Таким образом уровень экспрессии флуоресцентных белков в этих штаммах можно было регулировать добавкой индуктора – ИПТГ.

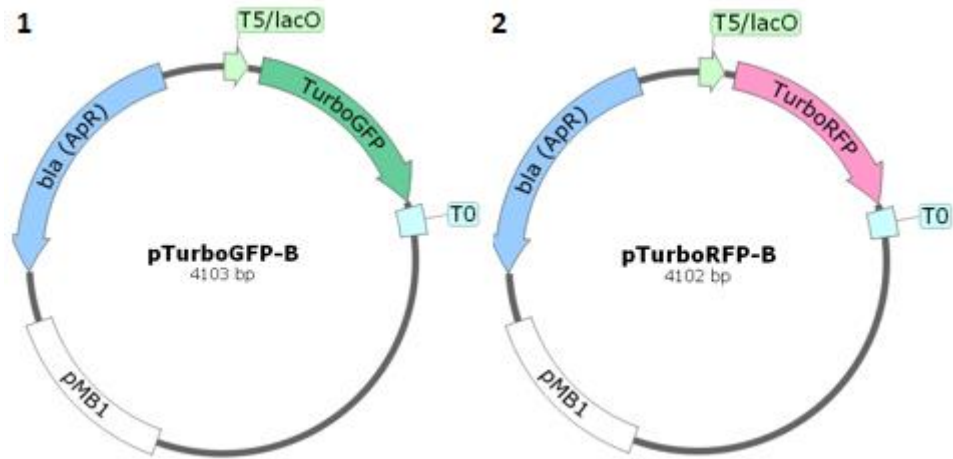


Рисунок 3.43 – Схема плазмидных векторов pTurboGFP-B (1) и pTurboRFP-B (2). Изображения взяты с сайта производителя ЗАО ЕВРОГЕН. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

Штаммы *E. coli* XL1 pTurboGFP-B и *E. coli* XL1 pTurboRFP-B выращивали на жидкой среде LB в присутствии ИПТГ, 100 мг/л и в отсутствие ИПТГ в течение 48 часов. Для измерения флуоресценции использовали параметры (длины волн возбуждения и излучения и соответствующие им спектральные щели), предварительно подобранные для данных белков согласно следующим ограничениям:

1. длины волн возбуждения соответствовали пику спектра возбуждения согласно данным, предоставленным производителем белков (Приложение Б),

2. длины волн излучения были отдалены от пика возбуждения настолько, чтобы избежать «засвечивания». Оптимальные длины волн излучения и ширина спектральных щелей возбуждения и излучения были подобраны экспериментально таким образом, чтобы, с одной стороны, избежать «засвечивания», и с другой стороны, чтобы получить достаточно высокие значения флуоресценции клеточных суспензий, поскольку флуоресценция белков снижается при отдалении от пика спектра излучения (Приложение Б).

Подобранные параметры измерений приведены в Таблице 2.4.

ИФ клеток выражали в условных единицах и рассчитывали по формуле (2.4).

Значения ИФ штаммов *E. coli* XL1 pTurboGFP-B и *E. coli* XL1 pTurboRFP-B приведены на Рисунке 3.44. Флуоресценцию обоих штаммов измеряли при параметрах для определения флуоресценции обоих белков (здесь и далее обозначены как «области измерения белков TurboGFP и TurboRFP»), чтобы оценить возможность «засвечивания» одного белка в область измерения другого белка. Также произвели измерение ИФ штамма *E. coli* XL1-Blue, не содержащего флуоресцентных белков, выращенного в тех же условиях.

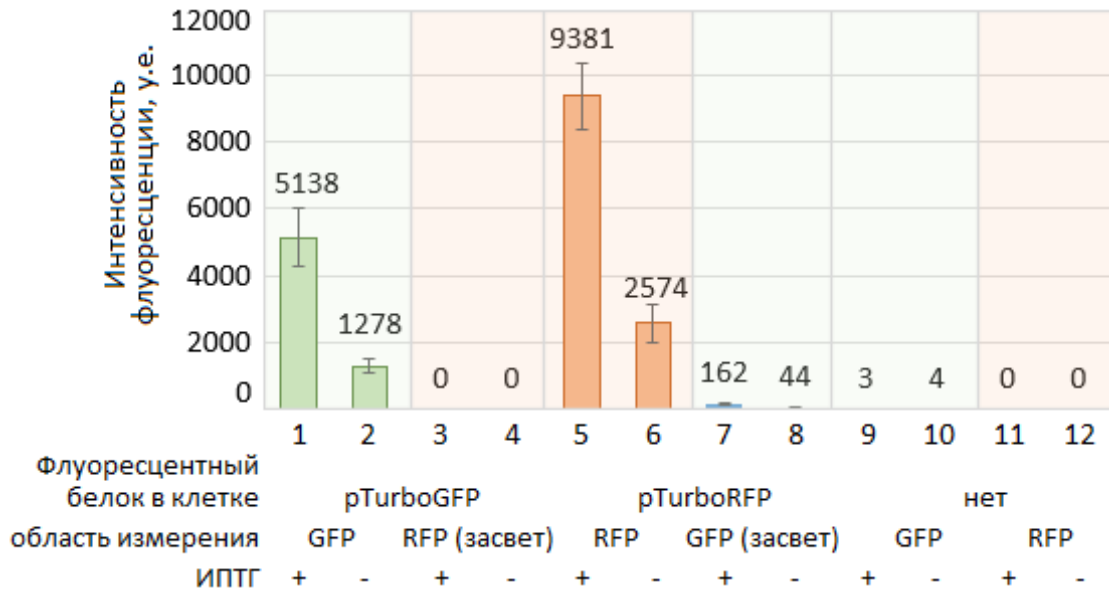


Рисунок 3.44 – Интенсивность флуоресценции штаммов *E. coli* XL1 pTurboGFP-B (1 – 4), *E. coli* XL1 pTurboRFP-B (5 – 8) и *E. coli* XL1-Blue (9 – 12). Культуры выращены в жидкой среде LB в условиях с индукцией ИПТГ и без индукции

Оказалось, что штамм *E. coli* XL1-Blue, не содержащий флуоресцентных белков, имеет низкое значение «фоновой» ИФ в области измерения белка TurboGFP (измерения 9 и 10), и значение ИФ ниже порога детекции в области измерения белка TurboRFP (измерения 11 и 12).

Оба контрольных штамма демонстрировали различие значений ИФ в зависимости от условий выращивания, что соответствовало ожидаемому эффекту от индукции экспрессии с помощью добавки ИПТГ (измерения 1 и 2 для штамма *E. coli* XL1 pTurboGFP-B, измерения 5 и 6 для штамма *E. coli* XL1 pTurboRFP-B). Исходя из этого наблюдения можно было сделать вывод о том, что оба белка позволяют детектировать различия в уровнях экспрессии и могут быть использованы для тестирования индуцибельности системы «P<sub>nh569</sub> – cblA» в *E. coli* XL1-Blue.

Кроме того, было продемонстрировано, что белок TurboGFP не детектировался в области измерения TurboRFP (при параметрах измерения, подобранных для белка TurboRFP) (измерения 3 и 4) по причине того, что использованная в данном случае длина волны возбуждения 553 нм находилась за пределами спектра возбуждения этого белка (Рисунок Б.1, Таблица Б.1). Напротив, белок TurboRFP детектировался в области измерения TurboGFP (измерения 7 и 8), так как в этом случае длины волн возбуждения 482 нм и испускания 518 нм входили в спектры возбуждения и испускания белка TurboRFP, хоть и были расположены далеко от соответствующих пиков (Рисунок Б.2, Таблица Б.1). Коэффициент «засвета» в этом случае составил  $57,9 \pm 2,5$  раз, то есть клетка, содержащая единственный белок TurboRFP и имевшая ИФ в области TurboRFP равную 57,9 у.е., демонстрировала бы 1 у.е. ИФ в области TurboGFP, не содержав при этом самого белка

TurboGFP. Это явление могло незначительно исказить (завышать) значения ИФ клеток, содержащих оба исследуемых белка, в области измерения TurboGFP.

3.3.6.2. Конструирование плазмиды pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP, автономно реплицирующейся в клетках *E. coli* и *Rhodococcus*

Исследуемая регуляторная область P<sub>nh569</sub> включала в себя два функциональных элемента: промотор и RBS гена *nhmB*, обеспечивающих транскрипцию и трансляцию контролируемого ими гена соответственно. Для переноса системы «P<sub>nh569</sub> – *cblA*» в другой микроорганизм было необходимо, чтобы функционировали оба элемента. Для проверки активности этих элементов было решено использовать следующую схему:

1. Расположить ген белка TurboGFP под контролем регуляторной области P<sub>nh569</sub> так, чтобы эта область контролировала его транскрипцию и трансляцию.

2. Расположить ген белка TurboRFP под контролем регуляторной области P<sub>nh569</sub> так, чтобы эта область контролировала его транскрипцию, а трансляцию обеспечивал контрольный RBS<sub>E.coli</sub>, функционирующий в *E. coli*.

3. Поместить изучаемую систему на бирепликонный плазмидный вектор, способный к автономной репликации как в *E. coli*, так и в *Rhodococcus*, для сравнения функционирования системы в родительском организме и гетерологичных условиях.

При использовании кассеты P<sub>nh569</sub>-*turboGFP*-RBS<sub>E.coli</sub>-*turboRFP* можно было получить несколько вариантов фенотипа, в зависимости от функционирования элементов области P<sub>nh569</sub> (Таблица 3.15). При этом варианты 3 и 4 имели бы одинаковый фенотип без детектируемой флуоресценции.

Таблица 3.15 – Возможные фенотипы штамма *E. coli* XL1-Blue, содержащего кассету P<sub>nh569</sub>-*turboGFP*-RBS<sub>E.coli</sub>-*turboRFP*

Параметр	Фенотип 1	Фенотип 2	Фенотип 3	Фенотип 4
промотор в составе P <sub>nh569</sub>	активен	активен	не активен	не активен
RBS в составе P <sub>nh569</sub>	активен	не активен	активен	не активен
RBS <sub>E.coli</sub>	активен	активен	активен	активен
флуоресценция TurboGFP	есть	нет	нет	нет
флуоресценция TurboRFP	есть	есть	нет	нет

Подробная схема конструирования плазмиды, содержащей кассету P<sub>nh569</sub>-*turboGFP*-RBS<sub>E.coli</sub>-*turboRFP*, изображена на Рисунке 3.45. Фрагменты ДНК, содержащие гены *turboGFP* и *turboRFP* нарабатывали ПЦР амплификацией с ДНК плазмид pTurboGFP-B и pTurboRFP-B с

помощью праймеров Gib-Pnh-GFP-for и Gib-GFP-SD-rev, Gib-SD-RFP-for и Gib-T0-V-rev соответственно.

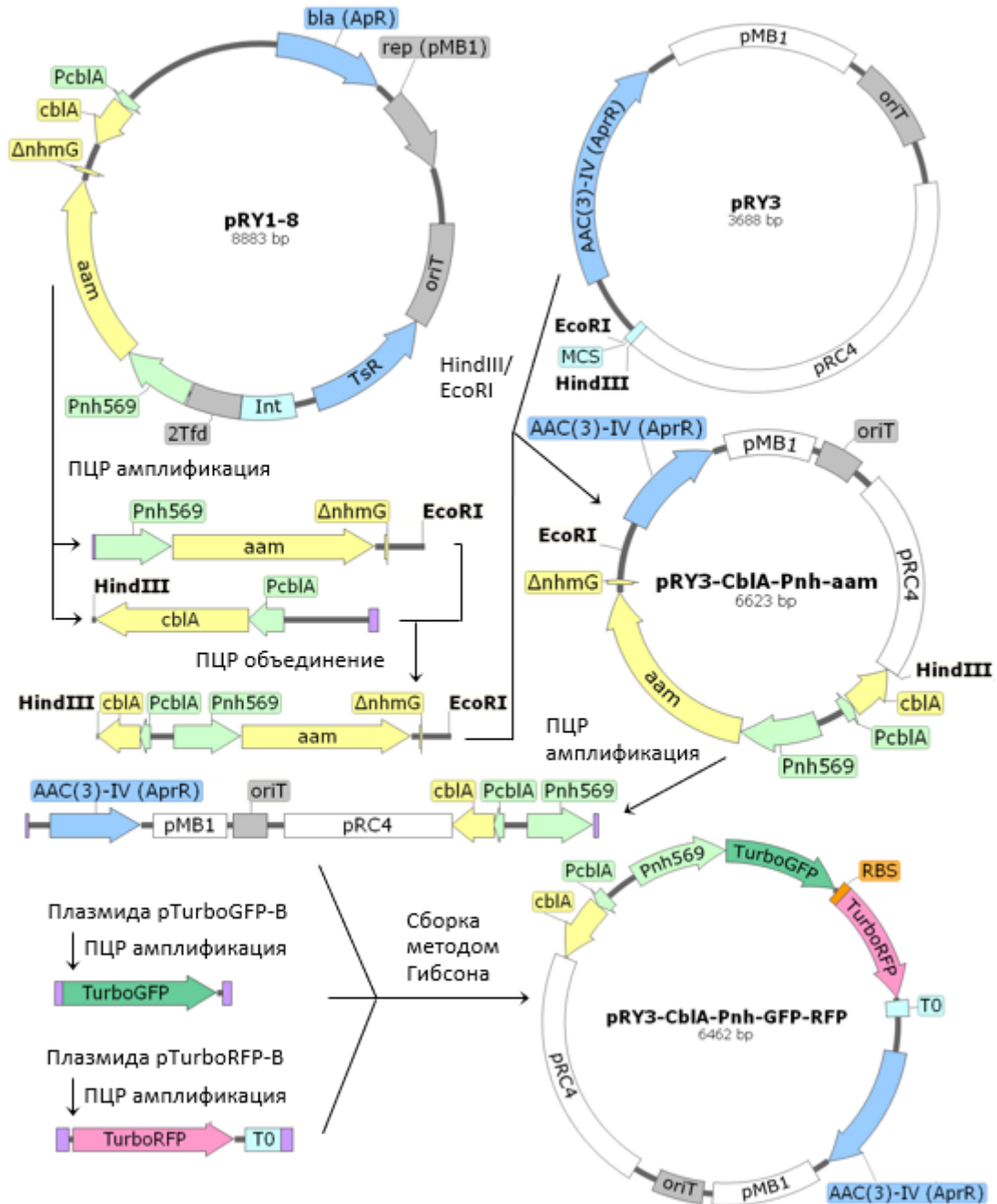


Рисунок 3.45 – Схема конструирования плазмидного вектора pRY3-CblA-Pnh-GFP-RFP. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *EcoRI* и *HindIII*; участки для ПЦР-объединения фрагментов и сборки методом Гибсона показаны фиолетовым цветом; RBS – RBS<sub>E.coli</sub>. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

ДНК плазмиды pRY1-8 использовали в качестве матрицы для ПЦР амплификации фрагментов P<sub>nh569</sub>-aam и P<sub>cblA</sub>-cblA с помощью праймеров F1-Del и R6-Del, F-CblA-HindIII и R-CblA-Png соответственно. Праймер F-CblA-HindIII использовали для внесения сайта рестрикции

*HindIII*. Поскольку точное расположение промотора гена *cblA* не было известно, было решено амплифицировать этот ген с прилежащей к старт-кодону областью длиной 283 п.н., обозначенной  $P_{cblA}$ . Фрагменты  $P_{cblA}$ -*cblA* и  $P_{nh569}$ -*aam* были сконструированы таким образом, что содержали область перекрывания длиной 20 п.н., которая использовалась для проведения ПЦР объединения и получения фрагмента *cblA*- $P_{cblA}$ - $P_{nh569}$ -*aam*. В полученном фрагменте транскрипция с промоторов, входящих в регуляторные области  $P_{cblA}$  и  $P_{nh569}$  должна была осуществляться в противоположных направлениях.

Полученный фрагмент *cblA*- $P_{cblA}$ - $P_{nh569}$ -*aam* клонировали в плазмидный вектор pRY3 по сайтам рестрикции *HindIII* и *EcoRI* с получением плазмиды pRY3- $CblA$ - $P_{nh}$ -*aam*. Далее ДНК этой плазмиды использовали в качестве матрицы для ПЦР амплификации фрагмента AAC(3)-IV-pMB1-oriT-pRC4-*cblA*- $P_{cblA}$ - $P_{nh569}$  с помощью праймеров Gib-T0-V-for и Gib-Pnh-GFP30-rev.

Фрагменты, содержащие гены *turboGFP* и *turboRFP*, и фрагмент AAC(3)-IV-pMB1-oriT-pRC4-*cblA*- $P_{cblA}$ - $P_{nh569}$  имели области перекрывания по 30 п.н. каждая, которые использовали для сборки плазмиды по методу Гибсона. При соединении генов *turboGFP* и *turboRFP* между ними была восстановлена последовательность, содержащая  $RBS_{E.coli}$  гена *turboRFP* из плазмидного вектора pTurboRFP-B длиной 50 п.н. ( $RBS_{E.coli}$  обозначена оранжевым цветом на Рисунке 3.45) Полученную плазмиду назвали pRY3- $CblA$ - $P_{nh}$ -GFP-RFP.

#### 3.3.6.3. Тестирование системы экспрессии « $P_{nh569}$ – *cblA*» в *E. coli*

Плазмиду pRY3- $CblA$ - $P_{nh}$ -GFP-RFP ввели в штамм *E. coli* XL1-Blue, получив штамм *E. coli* XL1 pRY3- $CblA$ - $P_{nh}$ -GFP-RFP. При получении первичных трансформантов колонии были окрашены в ярко-красный цвет, что свидетельствовало о наработке белка TurboRFP и транскрипционной активности регуляторной области  $P_{nh569}$  при выращивании на твердой питательной среде LB в отсутствие ионов кобальта.

Штамм *E. coli* XL1 pRY3- $CblA$ - $P_{nh}$ -GFP-RFP выращивали в жидкой среде LB в течение 48 часов в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в среде (стандартная концентрация 42 мкМ). ИФ клеток приведены на Рисунке 3.46.

Величина ИФ штамма *E. coli* XL1 pRY3- $CblA$ - $P_{nh}$ -GFP-RFP не зависела от присутствия ионов кобальта в среде, причем флуоресценция детектировалась преимущественно в области измерения TurboRFP (измерения 1 и 2), а в области измерения TurboGFP значения ИФ (измерения 3 и 4) не превышали рассчитанных значений «засвета» белка TurboRFP (от 69 до 72 у.е.). Таким образом фенотип штамма соответствовал варианту 2 (Таблица 3.15), на основе чего можно было сделать следующие выводы:

1. Регуляторная область  $P_{nh569}$  обладала транскрипционной активностью в штамме *E. coli* XL1-Blue, сопоставимой с транскрипционной активностью промотора T5/lacO (значение ИФ TurboRFP составляло около 4,1 тысяч у.е. для  $P_{nh569}$  и 2,5 – 9,3 тысяч у.е. для T5/lacO).

2. RBS, входящий в состав области  $P_{nh569}$ , вероятно не функционировал в штамме *E. coli* XL1-Blue (значение ИФ TurboGFP не превышали рассчитанных значений «засвета» белка TurboRFP, то есть клетки вероятно не содержали функционального белка TurboGFP в детектируемых количествах).

3. Система экспрессии « $P_{nh569} - cblA$ » в штамме *E. coli* XL1-Blue не регулировалась ионами кобальта. Так как уровень экспрессии репортёрного гена TurboRFP оставался конститутивно высоким независимо от присутствия ионов кобальта в среде, можно было предположить, что проблема заключалась в отсутствии репрессии системы в отсутствие ионов кобальта. Это могло быть вызвано несколькими независимыми причинами: отсутствием активности регуляторной области  $P_{cblA}$  (транскрипционной и/или трансляционной), некорректным фолдингом белка CblA и/или его деградацией в клетках *E. coli* XL1-Blue, неэффективным связыванием белка CblA с ДНК в области  $P_{nh569}$ .

Таким образом система « $P_{nh569} - cblA$ » не может быть применима для гетерологичной экспрессии генов в клетках *E. coli* XL1-Blue в своем нативном виде. При этом использование регуляторной области  $P_{nh569}$  возможно при условии сшивания с функционирующим в этом организме RBS.

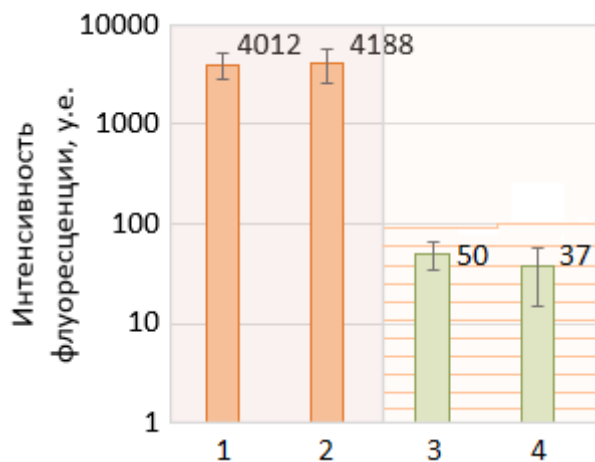


Рисунок 3.46 – Интенсивность флуоресценции штамма *E. coli* XL1 pRY3-CblA- $P_{nh}$ -GFP-RFP. Культуры выращены в жидкой среде LB в присутствии ионов кобальта (1 и 3) и в отсутствие ионов кобальта (2 и 4) в течение 48 часов. Измерения 1 и 2 проведены в области TurboRFP, измерения 3 и 4 – TurboGFP. Оранжевыми полосами обозначена рассчитанная зона «засвета» белка TurboRFP в область измерения TurboGFP

### 3.3.6.4. Проверка функциональности сконструированной плазмиды pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP в штамме *R. rhodochrous* M33 del

Результаты тестирования системы «P<sub>nh569</sub> – cblA» в *E. coli* могли быть также частично вызваны особенностями конструирования плазмиды pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP:

1. Область P<sub>cblA</sub> (283 п.н) могла иметь недостаточную длину и не содержать промотор гена *cblA* в случае его удаленного расположения от старт-кодона гена. Это могло привести к ошибочной интерпретации системы «P<sub>nh569</sub> – cblA» как неспособной к регуляции ионами кобальта в *E. coli*.

2. Подстановка гена *turboGFP* в новое окружение (регуляторная область P<sub>nh569</sub> перед геном и RBS<sub>E.coli</sub> после гена) могли привести к изменениям в 5'- и 3'- нетранслируемых областях мРНК гена, в том числе формированию вторичных структур, снижающих уровень экспрессии гена. В таком случае отсутствие флуоресценции в области измерения TurboGFP могло быть вызвано этими изменениями, а не низкой эффективностью RBS, входящего в регуляторную область P<sub>nh569</sub>.

Для того, чтобы исключить эти ошибки, плазмиду pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP с помощью конъюгации ввели в штамм *R. rhodochrous* M33 del. Полученный штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP выращивали в жидкой среде MS в стандартных условиях в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в среде в течении 96 часов. Динамика ИФ штамма приведена на Рисунке 3.47.

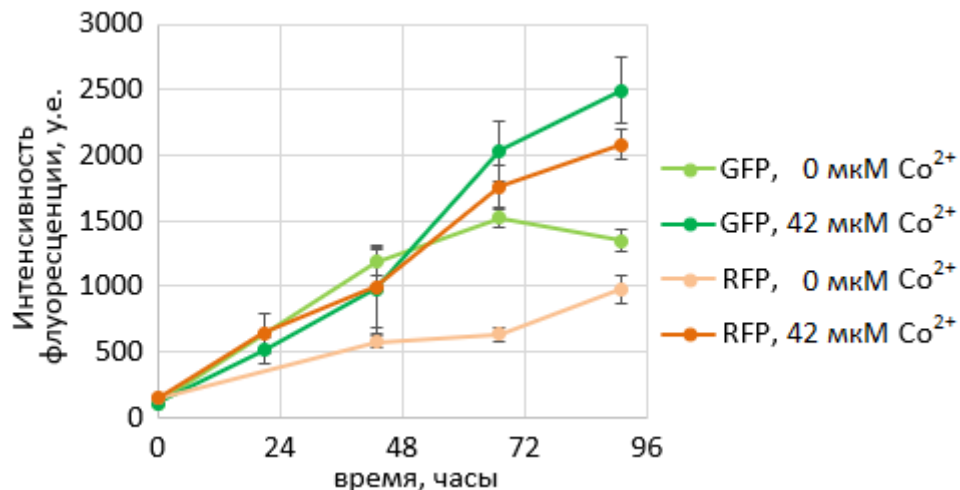


Рисунок 3.47 – Динамика интенсивности флуоресценции штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP. Культуры выращивали в жидкой среде при стандартных условиях

В штамме *R. rhodochrous* M33 del pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP флуоресценция наблюдалась в обеих областях измерения, что указывало на успешный синтез белков TurboGFP и TurboRFP. Таким образом удалось подтвердить, что отсутствие флуоресценции штамма *E. coli* XL1 pRY3-



CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP в области измерения TurboGFP обуславливалось именно отсутствием у RBS, входящего в область P<sub>nh569</sub>, трансляционной активности в клетках *E. coli*.

Величина ИФ штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP повышалась в присутствии ионов кобальта в среде. Степень индуцибельности различалась для двух флуоресцентных белков: от 1,3 до 1,9 раз для TurboGFP и от 2,1 до 2,7 раз для TurboRFP. Так как оба белка транслировались с единой молекулы мРНК, эта разница в степени индуцибельности вероятно была вызвана различиями во времени жизни белков или различиями в их взаимодействии с компонентами клетками, в том числе, с ионами кобальта. Поскольку индукция ионами кобальта наблюдалась в штамме *R. rhodochrous* M33 del pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP, то можно было заключить, что длина области P<sub>cblA</sub> была достаточной для успешной транскрипции гена *cblA* и, следовательно, система экспрессии «P<sub>nh569</sub> – *cblA*» не регулировалась ионами кобальта в штамме *E. coli* XL1 pRY3-CblA-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP действительно ввиду причин, приведенных в Разделе 3.3.6.3.

В результате изучения генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы, была частично выявлена структура регуляторной области P<sub>nh569</sub>. Было показано, что она содержит функциональный регулируемый промотор в составе участка длиной 165 п.н., отдалённого на 405 п.н. от старт-кодона, а также беспромоторный участок с неизвестной функцией, расположенный между промотором и старт-кодоном; удаление беспромоторного участка значительно снижает транскрипционную активность области P<sub>nh569</sub>. Было доказано, что продукт гена *cblA* является репрессором, осуществляющим кобальт-зависимую регуляцию транскрипционной активности регуляторной области P<sub>nh569</sub>, а продукты генов *nhmC*, *nhmD* и *nhmG* не участвуют в этой регуляции. Было показано, что степень индуцибельности системы экспрессии «P<sub>nh569</sub> - *cblA*» в клетках бактерий *R. rhodochrous* зависит от источников углерода и азота, а также концентрации двухвалентных ионов кобальта или никеля в среде и достигает 79 раз. Кроме того, было обнаружено, что регуляторная область P<sub>nh569</sub> проявляет высокую транскрипционную активность в клетках *E. coli* и *R. qingshengii*, при чем в последнем случае уровень активности регулируется ионами кобальта.

### 3.4. Конструирование биокатализаторов синтеза N-замещённых акриламидов на основе штаммов *Rhodococcus rhodochrous* и элементов системы экспрессии «P<sub>nh569</sub> – cblA»

3.4.1. Конструирование штаммов *Rhodococcus rhodochrous* с высоким уровнем ациламидазной активности

3.4.1.1. Разработка стратегии конструирования штаммов-биокатализаторов для синтеза N-замещённых акриламидов

Поскольку фермент ациламидаза был способен синтезировать N-замещённые акриламиды, на данном этапе работы он использовался как целевой фермент для конструирования штаммов-биокатализаторов. Для выбора стратегии конструирования было проведено сравнение ациламидазной активностей клеток всех полученных в данной работе штаммов (Таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Ациламидазная активность клеток штаммов, использованных в работе

Штамм	Ациламидазная активность клеток, ед.	
	42 мкМ Co <sup>2+</sup>	0 мкМ Co <sup>2+</sup>
рекомбинантные штаммы (см. Разделы 3.2 и 3.3)*		
<i>R. rhodochrous</i> M33 aam I	3,7 ± 0,6	1,5 ± 0,1
<i>R. rhodochrous</i> M33 aam II	3,7 ± 0,5	1,5 ± 0,1
<i>R. rhodochrous</i> M33 aam	4,5 ± 0,6	1,4 ± 0,2
<i>R. rhodochrous</i> M33 P <sub>nh569</sub> -aam	3,9 ± 0,3	1,3 ± 0,2
<i>R. rhodochrous</i> M33 P <sub>nh190</sub> -aam	1,5 ± 0,3	0,9 ± 0,2
<i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-1	1,6 ± 0,6	0,2 ± 0,1
<i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-9	< 0,1	< 0,1
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-1	2,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-6	2,6 ± 0,2	2,0 ± 0,3
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-6,5	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,2
<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-8	3,4 ± 0,3	1,8 ± 0,1
<i>R. qingshengii</i> TA37 pRY1-8	1,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
*штаммы, активность которых была ниже порогового значения в 0,01 ед., не приведены		

Исходя из приведенных результатов видно, что введение в экспрессионную кассету участка 2Tfd в непосредственной близости к регуляторной области P<sub>nh569</sub> привело к снижению ациламидазной активности клеток (штаммы *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1, pRY1-6 и pRY1-6,5

по сравнению со штаммами M33 P<sub>nh569</sub>-aam, M33 aam I и M33 aam II). Причины такого снижения могли быть связаны с различными не изучаемыми в данной работе факторами, например, с пространственными затруднениями посадки РНК-полимеразы. Поскольку участок 2Tfd использовали для исключения протекания транскрипции с вышерасположенных промоторов, то для конструирования штамма-биокатализатора с индуцибельным характером экспрессии целевого фермента (*R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up) этот участок решили расположить на большем отдалении от регуляторной области P<sub>nh569</sub>.

Для конструирования штамма-биокатализатора с конститутивным характером экспрессии целевого фермента (*R. rhodochrous* M33 del pRY1-7) участок 2Tfd и гены *nhmG-cblA* исключили из экспрессионной кассеты. Так как штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8 демонстрировал наиболее высокие уровни ациламидазной активности клеток по сравнению со всей серией штаммов pRY1-m, его 3'-окружение целевого гена приняли за наиболее удачный вариант и использовали для конструирования штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7.

#### 3.4.1.2. Конструирование интегративных плазмид pRY1-1up и pRY1-7

Структуры кассет pRY1-1up и pRY1-7 отличались от созданной ранее серии pRY1-m, поэтому их конструирование проводили по измененной схеме. На первом этапе решили создать промежуточные плазмидные векторы pRY1-Int-2Tfd и pRY1-Int, которые затем можно было бы использовать для конструирования новых серий интегративных экспрессионных плазмид.

Идея конструирования векторов pRY1-Int-2Tfd и pRY1-Int заключалась в том, чтобы создать универсальные интегративные векторы на основе вектора pRY1, содержащие плечо для интеграции в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 del (фрагмент Int) и/или фрагмент 2Tfd с двойным терминатором транскрипции из бактериофага *fd*, а также сайт множественного клонирования (MCS). В качестве MCS решили использовать сайты рестрикции *BcuI*, *MluI*, *NheI* и *EcoRI* (Рисунок 3.48).

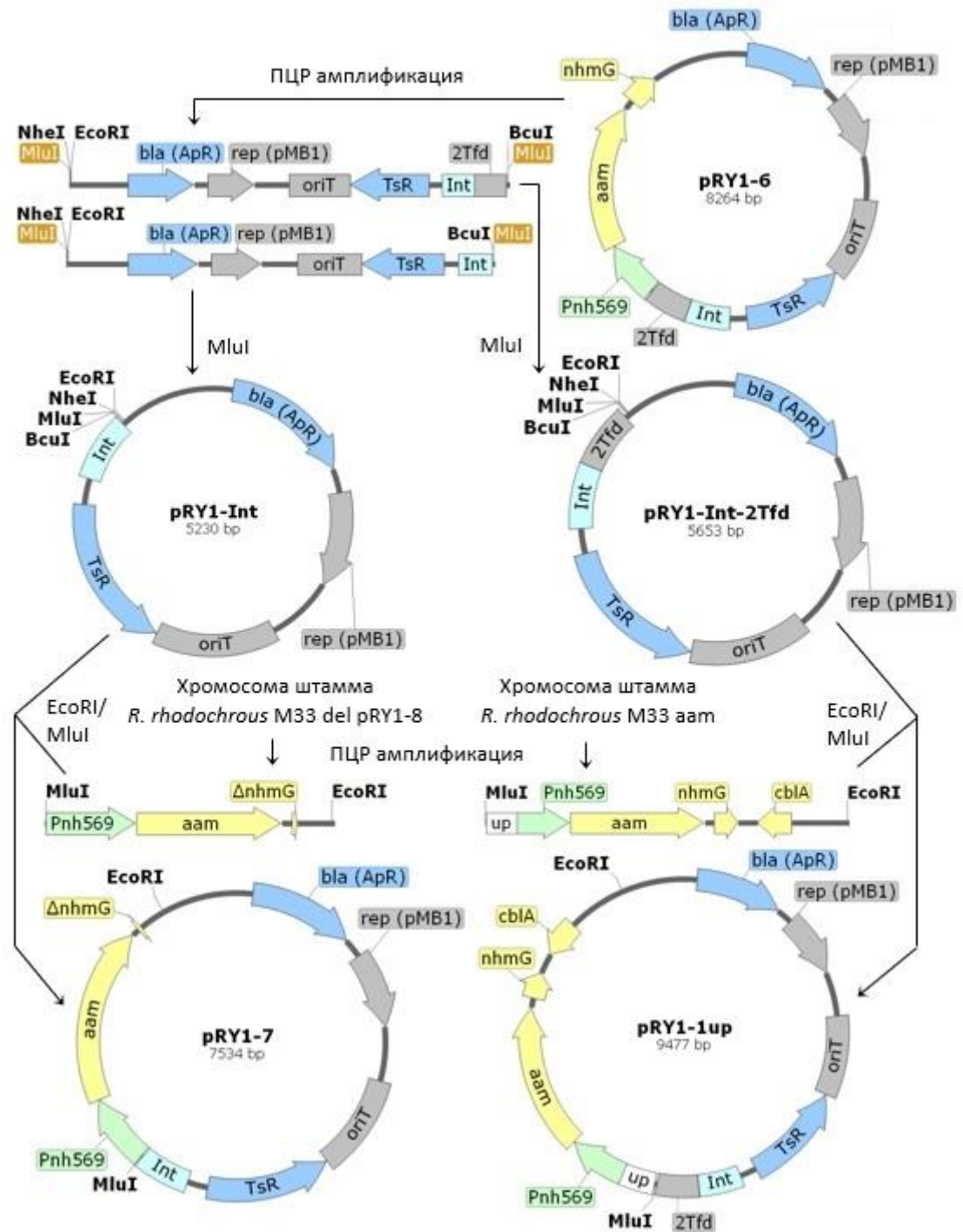


Рисунок 3.48 – Схема конструирования векторов pRY1-7 и pRY1-1up. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *BcuI*, *MluI*, *NheI* и *EcoRI*. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

Плазмидный вектор pRY1-6 использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР амплификации фрагментов *MluI-NheI-EcoRI-pRY1-Int-2Tfd-BcuI-MluI* и *MluI-NheI-EcoRI-pRY1-Int-BcuI-MluI* с помощью праймеров For-pRY1-EcoRI и Rev-pRY1-2Tfd, Rev-pRY1-Int, содержащих в своем составе указанные сайты рестрикции. Замыкание полученных линейных

фрагментов ДНК в кольцевые молекулы векторов pRY1-Int-2Tfd и pRY1-Int проводили через рестрикцию по сайтам *MluI*, фланкирующих фрагменты ДНК с обоих концов, и последующее лигирование по липким концам с сохранением сайта *MluI*.

Хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 aam использовали в качестве матрицы для ПЦР амплификации фрагмента upP<sub>nh569</sub>-aam-nhmG-cblA с помощью праймеров F7-Del и R1-Del, хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8 – для ПЦР амплификации фрагмента P<sub>nh569</sub>-aam-ΔnhmG с помощью праймеров F6-Del и R6-Del. Праймеры F6-Del и F7-Del содержали сайт рестрикции *MluI*, праймеры R1-Del и R6-Del – сайт рестрикции *EcoRI*, введенные сайты использовали для последующих процедур рестрикции и лигирования. Участок up длиной 326 п.н. перед регуляторной областью P<sub>nh569</sub> не содержал каких-либо предсказанных функциональных частей и был использован в качестве разделительного пространства для отдаления участка 2Tfd от сайтов посадки РНК-полимеразы. Место посадки праймера R6-Del было выбрано таким образом, чтобы фрагмент P<sub>nh569</sub>-aam-ΔnhmG содержал на своем 3'-коне после целевого гена *aam* область длиной 307 п.н., сформированную при делеции гена *nhmG* в штамме *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8. Фрагмент upP<sub>nh569</sub>-aam-nhmG-cblA клонировали в вектор pRY1-Int-2Tfd, фрагмент P<sub>nh569</sub>-aam-ΔnhmG – в вектор pRY1-Int. Полученные плазмидные векторы назвали pRY1-1up и pRY1-7.

#### 3.4.1.3. Конструирование штаммов-биокатализаторов *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up и *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7

Интеграционные плазмиды pRY1-1up и pRY1-7 ввели в штамм *R. rhodochrous* M33 del с помощью конъюгативного переноса. Селекцию клонов проводили после первого кросса гомологичной рекомбинации, так как конструкция векторов не предусматривала проведения второго кросса и выщепления тела плазмиды из состава хромосомы. Таким образом были получены штаммы *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up и *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 (Рисунок 3.49).

Штаммы *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 и *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в среде в течение 96 часов. Результаты измерения ациламидазной активности клеток представлены на Рисунке 3.50.

Штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 демонстрировал конститутивный характер экспрессии гена ациламидазы, не зависящий от присутствия ионов кобальта в среде. Удаление области 2Tfd и генов *nhmG-cblA* из экспрессионной кассеты, а также сохранение 3'-конца исходного транскрипта позволила повысить ациламидазную активность клеток до  $5,6 \pm 0,4$  ед., что являлось максимальным уровнем среди всех рекомбинантных штаммов, сконструированных в данной работе.



Кроме того, штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up выращивали в жидкой среде MS с различными концентрациями ионов кобальта в среде, аналогично ранее проведенным выращиванием штамма *R. rhodochrous* M33 aam (см. Раздел 3.3.4.3). Измерения ациламидазной активности клеток показали, что зависимость степени индуцибельности штамма-биокатализатора от количества ионов кобальта в среде соответствовала таковой зависимости штамма *R. rhodochrous* M33 aam. Таким образом, желаемый уровень ациламидазной активности клеток штамма-биокатализатора можно было получать путем добавления соответствующего количества ионов кобальта (Рисунок 3.51).

Полученные результаты демонстрируют, что выбранные стратегии конструирования новых штаммов биокатализаторов, позволили достигнуть поставленных задач.

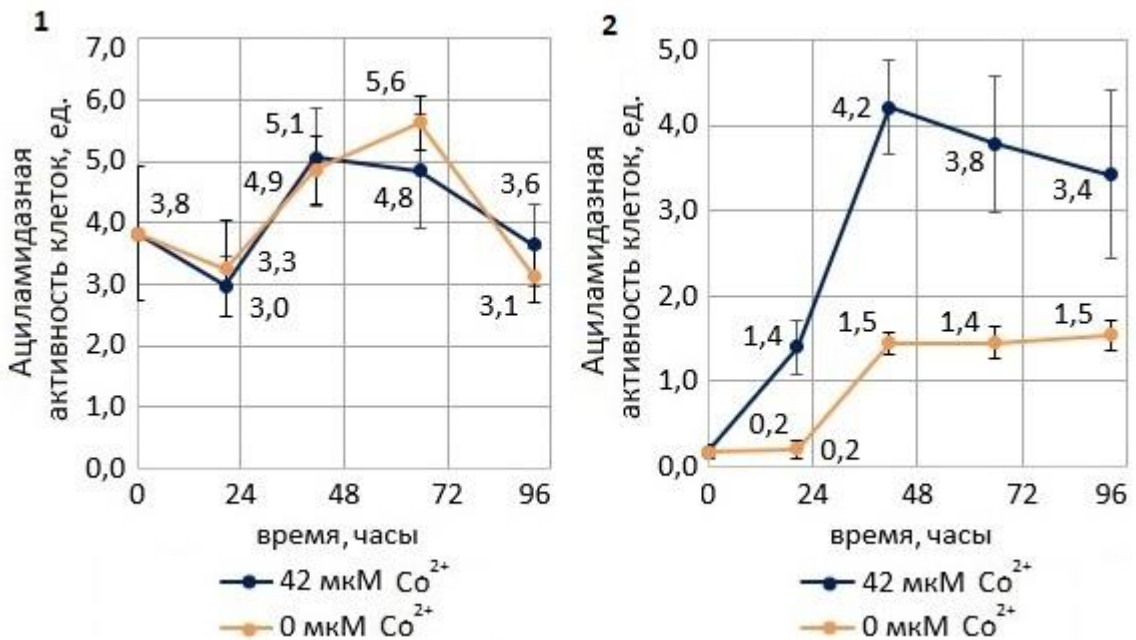


Рисунок 3.50 – Динамика ациламидазной активности клеток штаммов-биокатализаторов *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 (1) и M33 del pRY1-1up (2). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях



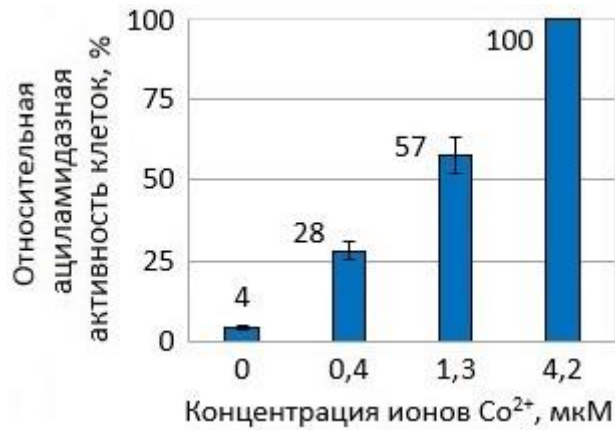


Рисунок 3.51 – Влияние концентрации ионов кобальта в среде на ациламидазную активность клеток штамма-биокатализатора *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up. Культуры выращивали в жидкой среде при стандартных условиях в течении 96 часов, в качестве источника азота использовали нитрат аммония, 2 г/л. Активность культуры, выращенной при концентрации 4,2 мкМ ионов кобальта в среде, приняли за 100 %

#### 3.4.2. Биокаталитический синтез N-замещённых акриламидов с использованием штамма *Rhodococcus rhodochrous* M33 del pRY1-7

Способности новых штаммов-биокатализаторов, сконструированных на основе бактерий *R. rhodochrous*, к синтезу N-замещённых (функционализированных) акриламидов было решено оценить по синтезу ИПАА и ДМАПАА с помощью одного из этих штаммов, *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7. Схемы катализируемых ациламидазой реакций синтеза приведены на Рисунке 3.52.

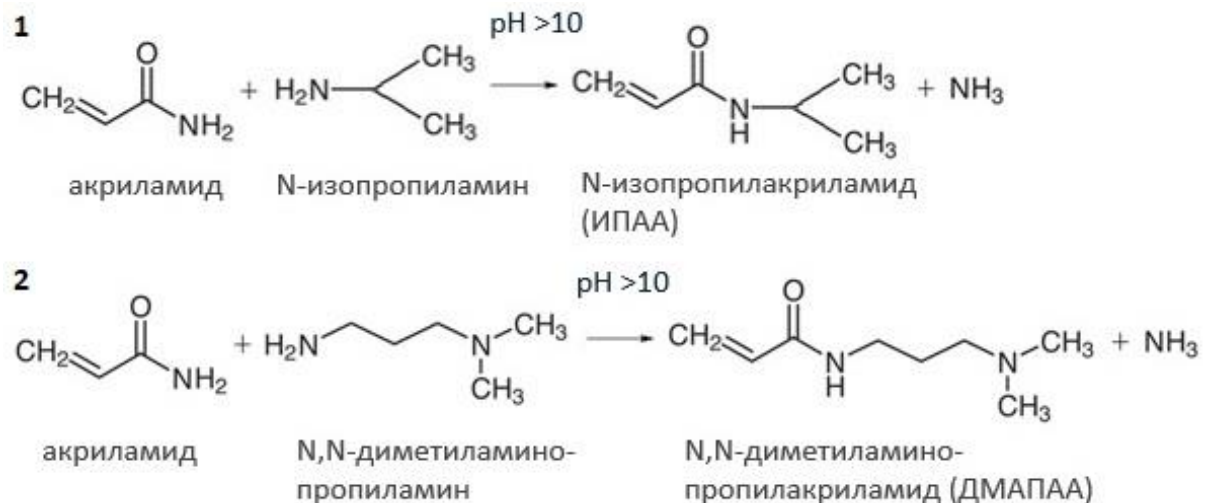


Рисунок 3.52 – Схемы синтеза N-замещённых акриламидов, катализируемого ферментом ациламидазой. (1): синтез ИПАА, (2): синтез ДМАПАА



Для синтеза использовали клетки штамма *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7, выращенного в стандартных условиях в жидкой среде MS в отсутствие ионов кобальта и имеющего ациламидазную активность клеток равную 5,3 ед. В результате синтеза концентрация продуктов в реакционных смесях составила 32 г/л. ИПАА и 8 г/л. ДМАПАА (Таблица 3.17), что превышало концентрации соответствующих веществ, получаемых ранее в сходных условиях синтеза с помощью штамма-биокатализатора первого поколения (*R. qingshengii* TA37), ациламидазная активность клеток которого составляла 3,0 ед. (максимально возможная для этого штамма) [167]. Указываемая ранее концентрация клеток в процессе синтеза (8 г/л) [167] была скорректирована ввиду уточнения коэффициента пересчета оптической плотности суспензии клеток в концентрацию клеток и по уточненным данным составила 10 г/л. Результаты синтеза и некоторые параметры проведения процесса указаны в Таблице 3.17.

Важно отметить, что получение активной биомассы биокатализатора первого поколения *R. qingshengii* TA37 требовало добавки в питательную среду дорогостоящего индуктора – ИПАА – в концентрации 2 г/л. Поскольку ИПАА являлся целевым продуктом биокаталитического синтеза, его использование на шаге выращивания культуры было нежелательно с экономической точки зрения. Кроме того, для выращивания данного штамма было необходимо использовать добавку дрожжевого экстракта (1 г/л), необходимого для роста клеток. Процедура получения активной биомассы нового биокатализатора *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 не требовала использования этих веществ.

Новый штамм-биокатализатор, сконструированный на основе бактерий *R. rhodochrous* с использованием регуляторной области P<sub>nh569</sub>, обладает рядом преимуществ над штаммом-биокатализатором первого поколения, *R. qingshengii* TA37. Во-первых, это отсутствие необходимости в незаменимых для получения активной биомассы клеток штамма *R. qingshengii* TA37 дорогостоящих компонентах среды – ИПАА и дрожжевом экстракте. Во-вторых, это практически вдвое повышенная целевая (ацилтрансферазная) активность клеток. Наконец, в-третьих, сконструированные штаммы-биокатализаторы демонстрируют, что бактерии *R. rhodochrous* и генетических элементы регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы (регуляторной области P<sub>nh569</sub> и ген *cblA*) являются удобной платформой и инструментами для конструирования новых биокатализаторов с высоким и, при необходимости, регулируемым уровнем ферментативной активности.

Таблица 3.17 – Параметры процессов биокаталитического синтеза N-замещённых акриламидов

Параметр	<i>R. qingshengii</i> TA37	<i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-7
Синтез ИПАА		
концентрация клеток в процессе синтеза, г/л	10	10
концентрация N-изопропиламина, г/л	25	30
концентрация акриламида, г/л	30	60
pH	10	10
температура, ° C	37	37
время синтеза, часы	6	7
концентрация ИПАА после проведения синтеза, г/л	11	32
Синтез ДМАПАА		
концентрация клеток в процессе синтеза, г/л	10	10
концентрация диметиламинопропиламина, г/л	25	30
концентрация акриламида, г/л	30	60
pH	10	10
температура, ° C	37	37
время синтеза, часы	24	24
концентрация ДМАПАА после проведения синтеза, г/л	5	8

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все поставленные задачи были выполнены в полном объеме, что позволило достичь цели работы по выявлению и изучению генетических элементов, вовлечённых в кобальт-зависимую регуляцию транскрипции генов нитрилгидратазы в штамме *Rhodococcus rhodochrous* M8, и использованию этих элементов для экспрессии гена ациламидазы и конструирования штаммов-биокатализаторов синтеза N-замещённых (функционализированных) акриламидов.

В ходе работы было выявлено и изучено два генетических элемента, вовлечённых в кобальт-зависимую экспрессию генов нитрилгидратазы в штамме *R. rhodochrous* M8.

Первый элемент – регуляторная область  $P_{nh569}$  – был охарактеризован по всем основным параметрам, сформулированным в ходе литературного обзора регуляторных областей и промоторов, используемых для экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus*. Было показано, что регуляторная область  $P_{nh569}$  является индуцибельной, при этом индукция экспрессии происходит на стадии транскрипции в присутствии двухвалентных ионов кобальта. Были определены «базовый» и максимальный уровни экспрессии и рассчитана степень индуцибельности в присутствии ионов кобальта. Дополнительно было показано влияние состава питательной среды, а именно источников углерода и азота, на уровень экспрессии репортёрного гена. С учетом этого влияния степень индуцибельности экспрессии в присутствии ионов кобальта составила от 3,0 до 17,6 раз. Общий диапазон, в пределах которого было возможно изменение экспрессии репортёрного гена при варьировании как состава питательной среды, так и концентрации ионов кобальта в среде, составил 79 раз. Была продемонстрирована возможность плавной регулировки экспрессии с помощью изменения концентрации ионов кобальта в среде. Был установлен ген регуляторного белка (*cbIA*), являющегося репрессором транскрипционной активности промотора, расположенного в области  $P_{nh569}$ . Возможность межвидового переноса генетической системы « $P_{nh569} - cbIA$ » с сохранением регулирования уровня экспрессии ионами кобальта была показана на примере штамма *R. qingshengii* TA37. При межродовом переносе генетической системы « $P_{nh569} - cbIA$ » в клетки *E. coli* детектировалась транскрипционная активность области  $P_{nh569}$ , однако регуляции экспрессии ионами кобальта зафиксировано не было. Кроме того, в клетках *E. coli* не была подтверждена эффективность RBS, входящего в область  $P_{nh569}$ , поэтому использование системы « $P_{nh569} - cbIA$ » в других родах бактерий потребует проведения дополнительных исследований.

Создание ряда делеционных вариантов регуляторной области  $P_{nh569}$  и изучение их транскрипционной активности позволило определить, что инициация транскрипции происходит на участке длиной 165 п.н., удаленном от старт-кодона экспрессируемого гена на расстояние в 404 п.н. Транскрипция, контролируемая этим участком, была подвержена регуляции ионами

кобальта. Полученные экспериментальные данные согласовались с результатами биоинформатического анализа: область  $P_{nh165}$  содержала предсказанный промотор P1 и 6 несовершенных инвертированных повторов, которые могли являться сайтами посадки транскрипционного репрессора CblA. Однако, использование регуляторной области  $P_{nh165}$  не позволило добиться уровня экспрессии репортёрного гена, достигаемого при использовании области  $P_{nh569}$ , что свидетельствовало о существовании дополнительных функциональных элементов в составе удаленного участка, которые не были изучены в настоящей работе.

При изучении кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы было рассмотрено два альтернативных механизма регуляции: регуляция с помощью металло-чувствительного рибопереключателя или с помощью металло-чувствительного регуляторного белка. Биоинформатический поиск рибопереключателей в области  $P_{nh569}$  показал отсутствие их известных мотивов на данном участке. Отсутствие кобальт-зависимой регуляции транскрипции в экспрессионной кассете вида « $P_{nh569}$ -репортёрный белок» в штамме с полностью делетированным кластером генов нитрилгидратазы также указывало на отсутствие регуляторных структур в 5'-нетранслируемой области мРНК. Из нескольких генов, кодирующих предполагаемые кобальт-чувствительные регуляторы, контролирующие транскрипционную активность регуляторной области  $P_{nh569}$ , гены *nhmC*, *nhmD* и *nhmG* были признаны не участвующими в кобальт-зависимой регуляции транскрипции, так их удаление не влияло на индуцибельность транскрипции репортёрного гена ионами кобальта. Удаление гена *cblA* напротив, привело к исчезновению индуцибельности транскрипции репортёрного гена ионами кобальта. При этом транскрипционная активность области  $P_{nh569}$  носила конститутивный характер вне зависимости от присутствия ионов кобальта в среде и достигала уровня активности штамма, содержащего ген *cblA*, выращенного в присутствии ионов кобальта.

Таким образом вторым генетическим элементом, участвующим в кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы, является транскрипционный репрессор CblA. На основе гомологии с известными регуляторами белок CblA был отнесен к семейству металло-чувствительных ТФ ArsR-SmtB, и была предложена модель осуществляемой им регуляции. Согласно предложенной модели в отсутствие ионов кобальта белок CblA находится в связанном состоянии с молекулой ДНК в районе боксов промотора P1, входящего в регуляторную область  $P_{nh569}$ . Взаимодействие с ионами кобальта приводит к изменению конформации белка CblA и его диссоциации от молекулы ДНК, что делает промотор доступным для связывания с РНК-полимеразой для инициации транскрипции. Дополнительно было показано, что система « $P_{nh569}$  – *cblA*» сходным образом реагирует на присутствие в среде ионов никеля, но не реагирует

на присутствие ионов цинка, кадмия, свинца и мышьяка, на основе чего было сделано предположение, что специфичность белка CblA ограничивается ионами кобальта и никеля.

Для изучения генетической регуляции транскрипции был успешно использован фермент ациламидаза, который был признан новым удобным репортёрным белком для бактерий рода *Rhodococcus*.

На основе штаммов, производных от штамма *R. rhodochrous* M8, были созданы рекомбинантные штаммы-биокатализаторы *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up и *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7. Использование изученных генетических элементов (области P<sub>nh569</sub> и гена *cblA* в штамме *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up и области P<sub>nh569</sub> в отсутствие гена *cblA* в штамме *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7) позволило достичь высокого уровня экспрессии гена ациламидазы и получить штаммы с высокой ацилтрансферазной активностью. Штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-7 с конститутивной экспрессией гена ациламидазы был использован в качестве цельноклеточного биокатализатора для синтеза N-замещённых акриламидов ИПАА и ДМАПАА, что позволило изменить параметры получения биокатализатора по сравнению с биокатализатором на основе штамма *R. qingshengii* TA37 на более выгодные (отсутствие необходимости в добавке дорогостоящего индуктора на стадии выращивания микроорганизма) с увеличением выхода целевых продуктов.

По результатам выполненной работы можно сделать 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<sub>nh569</sub>), проявляющая высокую транскрипционную активность;

3. показано, что регуляторная область P<sub>nh569</sub> 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<sub>nh569</sub>;

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<sub>nh569</sub> 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АА – акриламид

АН – акрилонитрил

АТФ – аденозинтрифосфат

ДМАПАА – N,N-диметиламино-пропилакриламид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН-ПААГ электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия

ИПА – изопропиламин

ИПАА – изопропилакриламид

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

ИФ – интенсивности флуоресценции

кДНК – комплиментарная дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАА – 4'-нитроацетанилид

НАД(Ф) – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат)

ОП – оптическая плотность

ПААГ – полиакриламидный гель

п-НА – п-нитроанилин

ПЦР (PCR) – полимеразная цепная реакция (Polymerase Chain Reaction)

РНК – рибонуклеиновая кислота

тДНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

ТФ – транскрипционный фактор

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

АА/А АВС TSB protein – аминокислота/амид- субстрат-связывающий белок АТФ-связывающего кассетного транспортера (Amino Acid/Amide ATP-Binding Cassette Transporter Substrate-Binding protein)

ААЕР protein – белок, регулирующий экспрессию алифатической амидазы (Aliphatic Amidase Expression-Regulating protein)

АВС TSB protein – субстрат-связывающий белок АТФ-связывающего кассетного транспортера (ATP-Binding Cassette Transporter Substrate-Binding protein)

ВН среда – среда из сердечно-мозговой вытяжки (Brain and Heart)

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

BLASTN – Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

BPRM – Bacterial PROMoter Prediction Program

COBALT NCBI – COntstraint-Based Multiple ALignment Tool of National Center for Biotechnology Information

EMBOSS – European Molecular Biology Open Software Suite

HP – гипотетический белок с неизвестной функцией (Hypothetical Protein)

HTH белок – белок содержащий мотив «спираль-поворот-спираль» (Helix-Turn-Helix)

Infernal – INFERENCE of RNA ALignment

LB среда - среда Луриа-Бертани (Luria-Bertani)

M ArsR/SmtB F TF – транскрипционный металло-регулятор ArsR-SmtB семейства (Metalloregulator ArsR-SmtB Family Transcription Factor)

MarR F TR – транскрипционный регулятор семейства MarR (MarR Family Transcriptional Regulator)

MCS – сайт множественного клонирования (Multiple Cloning Site)

MS среда – минеральная синтетическая среда (Mineral Synthetic)

NCBI GenBank – Genetic Sequence Data Bank of National Center for Biotechnology Information

NH AP – вспомогательный белок нитрилгидратазы (Nitrile Hydratase Accessory Protein)

NH-b homologue – гомолог  $\beta$ -субъединицы нитрилгидратазы (Nitrile Hydratase- $\beta$  homologue)

NH regulator – белок регулятор экспрессии нитрилгидратазы (Nitrile Hydratase regulator)

Ni(II)/Co(II)-S MTR – транскрипционный репрессор, участвующий в металло-зависимой регуляции, чувствительный к ионам  $Ni^{2+}$  и  $Co^{2+}$  (Ni(II)/Co(II)-Sensing Metalloregulatory Transcriptional Repressor)

NNPP – Neural Network Promoter Prediction

ORF – открытая рамка считывания (Open Reading Frame)

RBS – сайт связывания рибосомы (Ribosome Binding Site)

RT-qPCR – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction)

SAPPHIRE – Sequence Analyser for the Prediction of Prokaryote Homology Inferred Regulatory Elements

SBDC protein – белок, содержащий субстрат-связывающий домен (Substrate-Binding Domain-Containing protein)

SD – сайт Шайна-Дальгарно (Shine-Dalgarno)

SDS – додецилсульфат натрия (Sodium Dodecyl Sulfate)

TurboGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein)

TurboRFP – улучшенный красный флуоресцентный белок (Red Fluorescent Protein)



UniProtKB – UniProt KnowledgeBase

Urea ABC TSB protein – мочевино- субстрат-связывающий белок АТФ-связывающего кассетного транспортера (urea ATP-Binding Cassette Transporter Substrate-Binding protein)

W НТН – белок, имеющий мотив «крылатая спираль-поворот-спираль» (Winged Helix-Turn-Helix)

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

2Tfd: фрагмент ДНК длиной 405 п.н., содержит двойной терминатор транскрипции из бактериофага *fd*

$\Delta nhmD$ : фрагмент гена *nhmD*

$\Delta nhmG$ : фрагмент гена *nhmG*

$\Delta P_{nh}$ : нефункциональный фрагмент регуляторной области  $P_{nh569}$  длиной 308 п.н.

*aam* ( $A_{am}$ ): ген ациламидазы (белок ациламидаза)

*aam509*: нефункциональный фрагмент гена ациламидазы длиной 509 п.н.

$Ap^R$ : фенотип устойчивости к ампициллину

$Apr^R$ : фенотип устойчивости к апрамицину

AAC(3)-IV ( $Apr^R$ ): ген аминогликозид 3-N-ацетилтрансферазы, придает штаммам устойчивость к апрамицину

*bla* ( $Ap^R$ ): ген  $\beta$ -лактамазы, придает штаммам *E. coli* устойчивость к ампициллину

*cblA* ( $CblA$ ): ген транскрипционного металло-регулятора (белок металло-регулятора)

*gyrB*: ген гиразы

*Int*: фрагмент ДНК длиной 419 п.н. используемый в качестве плеча для гомологичной рекомбинации

*IS*: фрагмент транспозазы семейства IS1164

*IS416*: фрагмент IS-плеча длиной 416 п.н.

*lacZa*: ген  $\beta$ -галактозидазы, необходим для сине-белой селекции

*nhmA* ( $NhmA$ ): ген  $\alpha$ -субъединицы нитрилгидратазы ( $\alpha$ -субъединица нитрилгидратазы)

*nhmB* ( $NhmB$ ): ген  $\beta$ -субъединицы нитрилгидратазы ( $\beta$ -субъединица нитрилгидратазы)

*nhmBA*: гены фермента нитрилгидратазы

*nhmBAG*: оперон нитрилгидратазы

*nhmC* ( $NhmC$ ): ген позитивного регулятора экспрессии нитрилгидратазы, предположительно вовлеченного в амид-зависимую регуляцию (белок регулятор экспрессии нитрилгидратазы)

*nhmD* ( $NhmD$ ): ген белка, предположительно являющегося позитивным регулятором экспрессии нитрилгидратазы (предположительно белок регулятор экспрессии нитрилгидратазы)

*nhmG* ( $NhmG$ ): ген металло-шаперона (белок металло-шаперон)

*oriT*: фрагмент ДНК, содержащий ориджин переноса из плазмиды RK2, необходим для мобилизации вектора и конъюгативного переноса

$P_{aam}$ : регуляторная область гена ациламидазы

*pBluescript*: фрагмент вектора *pBluescript II KS(-)*, содержащий репликон для экспрессии в *E. coli*

$P_{cblA}$ : регуляторная область гена *cblA*

$P_{nh25}/P_{nh31}/P_{nh157}/P_{nh235}/P_{nh408}/P_{nh512}$ : фрагменты регуляторной области оперона нитрилгидратазы длиной 25/31/157/235/408/512 п.н.

$P_{nh190}$ : уменьшенный вариант регуляторной области оперона нитрилгидратазы длиной 190 п.н

$P_{nh569}$ : регуляторная область оперона нитрилгидратазы длиной 569 п.н

pRC4: репликон для экспрессии в *R. rhodochrous*

гер (pMB1)/pMB1: репликон pMB1 для экспрессии в *E. coli*

RBS<sub>E.coli</sub>: сайт посадки рибосомы из плазмиды pTurboRFP-B функционирующий в *E. coli*

STOP-*nhmG*: ген металло-шаперона *nhmG*, в котором старт-кодон заменен на 2 стоп-кодона

T0: терминатор транскрипции из бактериофага  $\lambda$

T5/lacO: промотор из бактериофага T5, сшитый с лактозным оператором lacO

Ts<sup>R</sup>: ген/фенотип устойчивости к тиострептону

*turboGFP*: ген зеленого флуоресцентного белка

*turboRFP*: ген красного флуоресцентного белка

UP: фрагмент ДНК длиной 607 п.н. используемый в качестве плеча для гомологичной рекомбинации

up $P_{nh569}$ : регуляторная область оперона нитрилгидратазы  $P_{nh569}$  и нефункциональный фрагмент up длиной 326 п.н.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larkin, M. J. Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility / M. J. Larkin, L. A. Kulakov, C. C. R. Allen // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2005. – Vol. 16, № 3. – P. 282-290.
2. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* / L. Martínková, B. Uhnáková, M. Pátek et al. // *Environment International*. – 2009. – Vol. 35, № 1. – P. 162-177.
3. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways / D. Kim, K. Y. Choi, M. Yoo et al. // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 28, № 7. – P. 1037-1051.
4. de Carvalho, C. C. C. R. Adaptation of *Rhodococcus* to organic solvents / C. C. C. R. de Carvalho // *Biology of Rhodococcus* / Ed. H. Alvarez M. – Springer, Cham, 2019. – P. 103-135.
5. The effect of organic solvents on the viability and morphofunctional properties of *Rhodococcus* / I. O. Korshunova, O. N. Pistsova, M. S. Kuyukina et al. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2016. – Vol. 52, № 1. – P. 43-50.
6. Pátek, M. Stress response in *Rhodococcus* strains / M. Pátek, M. Grulich, J. Nešvera // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Vol. 53. – P. 107698.
7. Interaction of *Rhodococcus* with metals and biotechnological applications / A. Presentato, E. Piacenza, M. Cappelletti // *Biology of Rhodococcus* / Ed. H. Alvarez M. – Springer, Cham, 2019. – P. 333-357.
8. Henao, S. G. Heavy metals in soils and the remediation potential of bacteria associated with the plant microbiome / S. G. Henao, T. Ghneim-Herrera // *Frontiers in Environmental Science*. – 2021. – Vol. 9. – P. 604216.
9. Overexpression of epoxide hydrolase in *Rhodococcus ruber* with high robustness for the synthesis of chiral epichlorohydrin / Y. Liang, S. Jiao, M. Wang et al. // *Process Biochemistry*. – 2019. – Vol. 79. – P. 49-56.
10. Novel chaperones RrGroEL and RrGroES for activity and stability enhancement of nitrilase in *Escherichia coli* and *Rhodococcus ruber* / C. Xu, L. Tang, Y. Liang et al. // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, № 4. – P. 1002.
11. Insights into the metabolism of oleaginous *Rhodococcus* spp / H. M. Alvarez, O. M. Herrero, R. A. Silva et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2019. – Vol. 85, № 18. – P. e00498-19.
12. Development of *Rhodococcus opacus* as a chassis for lignin valorization and bioproduction of high-value compounds / W. E. Anthony, R. R. Carr, D. M. DeLorenzo et al. // *Biotechnology for Biofuels*. – 2019. – Vol. 12, № 1. – P. 192.

13. Comparative and functional genomics of *Rhodococcus opacus* PD630 for biofuels development / J. W. Holder, J. C. Ulrich, A. C. DeBono et al. // *PLoS Genetics*. – 2011. – Vol. 7, № 9. – P. e1002219.
14. Voss, I. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus* for lipid production at a pilot-plant scale / I. Voss, A. Steinbüchel // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2001. – Vol. 55. – P. 547-555.
15. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds / M. Cappelletti, A. Presentato, E. Piacenza et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104, № 20. – P. 8567-8594.
16. Advances in acrylamide bioproduction catalyzed with *Rhodococcus* cells harboring nitrile hydratase / S. Jiao, F. Li, H. Yu et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104, № 3. – P. 1001-1012.
17. Effect of heavy metals and other xenobiotics on biodegradation of waste canola oil by cold-adapted *Rhodococcus* sp. AQ5-07 / S. Ibrahim, A. Zulkharnain, K. N. M. Zahri et al. // *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. – 2020. – Vol. 19, № 3. – P. 1041-1052.
18. Krivoruchko, A. Advanced *Rhodococcus* biocatalysts for environmental biotechnologies / A. Krivoruchko, M. Kuyukina, I. Ivshina // *Catalysts*. – 2019. – Vol. 9, № 3. – P. 236.
19. Targeted disruption of the *kstD* gene encoding a 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1 / R. van der Geize, G. I. Hessels, R. van Gerwen et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – Vol. 66, № 5. – P. 2029-2036.
20. Molecular and biochemical characterization of the tetralin degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain TFB / L. Tomás-Gallardo, E. Santero, E. Camafeita et al. // *Microbial Biotechnology*. – 2009. – Vol. 2, № 2. – P. 262-273.
21. Nga, D. P. NpdR, a repressor involved in 2,4,6-trinitrophenol degradation in *Rhodococcus opacus* HL PM-1 / D. P. Nga, J. Altenbuchner, G. S. Heiss // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186, № 1. – P. 98-103.
22. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading Actinomycetes: analysis of multiple extradiol dioxygenase genes in dibenzofuran-degrading *Rhodococcus* species / T. Iida, Y. Mukouzaka, K. Nakamura et al. // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2002. – Vol. 66, № 7. – P. 1462-1472.
23. Biphenyl-inducible promoters in a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. RHA1 / H. Takeda, N. Hara, M. Sakai et al. // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2004. – Vol. 68, № 6. – P. 1249-1258.

24. Plasmid vectors for testing *in vivo* promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis* / M. Knoppová, M. Phensajjai, M. Veselý et al. // *Current Microbiology*. – 2007. – Vol. 55, № 3. – P. 234-239.
25. The *Ralstonia eutropha* H16 phasin PhaP1 is targeted to intracellular triacylglycerol inclusions in *Rhodococcus opacus* PD630 and *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155, and provides an anchor to target other proteins / J. Hänisch, M. Wältermann, H. Robenek et al. // *Microbiology*. – 2006. – Vol. 152, № 11. – P. 3271-3280.
26. Identification of nitrile hydratase-producing *Rhodococcus ruber* TH and characterization of an *amiE*-negative mutant / Y. Ma, H. Yu, W. Pan et al. // *Bioresource Technology*. – 2010. – Vol. 101, № 1. – P. 285-291.
27. Jiao, S. Core element characterization of *Rhodococcus* promoters and development of a promoter-RBS mini-pool with different activity levels for efficient gene expression / S. Jiao, H. Yu, Z. Shen // *New Biotechnology*. – 2018. – Vol. 44. – P. 41-49.
28. Ammonium acrylate biomanufacturing by an engineered *Rhodococcus ruber* with nitrilase overexpression and double-knockout of nitrile hydratase and amidase / J. Sun, H. Yu, J. Chen et al. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 43, № 12. – P. 1631-1639.
29. Yamamura, E.-T. Construction of *Rhodococcus* expression vectors and expression of the aminoalcohol dehydrogenase gene in *Rhodococcus erythropolis* / E.-T. Yamamura, // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 82, № 8. – P. 1396-1403.
30. Vector development, isolation of new promoters and enhancement of the catalytic activity of the dsz enzyme complex in *Rhodococcus* sp. strains / E. Franchi, F. Rodriguez, L. Serbolisca et al. // *Oil & Gas Science and Technology*. – 2003. – Vol. 58, № 4. – P. 515-520.
31. Functional differentiation of 3-ketosteroid  $\Delta^1$ -dehydrogenase isozymes in *Rhodococcus ruber* strain Chol-4 / G. Guevara, L. Fernández de las Heras, J. Perera et al. // *Microbial Cell Factories*. – 2017. – Vol. 16, № 1. – P. 42.
32. Characterization of key triacylglycerol biosynthesis processes in rhodococci / S. Amara, N. Seghezzi, H. Otani et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 24985.
33. Tomás-Gallardo, L. Involvement of a putative cyclic AMP receptor protein (CRP)-like binding sequence and a CRP-like protein in glucose-mediated catabolite repression of *thn* genes in *Rhodococcus* sp. strain TFB / L. Tomás-Gallardo, E. Santero, B. Floriano // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – Vol. 78, № 15. – P. 5460-5462.
34. Combination of degradation pathways for naphthalene utilization in *Rhodococcus* sp. strain TFB / L. Tomás-Gallardo, H. Gómez-Álvarez, E. Santero et al. // *Microbial Biotechnology*. – 2014. – Vol. 7, № 2. – P. 100-113.

35. Proteomic and transcriptional characterization of aromatic degradation pathways in *Rhodococcus* sp. strain TFB / L. Tomás-Gallardo, I. Canosa, E. Santero et al. // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6, № S1. – P. S119-S132.
36. Integrated omics study delineates the dynamics of lipid droplets in *Rhodococcus opacus* PD630 / Y. Chen, Y. Ding, L. Yang et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 42, № 2. – P. 1052-1064.
37. A novel molecular chaperone GroEL2 from *Rhodococcus ruber* and its fusion chimera with nitrile hydratase for co-enhanced activity and stability / Y. Chen, S. Jiao, M. Wang et al. // *Chemical Engineering Science*. – 2018. – Vol. 192. – P. 235-243.
38. Improving stress tolerance and cell integrity of *Rhodococcus ruber* by overexpressing small-shock-protein Hsp16 of *Rhodococcus* / M. Wang, J. Chen, H. Yu et al. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 45, № 10. – P. 929-938.
39. Global transcriptomic analysis of *Rhodococcus erythropolis* D310-1 in responding to chlorimuron-ethyl / Y. Cheng, H. Zang, H. Wang et al. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – Vol. 157. – P. 111-120.
40. Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons / K. Laczi, Á. Kis, B. Horváth et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 99, № 22. – P. 9745-9759.
41. Regulation of plasmid-encoded isoprene metabolism in *Rhodococcus*, a representative of an important link in the global isoprene cycle / A. T. Crombie, M. E. Khawand, V. A. Rhodius et al. // *Environmental Microbiology*. – 2015. – Vol. 17, № 9. – P. 3314-3329.
42. Transcriptional response of *Rhodococcus aetherivorans* I24 to polychlorinated biphenyl-contaminated sediments / E. Puglisi, M. J. Cahill, P. A. Lessard et al. // *Microbial Ecology*. – 2010. – Vol. 60. – P. 505-515.
43. Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp / W. W. Mohn, M. H. Wilbrink, I. Casabon et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2012. – Vol. 194, № 24. – P. 6712-6719.
44. Characterization of *p*-hydroxycinnamate catabolism in a soil Actinobacterium / H. Otani, Y.-E. Lee, I. Casabon et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2014. – Vol. 196, № 24. – P. 4293-4303.
45. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / E. R. Gonçalves, H. Hara, D. Miyazawa et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – Vol. 72, № 9. – P. 6183-6193.
46. Transcriptomic analysis reveals a bifurcated terephthalate degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / H. Hara, L. D. Eltis, J. E. Davies et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2007. – Vol. 189, № 5. – P. 1641-1647.

47. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages / R. van der Geize, K. Yam, T. Heuser et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – Vol. 104, № 6. – P. 1947-1952.
48. An inducible propane monooxygenase is responsible for *N*-nitrosodimethylamine degradation by *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / J. O. Sharp, C. M. Sales, J. C. LeBlanc et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, № 21. – P. 6930-6938.
49. LeBlanc, J. C. Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1 / J. C. LeBlanc, E. R. Gonçalves, W. W. Mohn // Applied and environmental microbiology. – 2008. – Vol. 74, № 9. – P. 2627-2636.
50. Induction of viable but nonculturable state in *Rhodococcus* and transcriptome analysis using RNA-seq / X. Su, L. Guo, L. Ding et al. // PloS One. – 2016. – Vol. 11, № 1. – P. e0147593.
51. Medium optimization of *Rhodococcus erythropolis* LSSE8-1 by Taguchi methodology for petroleum biodesulfurization / Y. Li, J. Xing, W. Li et al. // Korean Journal of Chemical Engineering. – 2007. – Vol. 24. – P. 781-786.
52. High-cell-density cultivation of an engineered *Rhodococcus opacus* strain for lipid production via co-fermentation of glucose and xylose / Q. Fei, S. J. Wewetzer, K. Kurosawa et al. // Process Biochemistry. – 2015. – Vol. 50, № 4. – P. 500-506.
53. Improved glycerol utilization by a triacylglycerol-producing *Rhodococcus opacus* strain for renewable fuels / K. Kurosawa, A. Radek, J. K. Plassmeier et al. // Biotechnology for Biofuels. – 2015. – Vol. 8, № 1. – P. 1-11.
54. Synthetic biology for manufacturing chemicals: constraints drive the use of non-conventional microbial platforms / J. Czajka, Q. Wang, Y. Wang et al. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2017. – Vol. 101, № 20. – P. 7427-7434.
55. Babitzke, P. Regulation of translation initiation by RNA binding proteins / P. Babitzke, C. S. Baker, T. Romeo // Annual Review of Microbiology. – 2009. – Vol. 63, № 1. – P. 27-44.
56. A riboswitch-based inducible gene expression system for Mycobacteria / J. C. Seeliger, S. Topp, K. M. Sogi et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. e29266.
57. Zhou, L.-B. Engineering a lysine-ON riboswitch for metabolic control of lysine production in *Corynebacterium glutamicum* / L.-B. Zhou, A.-P. Zeng // ACS Synthetic Biology. – 2015. – Vol. 4, № 12. – P. 1335-1340.
58. Rudolph, M. M. Synthetic riboswitches for the conditional control of gene expression in *Streptomyces coelicolor* / M. M. Rudolph, M.-P. Vockenhuber, B. Suess // Microbiology. – 2013. – Vol. 159, № 7. – P. 1416-1422.
59. Effect of structure of the initiator codon on translation in *E. coli* / Y. E. Khudyakov, V. S. Nepliyeva, T. I. Kalinina et al. // FEBS Letters. – 1988. – Vol. 232, № 2. – P. 369-371.



60. Measurements of translation initiation from all 64 codons in *E. coli* / A. Hecht, J. Glasgow, P. R. Jaschke et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45, № 7. – P. 3615-3626.
61. Mohanty, B. K. Regulation of mRNA decay in bacteria / B. K. Mohanty, S. R. Kushner // *Annual Review of Microbiology*. – 2016. – Vol. 70, № 1. – P. 25-44.
62. Varshavsky, A. The N-end rule pathway of protein degradation / A. Varshavsky // *Genes to Cells*. – 1997. – Vol. 2, № 1. – P. 13-28.
63. Izert, M. A. Applications of bacterial degrons and degraders – toward targeted protein degradation in bacteria / M. A. Izert, M. M. Klimecka, M. W. Górna // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2021. – Vol. 8. – P. 669762.
64. A CRISPR/Cas9-based genome editing system for *Rhodococcus ruber* TH / Y. Liang, S. Jiao, M. Wang et al. // *Metabolic Engineering*. – 2020. – Vol. 57. – P. 13-22.
65. Advances in the development of genetic tools for the genus *Rhodococcus* / Y. Mitani, N. Nakashima, K. I. Sallam et al. // *Actinomycetologica*. – 2006. – Vol. 20, № 2. – P. 55-61.
66. Liang, Y. Genetic toolkits for engineering *Rhodococcus* species with versatile applications / Y. Liang, H. Yu // *Biotechnology Advances*. – 2021. – Vol. 49. – P. 107748.
67. DeLorenzo, D. M. Construction of genetic logic gates based on the T7 RNA polymerase expression system in *Rhodococcus opacus* PD630 / D. M. DeLorenzo, T. S. Moon // *ACS Synthetic Biology*. – 2019. – Vol. 8, № 8. – P. 1921-1930.
68. Round, J. W. An integrative toolbox for synthetic biology in *Rhodococcus* / J. W. Round, L. D. Robeck, L. D. Eltis // *ACS Synthetic Biology*. – 2021. – Vol. 10, № 9. – P. 2383-2395.
69. Molecular toolkit for gene expression control and genome modification in *Rhodococcus opacus* PD630 / D. M. DeLorenzo, A. G. Rottinghaus, W. R. Henson et al. // *ACS Synthetic Biology*. – 2018. – Vol. 7, № 2. – P. 727-738.
70. Round, J. W. A biocatalyst for sustainable wax ester production: re-wiring lipid accumulation in *Rhodococcus* to yield high-value oleochemicals / J. W. Round, R. Rocco, L. D. Eltis // *Green Chemistry*. – 2019. – Vol. 21, № 23. – P. 6468-6482.
71. Tian, T. A predictive biophysical model of translational coupling to coordinate and control protein expression in bacterial operons / T. Tian, H. M. Salis // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43, № 14. – P. 7137-7151.
72. Yamamura, E.-T. Bioconversion of pyridoxine to pyridoxamine through pyridoxal using a *Rhodococcus* expression system / E.-T. Yamamura // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2019. – Vol. 127, № 1. – P. 79-84.
73. Nakashima, N. Isolation and characterization of a rolling-circle-type plasmid from *Rhodococcus erythropolis* and application of the plasmid to multiple-recombinant-protein expression /

N. Nakashima, T. Tamura // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – Vol. 70, № 9. – P. 5557-5568.

74. Tuning and elucidation of the colony dimorphism in *Rhodococcus ruber* associated with cell flocculation in large scale fermentation / S. Jiao, J. Chen, H. Yu et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 101, № 16. – P. 6321-6332.

75. Isolation and characterization of the *Rhodococcus opacus* thiostrepton-inducible genes *tipAL* and *tipAS*: application for recombinant protein expression in *Rhodococcus* / L. Dong, N. Nakashima, N. Tamura et al. // *FEMS Microbiology Letters*. – 2004. – Vol. 237, № 1. – P. 35-40.

76. Genetic analysis of the *dsz* promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 / M. Z. Li, C. H. Squires, D. J. Monticello et al. // *Journal of Bacteriology*. – 1996. – Vol. 178, № 22. – P. 6409-6418.

77. DeLorenzo, D. M. Development of chemical and metabolite sensors for *Rhodococcus opacus* PD630 / D. M. DeLorenzo, W. R. Henson, T. S. Moon // *ACS Synthetic Biology*. – 2017. – Vol. 6, № 10. – P. 1973-1978.

78. Nakashima, N. A novel system for expressing recombinant proteins over a wide temperature range from 4 to 35°C / N. Nakashima, T. Tamura // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2004. – Vol. 86, № 2. – P. 136-148.

79. Overexpression of a phosphatidic acid phosphatase type 2 leads to an increase in triacylglycerol production in oleaginous *Rhodococcus* strains / M. A. Hernández, S. Comba, A. Arabolaza et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 99, № 5. – P. 2191-2207.

80. Construction and parameters modulation of a novel variant *Rhodococcus opacus* BM985 to achieve enhanced triacylglycerol-a biodiesel precursor, using synthetic dairy wastewater / B. Mandal, A. Prabhu, K. Pakshirajan et al. // *Process Biochemistry*. – 2019. – Vol. 84. – P. 9-21.

81. Solovyev, V. Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences / V. Solovyev, A. Salamov // *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies* / Ed. R. W. Li. – Nova Science Publishers, 2011. – Ch. 4. – P. 61-78.

82. Reese, M. G. Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition / M. G. Reese, F. H. Eeckman // Accepted talk for The seventh international Genome sequencing and analysis conference (Hyatt Regency, Hilton Head Island, South Carolina, USA, September 16-20, 1995).

83. Klucar, L. phiSITE: database of gene regulation in bacteriophages / L. Klucar, M. Stano, M. Hajduk // *Nucleic Acids Research*. – 2010. – Vol. 38, № suppl\_1. – P. D366-D370.

84. Coppens, L. SAPPHERE.CNN: Implementation of dRNA-seq-driven, species-specific promoter prediction using convolutional neural networks / L. Coppens, L. Wicke, R. Lavigne // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2022. – Vol. 20. – P. 4969-4974.

85. The art of reporter proteins in science: past, present and future applications / C.-M. Ghim, S. K. Lee, S. Takayama et al. // *BMB Reports*. – 2010. – Vol. 43, № 7. – P. 451-460.
86. The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins / E. A. Rodriguez, R. E. Campbell, J. Y. Lin et al. // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2017. – Vol. 42, № 2. – P. 111-129.
87. Noda, K.-i. Cloning of a rhodococcal promoter using a transposon for dibenzothiophene biodesulfurization / K.-i. Noda, K. Watanabe, K. Maruhashi // *Biotechnology Letters*. – 2002. – Vol. 24, № 22. – P. 1875-1882.
88. Characterization of transcriptional regulatory genes for biphenyl degradation in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / H. Takeda, A. Yamada, K. Miyauchi et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186, № 7. – P. 2134-2146.
89. Dual two-component regulatory systems are involved in aromatic compound degradation in a polychlorinated-biphenyl degrader, *Rhodococcus jostii* RHA1 / H. Takeda, J. Shimodaira, K. Yukawa et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2010. – Vol. 192, № 18. – P. 4741-4751.
90. Glucose-mediated transcriptional repression of PCB/biphenyl catabolic genes in *Rhodococcus jostii* RHA1 / N. Araki, Y. Niikura, K. Miyauchi et al. // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 20, № 1. – P. 53-62.
91. The 24-bp consensus sequence responsible for regulation of the BphS1T1 two-component system in a hybrid promoter / J. Shimodaira, Y. Furusawa, Y. Miyazawa et al. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2012. – Vol. 113, № 3. – P. 279-285.
92. Gene cluster and regulation system for 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene (DDE) degradation in *Janibacter* sp. TYM3221 / P. A. Thi Nguyen, T. H.Thi Trinh, Y. Fukumitsu // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2013. – Vol. 116, № 1. – P. 91-100.
93. Singhi, D. Localization of low copy number plasmid pRC4 in replicating rod and non-replicating cocci cells of *Rhodococcus erythropolis* PR4 / D. Singhi, A. Jain, P. Srivastava // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 12. – P. e0166491.
94. *Rhodococcus erythropolis* is different from other members of *Actinobacteria*: monoploidy, overlapping replication cycle, and unique segregation pattern / D. Singhi, A. Goyal, G. Gupta et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2019. – Vol. 201, № 24. – P. e00320-19.
95. Packaging guest proteins into the encapsulin nanocompartment from *Rhodococcus erythropolis* N771 / A. Tamura, Y. Fukutani, T. Takami et al. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2015. – Vol. 112, № 1. – P. 13-20.
96. Effects of interface adsorption of *Rhodococcus ruber* TH3 cells on the biocatalytic hydration of acrylonitrile to acrylamide / M. Guo, L. Yang, J. Li et al. // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2018. – Vol. 41, № 7. – P. 931-938.

97. Survival of GFP-tagged *Rhodococcus* sp. D310-1 in chlorimuron-ethyl-contaminated soil and its effects on the indigenous microbial community / M. Xiong, Z. Hu, Y. Zhang et al. // *Journal of Hazardous Materials*. – 2013. – Vol. 252/253. – P. 347-354.
98. Kinetics of the thermal inactivation and the refolding of bacterial luciferases in *Bacillus subtilis* and in *Escherichia coli* differ / E. Gnuchikh, A. Baranova, V. Schukina et al. // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14, № 12. – P. e0226576.
99. Trigger factor assists the refolding of heterodimeric but not monomeric luciferases / O. E. Melkina, I. I. Goryanin, I. V. Manukhov et al. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2014. – Vol. 79, № 1. – P. 62-68.
100. Bacterial luciferase reporters: the Swiss army knife of molecular biology / M. S. Waidmann, F. S. Bleichrodt, T. Laslo et al. // *Bioengineered Bugs*. – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 8-16.
101. Cobalt-dependent transcription of the nitrile hydratase gene in *Rhodococcus rhodochrous* M8 / T. E. Pogorelova, L. E. Ryabchenko, N. I. Sunzov et al. // *FEMS Microbiology Letters*. – 1996. – Vol. 144, № 2/3. – P. 191-195.
102. Mascharak, P. K. Structural and functional models of nitrile hydratase / P. K. Mascharak // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2002. – Vol. 225, № 1/2. – P. 201-214.
103. Unique biogenesis of high-molecular mass multimeric metalloenzyme nitrile hydratase: intermediates and a proposed mechanism for self-subunit swapping maturation / Z. Zhou, Y. Hashimoto, T. Cui et al. // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49, № 44. – P. 9638-9648.
104. Яненко, А. С. Катаболизм нитрильных соединений у *Rhodococcus rhodochrous*: генетический контроль, механизмы регуляции и промышленное использование : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.15, 03.00.07 / А. С. Яненко. – М., 2001. – 115 с.
105. Komeda, H. Characterization of the gene cluster of high-molecular-mass nitrile hydratase (H-NHase) induced by its reaction product in *Rhodococcus rhodochrous* J1 / H. Komeda, M. Kobayashi, S. Shimizu // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – Vol. 93, № 9. – P. 4267-4272.
106. Kavita, K. Discovering riboswitches: the past and the future / K. Kavita, R. R. Breaker // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2023. – Vol. 48, № 2. – P. 119-141.
107. Bacterial riboswitches cooperatively bind Ni<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup> ions and control expression of heavy metal transporters / K. Furukawa, A. Ramesh, Z. Zhou et al. // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 57, № 6. – P. 1088-1098.
108. van Bakel, H. Family matters: gene regulation by metal-dependent transcription factors / H. van Bakel, C. Wijmenga // *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification : From Microbes to Man* / Ed. M. J. Tamas, E. Martinoia. – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2005. – P. 341-394.

109. Pennella, M. A. Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators / M. A. Pennella, D. P. Giedroc // *Biometals*. – 2005. – Vol. 18. – P. 413-428.
110. Lund, P. A. Transcriptional regulation of the mercury-resistance genes of transposon Tn501 / P. A. Lund, S. J. Ford, N. L. Brown // *Journal of General Microbiology*. – 1986. – Vol. 132, № 2. – P. 465-480.
111. Rutherford, J. C. Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase / J. C. Rutherford, J. S. Cavet, N. J. Robinson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274, № 36. – P. 25827-25832.
112. Metal homeostasis in bacteria: the role of ArsR–SmtB family of transcriptional repressors in combating varying metal concentrations in the environment / R. P. Saha, S. Samanta, S. Patra et al. // *BioMetals*. – 2017. – Vol. 30, № 4. – P. 459-503.
113. An ArsR/SmtB family member is involved in the regulation by arsenic of the arsenite oxidase operon in *Thiomonas arsenitoxydans* / D. Moinier, D. Slyemi, D. Byrne et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – Vol. 80, № 20. – P. 6413-6426.
114. Wang, Y. Structural and functional characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CmtR, a Pb<sup>II</sup>/Cd<sup>II</sup>-sensing SmtB/ArsR metalloregulatory repressor / Y. Wang, L. Hemmingsen, D. P. Giedroc // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44, № 25. – P. 8976-8988.
115. Characterization of the *ars* gene cluster from extremely arsenic-resistant *Microbacterium* sp. strain A33 / A. Achour-Rokbani, A. Cordi, P. Poupin et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – Vol. 76, № 3. – P. 948-955.
116. Fillat, M. F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators / M. F. Fillat // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – Vol. 546. – P. 41-52.
117. Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression / X. Tao, N. Schiering, H.-y. Zeng et al. // *Molecular Microbiology*. – 1994. – Vol. 14, № 2. – P. 191-197.
118. Que, Q. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins / Q. Que, J. D. Helmann // *Molecular Microbiology*. – 2000. – Vol. 35, № 6. – P. 1454-1468.
119. The *Treponema pallidum tro* operon encodes a multiple metal transporter, a zinc-dependent transcriptional repressor, and a semi-autonomously expressed phosphoglycerate mutase / K. R. O. Hazlett, F. Rusnak, D. G. Kehres et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 23. – P. 20687-20694.
120. Sharma, M. Amidases: versatile enzymes in nature / M. Sharma, N. N. Sharma, T. C. Bhalla // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2009. – Vol. 8. – P. 343-366.

121. Acyl group transfer by proteases forming acyl–enzyme intermediate: kinetic model analysis / M. Y. Gololobov, I. L. Borisov, V. M. Belikov et al. // *Biotechnology and bioengineering*. – 1988. – Vol. 32, № 7. – P. 866-872.
122. Quantitative characterization of the nucleophile reactivity in penicillin acylase-catalyzed acyl transfer reactions / M. I. Youshko, G. G. Chilov, T. A. Shcherbakova et al. // *Biochimica et Biophysica Acta, Proteins and Proteomics*. – 2002. – Vol. 1599, № 1/2. – C. 134-140.
123. Kobayashi, M. Hydrazide synthesis: novel substrate specificity of amidase / M. Kobayashi, M. Goda, S. Shimizu // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1999. – Vol. 256, № 2. – P. 415-418.
124. Kelly, M. An inducible amidase produced by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* / M. Kelly, P. H. Clarke // *Microbiology*. – 1962. – Vol. 27, № 2. – P. 305-316.
125. Acyltransferase activity of the wide spectrum amidase of *Brevibacterium* sp. R312 / A. Thiéry, M. Maestracci, A. Arnaud et al. // *Journal of General Microbiology*. – 1986. – Vol. 132, № 8. – P. 2205-2208.
126. Fournand, D. Acyl transfer activity of an amidase from *Rhodococcus* sp. strain R312: formation of a wide range of hydroxamic acids / D. Fournand, F. Bigey, A. Arnaud // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1998. – Vol. 64, № 8. – P. 2844-2852.
127. Agarwal, S. Bioprocess development for nicotinic acid hydroxamate synthesis by acyltransferase activity of *Bacillus smithii* strain IITR6b2 / S. Agarwal, M. Gupta, B. Choudhury // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 40, № 9. – P. 937-946.
128. Agarwal, S. Solvent free biocatalytic synthesis of isoniazid from isonicotinamide using whole cell of *Bacillus smithii* strain IITR6b2 / S. Agarwal, M. Gupta, B. Choudhury // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2013. – Vol. 97. – P. 67-73.
129. Biotransformation of nicotinamide to nicotiny hydroxamic acid at bench scale by amidase acyl transfer activity of *Pseudomonas putida* BR-1 / R. K. Bhatia, S. K. Bhatia, P. K. Mehta et al. // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2014. – Vol. 108. – P. 89-95.
130. Bench scale production of benzohydroxamic acid using acyl transfer activity of amidase from *Alcaligenes* sp. MTCC 10674 / R. K. Bhatia, S. K. Bhatia, P. K. Mehta et al. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 40, № 1. – P. 21-27.
131. Sharma, M. Biotransformation of acetamide to acetohydroxamic acid at bench scale using acyl transferase activity of amidase of *Geobacillus pallidus* BTP-5x MTCC 9225 / M. Sharma, N. N. Sharma, T. C. Bhalla // *Indian Journal of Microbiology*. – 2012. – Vol. 52. – P. 76-82.
132. Lavrov, K. V. Novel biocatalytic process of *N*-substituted acrylamide synthesis / K. V. Lavrov, G. A. Larikova, A. S. Yanenko // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2013. – Vol. 49, № 8. – P. 702-705.

133. A new acylamidase from *Rhodococcus erythropolis* TA37 can hydrolyze N-substituted amides / K. V. Lavrov, I. A. Zalunin, E. K. Kotlova et al. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2010. – Vol. 75, № 8. – P. 1006-1013.
134. Lavrov, K. V. Cloning of new acylamidase gene from *Rhodococcus erythropolis* and its expression in *Escherichia coli* / K. V. Lavrov, A. S. Yanenko // *Russian Journal of Genetics*. – 2013. – Vol. 49, № 10. – P. 1078-1081.
135. Expression of acylamidase gene in *Rhodococcus erythropolis* strains / K. V. Lavrov, A. D. Novikov, L. E. Ryabchenko et al. // *Russian Journal of Genetics*. – 2014. – Vol. 50, № 9. – P. 1003-1007.
136. Debabov, V. G. Biocatalytic hydrolysis of nitriles / V. G. Debabov, A. S. Yanenko // *Review Journal of Chemistry*. – 2011. – Vol. 1, № 4. – P. 385-402.
137. Regulation of nitrile utilization in *Rhodococcus* / A. S. Yanenko, O. B. Astaurova, T. V. Gerasimova et al. // *The Biology of Actinomycetes 1994 : Proceedings of the Ninth International Symposium on the Biology of Actinomycetes (Moscow, July 10-15, 1994)*. – Moscow, 1995. – P. 139-144.
138. Simon, R. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria / R. Simon, U. Prierer, A. Pühler // *Nature Biotechnology*. – 1983. – Vol. 1, № 9. – P. 784-791.
139. Cloning the amidase gene from *Rhodococcus rhodochrous* M8 and its expression in *Escherichia coli* / L. E. Ryabchenko, D. A. Podchernyaev, E. K. Kotlova et al. // *Russian Journal of Genetics*. – 2006. – Vol. 42, № 8. – P. 886-892.
140. Рябченко, Л. Е. Мобилизуемые плазмидные векторы, способные к конъюгативному переносу между клетками *E. coli* и *Rhodococcus*, и их использование для конструирования штаммов *Rhodococcus* / Л. Е. Рябченко, И. Н. Полякова, А. С. Яненко и др. // *Биотехнология*. – 2005. – № 5. – С. 6-13.
141. Database resources of the National Center for Biotechnology Information / E. W. Sayers, E. E. Bolton, J. R. Brister et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – Vol. 50, № D1. – P. D20-D26.
142. The Gene Ontology knowledgebase in 2023 / The Gene Ontology Consortium, S. A. Aleksander, J. Balhoff et al. // *Genetics*. – 2023. – Vol. 224, № 1. – P. iyad031.
143. Gene Ontology: tool for the unification of biology / M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake et al. // *Nature Genetics*. – 2000. – Vol. 25, № 1. – P. 25-29.
144. InterProScan 5: genome-scale protein function classification / P. Jones, D. Binns, H.-Y. Chang et al. // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, № 9. – P. 1236-1240.
145. ElasticBLAST: accelerating sequence search *via* cloud computing / C. Camacho, G. M. Boratyn, V. Joukov et al. // *BMC Bioinformatics*. – 2023. – Vol. 24, № 1. – P. 117.

146. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein knowledgebase in 2023 / The UniProt Consortium // *Nucleic Acids Research*. – 2023. – Vol. 51, № D1. – P. D523-D531.
147. Papadopoulos, J. S. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences / J. S. Papadopoulos, R. Agarwala // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 23, № 9. – P. 1073-1079.
148. Mukherjee, S. Riboswitch Scanner: an efficient pHMM-based web-server to detect riboswitches in genomic sequences / S. Mukherjee, S. Sengupta // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32, № 5. – P. 776-778.
149. Riboswitch detection using profile hidden Markov models / P. Singh, P. Bandyopadhyay, S. Bhattacharya et al. // *BMC Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 10, № 1. – P. 325.
150. Nawrocki, E. P. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches / E. P. Nawrocki, S. R. Eddy // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, № 22. – P. 2933-2935.
151. Reuter, J. S. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis / J. S. Reuter, D. H. Mathews // *BMC Bioinformatics*. – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 129.
152. A method of DNA extraction from a wide range of objects *via* treatment with ammonium salts / K. V. Sidoruk, E. I. Levitin, B. V. Sviridov et al. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2021. – Vol. 57, № 8. – P. 899-906.
153. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments / P. Y. Lee, J. Costumbrado, C.-Y. Hsu et al. // *Journal of Visualized Experiments*. – 2012. – № 62. – P. e3923.
154. Green, M. R. The Hanahan method for preparation and transformation of competent *Escherichia coli*: high-efficiency transformation / M. R. Green, J. Sambrook // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2018. – Vol. 2018, № 3. – P. 101188
155. Kielkopf, C. L. Bradford assay for determining protein concentration / C. L. Kielkopf, W. Bauer, I. L. Urbatsch // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2020. – Vol. 2020, № 4. – P. 102269
156. Sambrook, J. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins / J. Sambrook, D. W. Russell // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2006. – Vol. 2006, № 4. – P. 4540
157. Crystal structure and induction mechanism of AmiC–AmiR: a ligand-regulated transcription antitermination complex / B. P. O'Hara, R. A. Norman, P. T. C. Wan et al. // *The EMBO journal*. – 1999. – Vol. 18, № 19. – P. 5175-5186.
158. Alekshun, M. N. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals / M. N. Alekshun, S. B. Levy // *Trends in Microbiology*. – 1999. – Vol. 7, № 10. – P. 410-413.
159. Reyes-Caballero, H. *Mycobacterium tuberculosis* NmtR harbors a nickel sensing site with parallels to *Escherichia coli* RcnR / H. Reyes-Caballero, C. W. Lee, D. P. Giedroc // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50, № 37. – P. 7941-7952.



160. Solution structure of *Mycobacterium tuberculosis* NmtR in the apo state: insights into Ni(II)-mediated allostery / C. W. Lee, D. K. Chakravorty, F.-M. J. Chang et al. // *Biochemistry*. – 2012. – Vol. 51, № 12. – P. 2619-2629.

161. Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal / R. Gents, A. Langer, A. C. Y. Chang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1981. – Vol. 78, № 8. – P. 4936-4940.

162. Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator / J. M. Ward, G. R. Janssen, T. Kieser et al. // *Molecular and General Genetics MGG*. – 1986. – Vol. 203, № 3. – P. 468-478.

163. Hyper-inducible expression system for streptomycetes / S. Herai, Y. Hashimoto, H. Higashibata et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101, № 39. – P. 14031-14035.

164. Создание mini-Mu системы, лишенной селективных маркеров, для интеграции генов в хромосому бактерии *Escherichia coli* / Е. А. Саврасова, В. З. Ахвердян, А. О. Лобанов и др. // *Биотехнология*. – 2007. – Т. 4. – С. 3-17.

165. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity / D. A. Shagin, E. V. Barsova, Y. G. Yanushevich et al. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2004. – Vol. 21, № 5. – P. 841-850.

166. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime / E. M. Merzlyak, J. Goedhart, D. Shcherbo et al. // *Nature Methods*. – 2007. – Vol. 4, № 7. – P. 555-557.

167. Биокаталитический способ синтеза N-замещенных алифатических акриламидов и штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* для его осуществления : пат. 2399672 Рос. Федерация : МПК С12 Р 13/02, С12 N 1/20 / Лавров К. В., Ларикова Г. А., Яненко А. С.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное унитарное предприятие "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов" (ФГУП ГосНИИгенетика). – № 2009116221/13 ; заявл. 29.04.2010 ; опубл. 20.09.2010, Бюл. № 26.

168. Sallam, K. I. A multipurpose transposon-based vector system mediates protein expression in *Rhodococcus erythropolis* / K. I. Sallam, N. Tamura., T. Tamura // *Gene*. – 2007. – Vol. 386, № 1. – P. 173-182.

169. Functional expression of three Rieske non-heme iron oxygenases derived from Actinomycetes in *Rhodococcus* species for investigation of their degradation capabilities of dibenzofuran and chlorinated dioxins / T. Iida, Y. Moteki, K. Nakamura et al. // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2009. – Vol. 73, № 4. – P. 822-827.

170. New vector system for random, single-step integration of multiple copies of DNA into the *Rhodococcus* genome / K. I. Sallam, N. Tamura, N. Imoto et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – Vol. 76, № 8. – P. 2531-2539.

171. Recombinant *Rhodococcus* sp. strain T09 can desulfurize DBT in the presence of inorganic sulfate / T. Matsui, K.-i. Noda, Y. Tanaka et al. // Current Microbiology. – 2002. – Vol. 45, № 4. – P. 240-244.

172. The identification of catalytic pentad in the haloalkane dehalogenase DhmA from *Mycobacterium avium* N85: reaction mechanism and molecular evolution / M. Pavlová, M. Klvaňa, A. Jesenská et al. // Journal of Structural Biology. – 2007. – Vol. 157, № 2. – P. 384-392.

173. Host-vector system for phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis* based on *Corynebacterium* plasmids / M. Veselý, M. Pátek, J. Nešvera et al. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2003. – Vol. 61, № 5. – P. 523-527.

174. Ellinger, J. Construction of a BioBrick™ compatible vector system for *Rhodococcus* / J. Ellinger, C. Schmidt-Dannert // Plasmid. – 2017. – Vol. 90. – P. 1-4.

175. The *atf2* gene is involved in triacylglycerol biosynthesis and accumulation in the oleaginous *Rhodococcus opacus* PD630 / M. A. Hernández, A. Arabolaza, E. Rodríguez et al. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – Vol. 97, № 5. – P. 2119-2130.

176. Hetzler, S. Establishment of cellobiose utilization for lipid production in *Rhodococcus opacus* PD630 / S. Hetzler, A. Steinbüchel // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – Vol. 79, № 9. – P. 3122-3125.

177. The pleiotropic transcriptional regulator NlpR contributes to the modulation of nitrogen metabolism, lipogenesis and triacylglycerol accumulation in oleaginous rhodococci / M. A. Hernández, J. Lara, G. Gago et al. // Molecular Microbiology. – 2017. – Vol. 103, № 2. – P. 366-385.

178. Fernández de las Heras, L. Cholesterol to cholestenone oxidation by ChoG, the main extracellular cholesterol oxidase of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4 / L. Fernández de las Heras, J. Perera, J. M. Navarro Llorens // The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. – 2014. – Vol. 139. – P. 33-44.

179. Carbon allocation in *Rhodococcus jostii* RHA1 in response to disruption and overexpression of *nlpR* regulatory gene, based on <sup>13</sup>C-labeling analysis / M. A. Hernández, G. Gleixner, D. Sachse et al. // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 1992.

180. Identification of a methanol-inducible promoter from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and its use as an expression vector / Y. Kagawa, Y. Mitani, H.-Y. Yun et al. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2012. – Vol. 113, № 5. – P. 596-603.

181. Analyses of both the *alkB* gene transcriptional start site and *alkB* promoter-inducing properties of *Rhodococcus* sp. strain BCP1 grown on *n*-alkanes / M. Cappelletti, S. Fedi, D. Frascari et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 77, № 5. – P. 1619-1627.
182. Development of a genetic transformation system for benzene-tolerant *Rhodococcus opacus* strains / K.-s. Na, K. Nagayasu, A. Kuroda et al. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2005. – Vol. 99, № 4. – P. 408-414.
183. Hetzler, S. Saccharification of cellulose by recombinant *Rhodococcus opacus* PD630 strains / S. Hetzler, D. Bröker, A. Steinbüchel // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – Vol. 79, № 17. – P. 5159-5166.
184. Functional expression of the particulate methane mono-oxygenase gene in recombinant *Rhodococcus erythropolis* / Z. Gou, X.-H. Xing, M. Luo et al. // FEMS Microbiology Letters. – 2006. – Vol. 263, № 2. – P. 136-141.
185. Watanabe, K. Enhanced desulfurization in a transposon-mutant strain of *Rhodococcus erythropolis* / K. Watanabe, K.-i. Noda, K. Maruhashi // Biotechnology Letters. – 2003. – Vol. 25, № 16. – P. 1299-1304.
186. Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis* / M. Veselý, M. Knoppová, J. Nešvera et al. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Vol. 76, № 1. – P. 159-168.

## СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

## Список рисунков

Рисунок 1.1	Генетические инструменты для гетерологичной экспрессии генов в бактериях <i>Rhodococcus</i> . Фиолетовым цветом выделены элементы контроля уровня экспрессии, управляющие процессами транскрипции и трансляции (группа 1), голубым - элементы контроля уровня экспрессии, определяющие стабильность целевой мРНК и белка (группа 2), желтым – элементы плазмидного бирепликонного вектора, способного к автономной экспрессии в <i>Rhodococcus</i> и <i>E. coli</i> (группа 3), зеленым - «вспомогательные» элементы (группа 4). Ori rep – ориджин репликации, Ab <sup>R</sup> – ген, придающий устойчивость к антибиотику	13
Рисунок 1.2	Степени индуцибельности регуляторных областей и промоторов класса I. Знак регулирования слева обозначает возможность плавной регулировки силы, в скобках указаны индукторы. P <sub>nh</sub> (ТНЗ) – регуляторная область P <sub>nh</sub> из штамма <i>R. ruber</i> ТНЗ [27]	21
Рисунок 1.3	Различия в структуре геномов штаммов <i>R. rhodochrous</i> М8, М33 и М50. Зеленым обозначены гены нитрилгидратазы <i>nhmBA</i> ; 1, 2, 3, 4 – гены <i>nhmC</i> , <i>nhmD</i> , <i>nhmG</i> , <i>cblA</i> (см. Раздел 3.1 и словарь терминов), желтый и оранжевый участки – делеции в геномах штаммов <i>R. rhodochrous</i> М33 и М50	29
Рисунок 1.4	Механизм реакции гидролиза амида, катализируемой амидазой	35
Рисунок 1.5	Механизм ацилтрансферазной реакции, катализируемой амидазой	35
Рисунок 1.6	Ферментативные реакции гидролиза, катализируемые амидазами. (1): общий вид реакции гидролиза амидов; (2): общий вид реакции гидролиза N-замещённых амидов; (3): реакция гидролиза п-нитроацетанилида	37
Рисунок 3.1	Схема окружения оперона <i>nhmBAG</i> в геноме штамма <i>R. rhodochrous</i> М8. Красным цветом обозначены аннотированные ORF с предсказанными функциями (расшифровка цифровых обозначений приведена в Таблице 3.1), серым – фрагменты ORF и ORF с неизвестными функциями, желтым – оперон <i>nhmBAG</i>	64
Рисунок 3.2	Филогенетическое дерево белка NhmC. Ветви, содержащие близкородственные белки (листья) скрыты под общим обозначением unknown с указанием количества содержащихся в них белков. Белок	69

NhmC находится в ветви, отмеченной зеленым треугольником. Красным треугольником отмечен белок AmiC из *P. aeruginosa* PAO1. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi)

- Рисунок 3.3 Филогенетическое дерево белка NhmC: ветвь наиболее близких гомологов. Белок NhmC отмечен красным цветом. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi) 70
- Рисунок 3.4 Филогенетическое дерево белка NhmD. Белок NhmD отмечен красным цветом. Белок NhhD из штамма *R. rhodochrous* J1 отмечен красным треугольником. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi) 72
- Рисунок 3.5 Филогенетическое дерево белка NhmG. Белок NhmG отмечен красным цветом. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi) 75
- Рисунок 3.6 Филогенетическое дерево белка CblA. Белок CblA отмечен красным цветом. Белок NmtR из штамма *M. tuberculosis* отмечен красным треугольником. Расшифровка сокращений приведена в списке сокращений. Изображение создано на сайте URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi) 77
- Рисунок 3.7 Выравнивание аминокислотной последовательности CblA с ближайшим экспериментально изученным гомологом NmtR. Красным цветом показаны идентичные аминокислоты. Подчеркнутые аминокислоты NmtR входят в сайт связывания ионов металла 78
- Рисунок 3.8 Схема расположения предсказанных промоторов на участке P<sub>nh569</sub>. Желтым и оранжевым цветом обозначен результат, полученный с помощью программы BROM (proD15 – дополнительный сайт связывания  $\sigma^{70}$ , -35 и -10 – сайты связывания РНК-полимеразы), голубым – NNPP, зеленым – PromoterHunter, синим – SAPHIRE.CNN. Сверху указаны координаты усредненных промоторов P1 и P2 81
- Рисунок 3.9 Схема расположения несовершенных инвертированных повторов на участке P<sub>nh569</sub>. Желтым цветом обозначены предполагаемые промоторы 84

P1 и P2 с указанием -35 и -10 – сайтов связывания РНК-полимеразы, зеленым – несовершенные инвертированные повторы с четным количеством нуклеотидов между плечами палиндрома, бордовым – с нечетным

- Рисунок 3.10 Предсказанные вторичные структуры в составе 5'-нетранслируемой области мРНК, являющейся результатом транскрипции с регуляторной области  $P_{nh569}$ . Цветами обозначены степени вероятности формирования данной структуры: синий – 60 – 70 %, зеленый – 80 – 90 %, желтый – 90 – 95 %, оранжевый – 95 – 99 %, красный – более 99 %. Изображение создано с помощью ресурса RNAstructure 85
- Рисунок 3.11 Схема расположения предсказанных функциональных участков в составе области  $P_{nh569}$ . Желтым цветом обозначены предполагаемые промоторы P1 и P2 с указанием -35 и -10 – сайтов связывания РНК-полимеразы (оранжевый), зеленым – несовершенные инвертированные повторы с четным количеством нуклеотидов между плечами палиндрома, серым – возможные вторичные структуры, формируемые в 5'-нетранслируемой области мРНК; масштаб не сохранен 85
- Рисунок 3.12 Схема конструирования плазмидного вектора pRY1- $P_{nh}$ -AA-nhmG. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *EcoRI*, *SacI*, *NcoI*, *BamHI*; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов 88
- Рисунок 3.13 Схема конструирования штамма *R. rhodochrous* M33 аам. Слева: рекомбинация по  $P_{nh}$ -плечу; справа: рекомбинация по *nhmG*-плечу. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов 89
- Рисунок 3.14 Ациламидазная активность клеток клонов штамма *R. rhodochrous* M33 аам. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 48 часов, концентрация ионов кобальта в среде составляла 42 мкМ 91
- Рисунок 3.15 Кривая роста штаммов *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 аам. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях, концентрация ионов кобальта в среде составляла 42 мкМ 92
- Рисунок 3.16 RT-qPCR анализ индукции транскрипции в штаммах *R. rhodochrous* M33 аам, *R. rhodochrous* M8 и *R. rhodochrous* M33 в присутствии ионов 93

кобальта. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 20 часов

- Рисунок 3.17 Динамика нитрилгидратазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 (1) и ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 аам (2). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях 94
- Рисунок 3.18 Денатурирующий ДСН-ПААГ электрофорез внутриклеточных растворенных белков штаммов *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 аам. (1): логарифмическая фаза роста: штамм *R. rhodochrous* M33 (дорожки 1 и 2); штамм *R. rhodochrous* M33 аам (дорожки 3 и 4). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях, концентрация ионов кобальта составляла 0 мкМ (дорожки 1 и 3) и 42 мкМ (дорожки 2 и 4). Дорожка 5: маркер молекулярного веса. (2): стационарная фаза роста: штамм *R. rhodochrous* M33 (дорожка 1); штамм *R. rhodochrous* M33 аам (дорожка 2). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях, концентрация ионов кобальта составляла 42 мкМ. Дорожка 3: маркер молекулярного веса. Синими стрелками обозначены  $\beta$  и  $\alpha$  субъединицы белка нитрилгидратазы, оранжевой – белок ациламидазы, маркер – Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder 95
- Рисунок 3.19 Схема делеционных вариантов регуляторной области P<sub>nh569</sub>, праймеры, используемые для их амплификации и плазмиды, содержащие данные делеционные варианты. P1, P2 – предполагаемые промоторы; 1, 3, 4, 11, 13, 14 – несовершенные инвертированные повторы с четным количеством нуклеотидов между плечами палиндрома; SD – последовательность Шайна-Дальгарно 97
- Рисунок 3.20 Схема конструирования векторов серии pRY16-n. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *EcoRI*, *Bsp68I*, *EcoRV*, *VamHI*; P<sub>nhN</sub> обозначает фрагменты P<sub>nh569</sub>, P<sub>nh408</sub>, P<sub>nh235</sub>, P<sub>nh157</sub>, P<sub>nh31</sub> в зависимости от номера плазмиды n (n от 1 до 5 соответственно); расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов 99
- Рисунок 3.21 Схема конструирования плазмидного вектора pRY16-9. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *EcoRI*, *EcoRV*; 100

расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

- Рисунок 3.22 Схема сокращенного варианта регуляторной области  $P_{nh190}$ .  $P_{nh165}$ ,  $P_{nh25}$  – участки регуляторной области  $P_{nh569}$  длиной 165 п.н и 25 п.н. соответственно;  $P1$ ,  $P2$  – предполагаемые промоторы; 1, 3, 4, 11, 13, 14 – несовершенные инвертированные повторы с четным количеством нуклеотидов между плечами палиндрома;  $SD$  – последовательность Шайна-Дальгарно 101
- Рисунок 3.23 Схема конструирования штаммов *R. rhodochrous* M33  $P_{nh190}$ -аам (слева) и *R. rhodochrous* M33  $P_{nh569}$ -аам (справа). Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов 102
- Рисунок 3.24 Схема конструирования векторов  $pRY1$ - $P_{nh569}$ -аам<sub>509</sub> и  $pRY1$ - $P_{nh190}$ -аам<sub>509</sub>. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *EcoRI*, *VamHI*; фиолетовым цветом показана область перекрывания для ПЦР объединения фрагментов; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов 103
- Рисунок 3.25 Динамика ациламидазной активности клеток штаммов *R. rhodochrous* M33  $P_{nh569}$ -аам (1) и *R. rhodochrous* M33  $P_{nh190}$ -аам (2). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях 104
- Рисунок 3.26 RT-qPCR анализ индукции транскрипции в штаммах *R. rhodochrous* M33  $P_{nh190}$ -аам и *R. rhodochrous* M33  $P_{nh569}$ -аам в присутствии ионов кобальта. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 20 часов 105
- Рисунок 3.27 Схема расположения функциональных участков в составе регуляторных областей  $P_{nh569}$  и  $P_{nh190}$ .  $P1$  – функциональный промотор,  $P2$  – нефункциональный предсказанный промотор; -35, -10 – предсказанные сайты посадки  $\sigma^{70}$  фактора РНК-полимеразы;  $SD$  – последовательность Шайна-Дальгарно 106
- Рисунок 3.28 Схема конструирования плазмидного вектора  $pRY1$ -UP-IS. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *VamHI* и *EcoRI*; участок для ПЦР-объединения фрагментов показан фиолетовым цветом; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов 108



- Рисунок 3.29 Схема конструирования штамма *R. rhodochrous* M33 del. Слева: рекомбинация по UP-плечу; справа: рекомбинация по IS-плечу; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов. (1): ожидаемая структура хромосомы штамма *R. rhodochrous* M33 del; (2): структура полученного штамма *R. rhodochrous* M33 del, где пунктирной линией обозначена делеция длиной 1352 п.н. 109
- Рисунок 3.30 Схема конструирования векторов серии pRY1-m. На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *KpnI* и *EcoRI*; участки для ПЦР-объединения фрагментов показаны фиолетовым цветом; расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов 111
- Рисунок 3.31 Схема конструирования штаммов серии *R. rhodochrous* M33 del pRY1-m. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов 113
- Рисунок 3.32 Динамика ациламидазной активности клеток штаммов серии *R. rhodochrous* M33 del pRY1-m. (1): в присутствии ионов кобальта (2): в отсутствие ионов кобальта. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях 113
- Рисунок 3.33 Денатурирующий ДСН-ПААГ электрофорез внутриклеточных растворенных белков штаммов серии *R. rhodochrous* M33 del pRY1-m. Дорожки 1, 2: штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1; дорожки 3, 4: штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-6; дорожки 5, 6: штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-8; дорожки 7, 8: штамм *R. rhodochrous* M33 del pRY1-6,5; дорожки 9, 10: штамм *R. rhodochrous* M33 aam. Синяя стрелка обозначает белок ациламидазу. Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях в течении 48 часов. Концентрация ионов кобальта в среде и ациламидазные активности клеток указаны под каждой дорожкой. Дорожки M: маркер молекулярного веса Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder 115
- Рисунок 3.34 Ациламидазная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-aam, выращенного в жидких средах различного состава. Г – глюкоза, 5 г/л; М – мочевины, 6 г/л; Н – нитрат аммония, 2 г/л; А – ацетат натрия, 4 г/л. Культуры выращивали в течение 62 часов. Номера вариантов среды указаны под гистограммой 117

- Рисунок 3.35 Динамика ациламидазной активности клеток штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-аам при выращивании в жидких средах различного состава. (1, 2): в отсутствие ионов кобальта; (3, 4): в присутствии ионов кобальта; Г – глюкоза, 5 г/л; М – мочевины, 6 г/л; Н – нитрат аммония, 2 г/л; А – ацетат натрия, 4 г/л 119
- Рисунок 3.36 Кривые роста штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-аам при выращивании в жидких средах различного состава. Г – глюкоза, 5 г/л; М – мочевины, 6 г/л; Н – нитрат аммония, 2 г/л; А – ацетат натрия, 4 г/л. Концентрация ионов кобальта в среде составляла 42 мкМ 120
- Рисунок 3.37 Рассчитанный выход активной биомассы штамма *R. rhodochrous* M33 P<sub>nh569</sub>-аам при выращивании в жидких средах различного состава. (1): в минимальной среде с различными источниками углерода и азота; (2): в богатых средах. Г – глюкоза, 5 г/л; М – мочевины, 6 г/л; Н – нитрат аммония, 2 г/л; А – ацетат натрия, 4 г/л. Концентрация ионов кобальта в среде составляла 42 мкМ 120
- Рисунок 3.38 Влияние присутствия двухвалентных ионов тяжёлых металлов в среде на рост штамма *R. rhodochrous* M33 del. Культуры выращивали в жидкой среде при стандартных условиях в присутствии ионов  $\text{Co}^{2+}/\text{Ni}^{2+}/\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}/\text{As}^{2+}$ . За 1 у.е. принято значение оптической плотности культуры, выращенной в отсутствие ионов тяжелых металлов в среде 122
- Рисунок 3.39 Ациламидазная активность клеток штамма *R. rhodochrous* M33 аам, выращенного в присутствии двухвалентных ионов тяжёлых металлов. Культуры выращивали в жидкой среде при стандартных условиях в течение 96 часов в присутствии ионов  $\text{Co}^{2+}/\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}/\text{As}^{2+}$  123
- Рисунок 3.40 Ациламидазная активность штамма *R. rhodochrous* M33 аам в зависимости от концентрации ионов  $\text{Co}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$  в среде. Культуры выращивали в жидкой среде в течение 96 часов при стандартных условиях в присутствии ионов  $\text{Co}^{2+}$  или  $\text{Ni}^{2+}$  в концентрации от 0,42 мкМ до 168 мкМ. В качестве источника азота использовали нитрат аммония, 2 г/л 124
- Рисунок 3.41 Модель металло-зависимой регуляции транскрипции генов нитрилгидратазы в штамме *R. rhodochrous* M8. Расшифровка 125

обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов;  $Me^{2+}$  – ионы  $Co^{2+}$  или  $Ni^{2+}$

- Рисунок 3.42 Схема конструирования штамма *R. qingshengii* TA37 pRY1-8. 127  
Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов
- Рисунок 3.43 Схема плазмидных векторов pTurboGFP-B (1) и pTurboRFP-B (2). 130  
Изображения взяты с сайта производителя ЗАО ЕВРОГЕН. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов
- Рисунок 3.44 Интенсивность флуоресценции штаммов *E. coli* XL1 pTurboGFP-B (1 – 4), 131  
*E. coli* XL1 pTurboRFP-B (5 – 8) и *E. coli* XL1-Blue (9 – 12). Культуры выращены в жидкой среде LB в условиях с индукцией ИПТГ и без индукции
- Рисунок 3.45 Схема конструирования плазмидного вектора pRY3-Cb1A-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP. 133  
На картах плазмид обозначены использованные сайты рестрикции *EcoRI* и *HindIII*; участки для ПЦР-объединения фрагментов и сборки методом Гибсона показаны фиолетовым цветом; RBS – RBS<sub>E.coli</sub>. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов
- Рисунок 3.46 Интенсивность флуоресценции штамма *E. coli* XL1 pRY3-Cb1A-P<sub>nh</sub>-GFP- 135  
RFP. Культуры выращены в жидкой среде LB в присутствии ионов кобальта (1 и 3) и в отсутствие ионов кобальта (2 и 4) в течение 48 часов. Измерения 1 и 2 проведены в области TurboRFP, измерения 3 и 4 – TurboGFP. Оранжевыми полосами обозначена рассчитанная зона «засвета» белка TurboRFP в область измерения TurboGFP
- Рисунок 3.47 Динамика интенсивности флуоресценции штамма *R. rhodochrous* M33 136  
del pRY3-Cb1A-P<sub>nh</sub>-GFP-RFP. Культуры выращивали в жидкой среде при стандартных условиях
- Рисунок 3.48 Схема конструирования векторов pRY1-7 и pRY1-1up. На картах плазмид 140  
обозначены использованные сайты рестрикции *BcuI*, *MluI*, *NheI* и *EcoRI*. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов
- Рисунок 3.49 Схема конструирования штаммов-биокатализаторов *R. rhodochrous* M33 142  
del pRY1-7 и *R. rhodochrous* M33 del pRY1-1up. Расшифровка обозначенных фрагментов ДНК приведена в словаре терминов

Рисунок 3.50	Динамика ациламидазной активности клеток штаммов-биокатализаторов <i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-7 (1) и M33 del pRY1-1up (2). Культуры выращивали в жидкой среде MS при стандартных условиях	143
Рисунок 3.51	Влияние концентрации ионов кобальта в среде на ациламидазную активность клеток штамма-биокатализатора <i>R. rhodochrous</i> M33 del pRY1-1up. Культуры выращивали в жидкой среде при стандартных условиях в течении 96 часов, в качестве источника азота использовали нитрат аммония, 2 г/л. Активность культуры, выращенной при концентрации 4,2 мкМ ионов кобальта в среде, приняли за 100 %	144
Рисунок 3.52	Схемы синтеза N-замещённых акриламидов, катализируемого ферментом ациламидазой. (1): синтез ИПАА, (2): синтез ДМАПАА	144

### Список таблиц

Таблица 1.1	Наборы регуляторных областей для бактерий <i>Rhodococcus</i>	16
Таблица 1.2	Классификация индуцибельных регуляторных областей	19
Таблица 1.3	Межродовой перенос генетических систем регуляции	22
Таблица 1.4	Репортёрные белки, используемые в бактериях <i>Rhodococcus</i>	24
Таблица 2.1	Штаммы, использованные в работе	40
Таблица 2.2	Плазмидные векторы, использованные в работе	46
Таблица 2.3	Праймеры, использованные в работе	51
Таблица 2.4	Параметры для измерения флуоресценции клеток	61
Таблица 3.1	ORF в окружении оперона <i>nhmBAG</i> в геноме штамма <i>R. rhodochrous</i> M8	64
Таблица 3.2	Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для ORF №12	66
Таблица 3.3	Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для ORF №13	71
Таблица 3.4	Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для ORF №17	73
Таблица 3.5	Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для ORF №18	76
Таблица 3.6	Наиболее близкие гомологичные нуклеотидные последовательности для регуляторной области P <sub>nh569</sub>	79
Таблица 3.7	Результат поиска функциональных промоторов в регуляторной области P <sub>nh569</sub>	81

Таблица 3.8	Результат поиска несовершенных инвертированных повторов в регуляторной области $P_{nh569}$	83
Таблица 3.9	Ациламидазная активность клеток штаммов <i>R. rhodochrous</i> M33 aam I и <i>R. rhodochrous</i> M33 aam II	90
Таблица 3.10	Ациламидазная активность клеток штаммов серии <i>R. rhodochrous</i> M50 pRY16-N	100
Таблица 3.11	Сравнение транскрипционной активности регуляторных областей $P_{nh190}$ и $P_{nh569}$	105
Таблица 3.12	Интеграционные плазмиды серии pRY1-m	112
Таблица 3.13	Степень индуцибельности ионами кобальта ациламидазной активности клеток штамма <i>R. rhodochrous</i> M33 $P_{nh569}$ -aam	117
Таблица 3.14	Ациламидазная активность клеток штаммов <i>R. qingshengii</i> TA37 и <i>R. qingshengii</i> TA37 pRY1-8	128
Таблица 3.15	Возможные фенотипы штамма <i>E. coli</i> XL1-Blue, содержащего кассету $P_{nh569}$ -turboGFP-RBS <sub>E.coli</sub> -turboRFP	132
Таблица 3.16	Ациламидазная активность клеток штаммов, использованных в работе	138
Таблица 3.17	Параметры процессов биокаталитического синтеза N-замещённых акриламидов	146

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Список регуляторных областей и промоторов, использованных для экспрессии генов в *Rhodococcus*

Таблица А.1 – Регуляторные области и промоторы, использованные для экспрессии генов в *Rhodococcus*

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>nh</sub></b> (473 п.н.)	<i>R. ruber</i> TH3; гены нитрилгидратазы <i>nhVA</i>	<i>R. ruber</i> TH3	сильный	I: мочевины	1
P <sub>nhM</sub>	усиленный производный от P <sub>nh</sub> (473 п.н.)	<i>R. ruber</i> TH3 <i>R. opacus</i> PD630 <i>R. jostii</i> RHA1	сильный	–	1, 2, 3
<b>P<sub>ami</sub></b> или <b>P<sub>a2</sub></b>	<i>R. ruber</i> TH3; ген амидазы <i>ami</i>	<i>R. ruber</i> TH3	сильный	I: мочевины	1
P <sub>amiM</sub>	усиленный производный от P <sub>ami</sub>	<i>R. ruber</i> TH3 <i>R. jostii</i> RHA1	сильный	–	1, 3
P <sub>amic</sub>	усиленный производный от P <sub>ami</sub>	<i>R. ruber</i> TH3[64]	сильный	–	–
<b>P<sub>cs</sub></b>	<i>R. ruber</i> TH3; ген белка холодового шока	<i>R. ruber</i> TH3 <i>R. opacus</i> PD630	–	–	1, 2
P <sub>cs</sub> /P <sub>amiM</sub>	гибрид P <sub>cs</sub> и P <sub>amiM</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	сильный	–	2

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>50sl36</sub></b>	<i>R. ruber</i> TH3; ген L36 50S рибосомального белка	<i>R. ruber</i> TH3	–	I: мочевины	1
<b>P<sub>cbiM</sub></b>	<i>R. ruber</i> TH3; ген субстрат-специфического компонента CbiM транспортера кобальта ECF	<i>R. ruber</i> TH3	–	–	1
<b>P<sub>groE</sub></b>	<i>R. ruber</i> TH3; ген молекулярного шаперона GroEL	<i>R. ruber</i> TH3	–	I: мочевины	1
<b>P<sub>niami</sub></b>	<i>R. ruber</i> TH3; ген никотинамидазы	<i>R. ruber</i> TH3	–	I: мочевины	1
<b>P<sub>dapA</sub></b>	<i>C. glutamicum</i> ; ген дигидро дипиколинат синтазы <i>dapA</i>	<i>R. erythropolis</i> CCM2595	–	–	4
P <sub>dapAMA14</sub>	усиленный производный от P <sub>dapA</sub>	<i>R. erythropolis</i> CCM2595	–	–	4
P <sub>dapAMA16</sub>	усиленный производный от P <sub>dapA</sub>	<i>R. erythropolis</i> CCM2595	–	–	4

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>21</sub></b> или <b>P<sub>Constitutive</sub></b>	<i>S. lividans</i> ТК24; усиленный производный от P <sub>ermE<sub>p1</sub></sub> гена устойчивости к эритромицину <i>ermE</i>	<i>R. opacus</i> PD630 <i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	2, 3, 5
P <sub>Constitutive-1</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-2</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-3</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-4</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-5</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-6</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5



Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
P <sub>Constitutive-7</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-8</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-9</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-10</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-11</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-12</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-13</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-14</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
P <sub>Constitutive-15</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-16</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-17</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-18</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-19</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-20</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-21</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-22</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. opacus</i> PD630	–	–	5

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
P <sub>Constitutive-23</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. oracis</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-24</sub>	ослабленный производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. oracis</i> PD630	–	–	5
P <sub>Constitutive-25</sub>	производный от P <sub>Constitutive</sub>	<i>R. oracis</i> PD630	сильный	–	5
P <sub>Cory1</sub>	синтетическая регуляторная область для <i>C. glutamicum</i>	<i>R. oracis</i> PD630	сильный	–	2
P <sub>Cory2</sub>	синтетическая регуляторная область для <i>C. glutamicum</i>	<i>R. oracis</i> PD630	–	–	2
P <sub>RS23365</sub>	<i>R. oracis</i> PD630; рибосомальная РНК	<i>R. oracis</i> PD630	–	конститутивный	2
P <sub>RS28745</sub>	<i>R. oracis</i> PD630; тРНК триптофана	<i>R. oracis</i> PD630	–	конститутивный	2
P <sub>RS28770</sub>	<i>R. oracis</i> PD630; тРНК треонина	<i>R. oracis</i> PD630	–	конститутивный	2
P <sub>RS00085</sub>	<i>R. oracis</i> PD630; тРНК изолейцина	<i>R. oracis</i> PD630	сильный	конститутивный	2

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>PRS06620</b>	<i>R. oracus</i> PD630; тРНК глутамата	<i>R. oracus</i> PD630	–	конститутивный	2
<b>PRS02495</b>	<i>R. oracus</i> PD630; тРНК серина	<i>R. oracus</i> PD630	–	конститутивный	2
<b>P<sub>LacRO1</sub></b>	гибрид P <sub>nhM</sub> и сайта lacO (33 п.н.)	<i>R. oracus</i> PD630	–	I: ИПТГ	2
<b>P<sub>LacRO2</sub></b>	гибрид P <sub>nhM</sub> и минимального сайта lacO (17 п.н.)	<i>R. oracus</i> PD630	–	I: ИПТГ	2
<b>P<sub>LacRO3</sub></b>	гибрид P <sub>cs</sub> /P <sub>amiM</sub> и минимального сайта lacO (17 п.н.)	<i>R. oracus</i> PD630	–	I: ИПТГ	2
<b>P<sub>TRR</sub></b>	<i>L. plantarum</i> ; бактериофаг phigIe; ген cro-подобного репрессора <i>cnq</i>	<i>R. erythropolis</i> MAK154 <i>R. imtechensis</i> JCM13270 <i>R. koreensis</i> JCM10743 <i>R. oracus</i> JCM9703 <i>R. percolatus</i> JCM10087 <i>R. tukisamuensis</i> JCM11308 <i>R. maanshanensis</i> JCM11374	сильный	конститутивный	6

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
		<i>R. globerulus</i> NBRC14531 <i>R. yunnanensis</i> JCM13366 <i>R. corynebacterioides</i> JCM3376 <i>R. kroppenstedtii</i> JCM13011 <i>R. triatomae</i> JCM13396 <i>R. rhodnii</i> JCM3203 <i>R. pyridinivorans</i> JCM10940 <i>R. rhodochrous</i> NBRC15564 <i>R. ruber</i> NBRC15591 <i>R. zopfii</i> JCM9919 <i>R. erythropolis</i> JCM3191			
<b>P<sub>1200rep</sub></b>	<i>R. erythropolis</i> IAM 1400; гены репликации <i>repAB</i>	<i>R. erythropolis</i> MAK154	–	конститутивный	6
<b>P<sub>hsp</sub></b>	<i>S. griseus</i> ; ген белка теплового шока <i>hsp70</i>	<i>R. erythropolis</i> MAK154	–	конститутивный	6

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
P <sub>nit</sub>	конститутивный производный от P <sub>trpA</sub>	<i>R. erythropolis</i> JCM3201 [73, 168] <i>R. fascians</i> JCM10002 [73] <i>R. opacus</i> DSM44193 [73] <i>R. jostii</i> RHA1 <i>R. opacus</i> PD630 [80]	–	конститутивный	3, 7
P <sub>1</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген хиолин синтетазы	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген репрессора транскрипции кластера деления	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	–	7
P <sub>3</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген гипотетического белка	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>4</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген транскрипционного регулятора MerR-семейства	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	–	7
P <sub>5</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген бактериоферритина	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>6</sub></b>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген мембранного белка	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
<b>P<sub>7</sub></b>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген транскрипционного регулятора	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
<b>P<sub>8</sub></b>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген белка холодового шока	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
<b>P<sub>9</sub></b>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген поверхностного белка рибосомальной субъединицы	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
<b>P<sub>10</sub></b>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген транскрипционного регулятора MerR-семейства	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	7
<b>P<sub>11</sub></b>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген РНК-полимеразы	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
<b>P<sub>12</sub></b>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген гипотетического белка	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
P <sub>13</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген стеароил-КоА 9-десатуразы	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>14</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген гипотетического белка	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>15</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген транскрипцион-ного регулятора CarD-семейства	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>16</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген ко-шаперона GroES	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>17</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген молекулярного шаперона GroEL	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>18</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген L10 50S рибосомального белка	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>19</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген фактора элонгации трансляции Tu	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7
P <sub>20</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1; ген супероксид дисмутазы	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	7



Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
P <sub>M1</sub>	усиленный производный от P <sub>10</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	7
P <sub>M2</sub>	усиленный производный от P <sub>10</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	7
P <sub>M3</sub>	сокращенный производный от P <sub>10</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	7
P <sub>M4</sub>	ослабленный производный от P <sub>10</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	7
P <sub>M6</sub>	усиленный производный от P <sub>10</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	3, 7
P <sub>M7</sub>	ослабленный производный от P <sub>10</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	конститутивный	7
P <sub>T1</sub>	ослабленный производный от P <sub>10</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	конститутивный	3, 7
P <sub>T2</sub>	ослабленный производный от P <sub>10</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	конститутивный	3, 7
P <sub>M6-OP1</sub>	усиленный производный от P <sub>M6</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	3
P <sub>M6-OP2</sub>	усиленный производный от P <sub>M6</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	3
P <sub>M6-OP3</sub>	усиленный производный от P <sub>M6</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	3

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
P <sub>M6-OP4</sub>	усиленный производный от P <sub>M6</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	сильный	конститутивный	3
P <sub>M6-TO1</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и сайта tetO <sub>1</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO2</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и сайта tetO <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO3</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и сайта tetO <sub>1</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO4</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и сайта tetO <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO5</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и двух сайтов tetO <sub>1</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO6</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и двух сайтов tetO <sub>1</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO7</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и сайтов tetO <sub>1</sub> и tetO <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO8</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и сайтов tetO <sub>1</sub> и tetO <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO9</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и сайтов tetO <sub>1</sub> и tetO <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO10</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и сайтов tetO <sub>1</sub> и tetO <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
P <sub>M6-TO11</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и двух сайтов tetO <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>M6-TO12</sub>	гибрид P <sub>M6-OP3</sub> и двух сайтов tetO <sub>2</sub>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>smyc</sub>	<i>M. smegmatis</i>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	конститутивный	3
P <sub>tac</sub>	гибрид P <sub>trp</sub> и P <sub>lac</sub> из <i>E. coli</i>	<i>R. jostii</i> RHA1	–	–	3
P <sub>Tet</sub>	<i>E. coli</i> ; ген устойчивости к тетрациклину, оптимизирован для экспрессии в Actinomycetales	<i>R. jostii</i> RHA1 <i>R. opacus</i> PD630 [67, 77]	–	I: ангидротетрациклин	3
P <sub>dfdB</sub>	<i>Rhodococcus</i> sp. YK2; ген диоксигеназы <i>dfdB</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. RD2 [169] <i>R. erythropolis</i> TA422 [169] <i>R. erythropolis</i> JCM 2892 [169] <i>R. erythropolis</i> JCM 3201 [169]	сильный	конститутивный	–
P <sub>thcA</sub>	<i>R. erythropolis</i> JCM3201; ген альдегиддегидрогеназы <i>thcA</i>	<i>R. erythropolis</i> JCM3201 [75, 78, 170] <i>R. fascians</i> JCM10002 [73, 78] <i>R. opacus</i> DSM44193 [73, 78]	–	конститутивный	–

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>rrn</sub></b>	<i>Rhodococcus</i> sp. T09; 16S рибосомальная РНК	<i>Rhodococcus</i> sp. T09 [171] <i>R. erythropolis</i> IAM1399 [172]	–	конститутивный	–
<b>P<sub>45</sub></b>	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	<i>R. erythropolis</i> CCM2595 [24, 173] <i>R. opacus</i> PD630 [174]	сильный	конститутивный	–
<b>P<sub>600</sub></b>	<i>Rhodococcus</i> sp. DS7	<i>Rhodococcus</i> sp. DS7 [30]	сильный	конститутивный	–
<b>P<sub>57</sub></b>	<i>Rhodococcus</i> sp. DS7	<i>Rhodococcus</i> sp. DS7 [30]	сильный	конститутивный	–
<b>P<sub>lac</sub></b>	<i>E. coli</i> ; гены лактозного оперона	<i>R. opacus</i> PD630 [174-176]	–	I: ИПТГ	–
<b>P<sub>tipARo</sub></b>	<i>R. opacus</i> DSM44193; гены устойчивости к тиострептон <i>tipALRo</i> и <i>tipASRo</i>	<i>R. erythropolis</i> JCM3201[75]	сильный	I: тиострептон	–
<b>P<sub>tipA</sub> или P<sub>tipASc</sub></b>	<i>S. coelicolor</i> JCM4979; гены устойчивости к тиострептон <i>tipAL</i> и <i>tipAS</i>	<i>R. erythropolis</i> JCM3201 [75, 78] <i>R. fascians</i> JCM10002 [78] <i>R. opacus</i> DSM44193 [78]	сильный	I: тиострептон	–

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
$P_{\text{tipA-LG10}}$	усиленный производный от $P_{\text{tipA}}$ с RBS гена 10 бактериофага T7	<i>R. erythropolis</i> JCM3201 [73, 78] <i>R. opacus</i> PD630 [79, 80, 175, 177] <i>Rhodococcus</i> sp. СЕСТ3014 [178] <i>R. jostii</i> RHA1 [79, 177, 179] <i>R. fascians</i> F7 [79]	сильный	I: тиострептон	—
$P_{\text{tuf1}}$	<i>S. coelicolor</i> JCM4979; ген фактора элонгации трансляции EF-Tu <i>tuf1</i>	<i>R. erythropolis</i> JCM3201 [73, 75, 78, 180] <i>R. fascians</i> JCM10002 [78] <i>R. opacus</i> DSM44193 [75, 78] <i>Rhodococcus</i> sp. BCP1 [181] <i>R. opacus</i> PD630 [80]	—	—	—
$P_{\text{alkB}}$	<i>Rhodococcus</i> sp. BCP1; ген алкангидроксилазы <i>alkB</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. BCP1 [181]	—	II: C6–C22 н-алканы	—
$P_{\text{bnz}}$	<i>R. opacus</i> B-4; гены оперона бензолдиоксигеназы <i>bnz</i>	<i>R. opacus</i> B-4 [182]	—	II: ароматические углеводороды	—

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>Phenol</sub></b> или <b>P<sub>LPD06575</sub></b>	<i>R. oracis</i> PD630; ген малой субъединицы двухкомпонентной фенолгидроксилазы	<i>R. oracis</i> PD630 [67, 77]	–	II: фенол	–
<b>P<sub>LPD06568</sub></b>	<i>R. oracis</i> PD630; ген катехол-1,2-диоксигеназы	<i>R. oracis</i> PD630 [77]	–	II: фенол, бензоат натрия, гваякол	–
<b>P<sub>LPD06699</sub></b>	<i>R. oracis</i> PD630; ген транспортера шикимата	<i>R. oracis</i> PD630 [77]	–	II: фенол, гваякол, протокатеховая кислота, бензоат натрия, 4-гидроксибензойная кислота, ванилиновая кислота	–
<b>P<sub>LPD06740</sub></b>	<i>R. oracis</i> PD630; ген малой субъединицы двухкомпонентной фенолгидроксилазы	<i>R. oracis</i> PD630 [77]	–	II: фенол	–
<b>P<sub>LPD03031</sub></b>	<i>R. oracis</i> PD630; ген белка экструзии нитрила	<i>R. oracis</i> PD630 [77]	–	I: репрессия аммонием	–

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>BAD</sub></b>	<i>E. coli</i> ; гены арабинозного оперона <i>araBAD</i>	<i>R. opacus</i> PD630 [69, 77]	сильный	I: арабиноза	–
<b>P<sub>ace</sub></b> или <b>P<sub>Acet</sub></b>	<i>M. smegmatis</i> ; ген ацетамидазы <i>ace</i>	<i>R. opacus</i> PD630 [25, 77, 79, 175, 183] <i>R. jostii</i> RHA1[79] <i>R. fascians</i> F7 [79]	слабый	I: ацетамид	–
<b>P<sub>T7</sub></b>	<i>E. coli</i> ; бактериофаг T7	<i>R. opacus</i> PD630 [67]	сильный	конститутивный, требуется T7 РНК-полимераза	–
<b>P<sub>T7 + lacO</sub></b>	гибрид P <sub>T7</sub> и сайта lacO	<i>R. opacus</i> PD630 [67]	сильный	I: ИПТГ, требуется T7 РНК-полимераза	–
<b>P<sub>LPD06764</sub></b> или <b>P<sub>HVA</sub></b>	<i>R. opacus</i> PD630; гены пути утилизации 4-гидроксибензойной кислоты	<i>R. opacus</i> PD630 [67]	–	II: 4-гидроксибензойная кислота	–
<b>P<sub>LPD00563</sub></b> или <b>P<sub>VAN</sub></b>	<i>R. opacus</i> PD630; гены пути утилизации ванилиновой кислоты	<i>R. opacus</i> PD630 [67]	–	II: ванилиновая кислота	–
<b>P<sub>LPD06580</sub></b> или <b>P<sub>BEN</sub></b>	<i>R. opacus</i> PD630; гены пути утилизации бензоата натрия	<i>R. opacus</i> PD630 [67]	–	II: бензоат натрия	–

Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>LPD06578</sub></b> или <b>P<sub>GUA</sub></b>	<i>R. opacus</i> PD630; гены пути утилизации гваякола	<i>R. opacus</i> PD630 [67]	–	II: гваякол	–
<b>P<sub>dsz</sub></b>	<i>R. erythropolis</i> IGTS8; гены оперона десульфуризации <i>dszABC</i>	<i>R. erythropolis</i> CPE648 [76] <i>R. erythropolis</i> LSSE8-1 [184]	–	I: репрессия сульфатами и серосодержащими аминокислотами	–
<b>P<sub>kap1</sub></b>	<i>R. erythropolis</i> KA2-5-1	<i>R. erythropolis</i> KA2-5-1 [87] <i>R. erythropolis</i> MC1109 [185]	–	–	–
<b>P<sub>IGRI</sub></b>	<i>R. opacus</i> HL PM-1; гены кластера <i>npd</i> пути утилизации 2,4,6-тринитрофенола	<i>R. rhodochrous</i> ATCC 12674 [21]	–	II: 2,4-динитрофенол, 2,4,6-тринитрофенол, 2-хлор-4,6-динитрофенол, 2-метил-4,6-динитрофенол	–
<b>P<sub>IGRIV</sub></b>	<i>R. opacus</i> HL PM-1; гены кластера <i>npd</i> пути утилизации 2,4,6-тринитрофенола	<i>R. rhodochrous</i> ATCC 12674 [21]	–	II: 2,4-динитрофенол, 2,4,6-тринитрофенол, 2-хлор-4,6-динитрофенол, 2-метил-4,6-динитрофенол	–



Продолжение Таблицы А.1

Регуляторная область/ промотор	Микроорганизм; ген	Экспрессия в родококках	Сила*	Регулируемость**: индуктор	Набор***
<b>P<sub>catA</sub></b>	<i>R. erythropolis</i> CCM2595; ген катехол-1,2-диоксигеназы <i>catA</i>	<i>R. erythropolis</i> CCM2595 [186]	–	II: фенол; репрессия сукцинатом	–
<b>P<sub>catR</sub></b>	<i>R. erythropolis</i> CCM2595; ген транскрипционного регулятора IclR-семейства <i>catR</i>	<i>R. erythropolis</i> CCM2595 [186]	слабый	конститутивно репрессируется белком CatR	–
<b>P<sub>bphA1</sub></b> или <b>P<sub>bphAa</sub></b>	<i>R. jostii</i> RHA1; гены кластера пути утилизации бифенила	<i>R. jostii</i> RHA1[23, 89, 91] <i>R. erythropolis</i> IAM1399 [23, 89, 91]	–	II: ароматические соединения	–
<b>P<sub>ba2</sub></b>	гибрид P <sub>bphAa</sub> (24 п.н.) и P <sub>benA</sub> (98 п.н.)	<i>R. erythropolis</i> IAM1399 [91]	–	II: этилбензол	–
<b>P<sub>ba2A23</sub></b>	усиленный производный от P <sub>ba2</sub>	<i>R. erythropolis</i> IAM1399 [91]	–	II: этилбензол	–
<b>P<sub>ba2T1</sub></b>	усиленный производный от P <sub>ba2</sub>	<i>R. erythropolis</i> IAM1399 [91]	–	II: этилбензол	–
<b>P<sub>ba2G3</sub></b>	усиленный производный от P <sub>ba2</sub>	<i>R. erythropolis</i> IAM1399 [91]	–	II: этилбензол	–
<b>P<sub>icl</sub></b>	<i>R. erythropolis</i> PR4; ген изоцитрат лиазы	<i>R. erythropolis</i> JCM3201 [180]	сильный	II: метанол	–
<b>Жирным</b> выделены номера уникальных регуляторных областей и промоторов					
*Сила промотора указана в соответствии с литературным источником					
**Регулируемость указана согласно классу (см. Раздел 1.2.2 и Таблица 1.2)					
***Номер набора указан согласно Таблице 1.1					

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Параметры возбуждения и излучения флуоресценции белков TurboGFP и TurboRFP

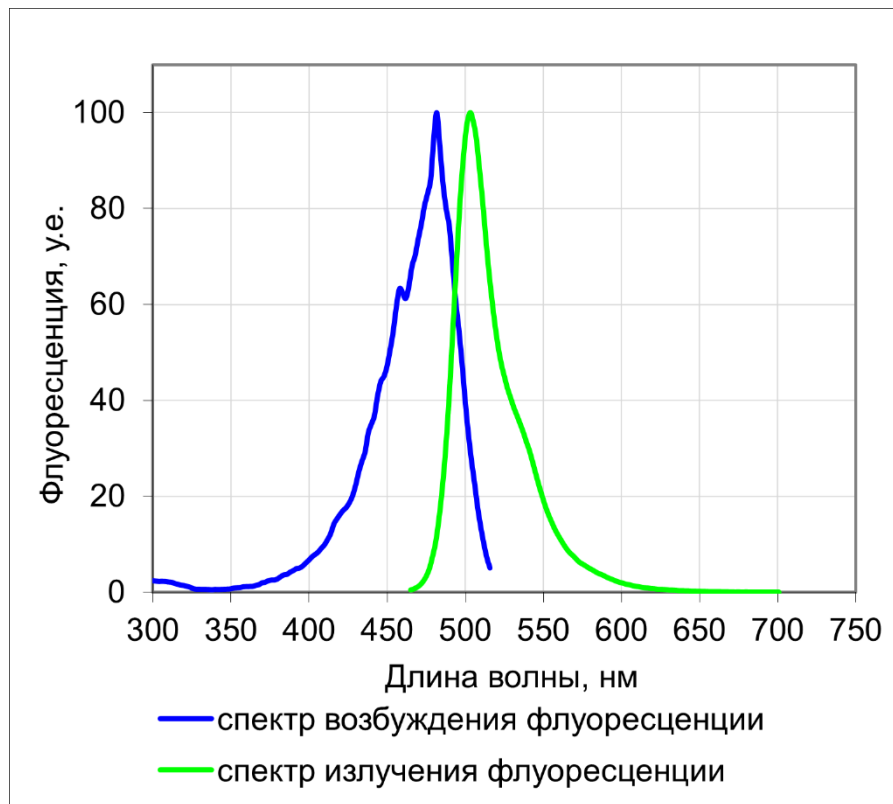


Рисунок Б.1 – Спектры возбуждения и излучения флуоресценции белка TurboGFP. Данные взяты с сайта производителя белка ЗАО ЕВРОГЕН

(URL: <https://ftp.evrogen.ru/products/fp/basic/turbo-colors/turbo-gfp>)

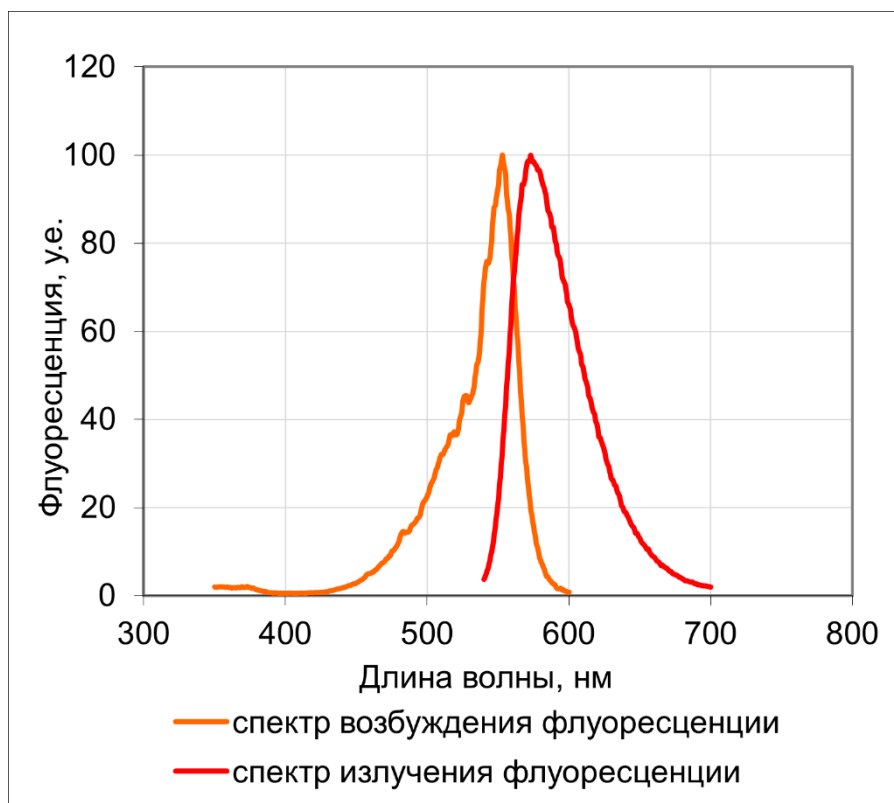


Рисунок Б.2 – Спектры возбуждения и излучения флуоресценции белка TurboRFP. Данные взяты с сайта производителя белка ЗАО ЕВРОГЕН (URL: <https://ftp.evrogen.ru/products/fp/basic/turbo-colors/turbo-rfp>)

Таблица Б.1 – Параметры\* белков TurboGFP и TurboRFP

Белок	Пик возбуждения флуоресценции, нм	Пик излучения флуоресценции, нм
TurboGFP	482	502
TurboRFP	553	574

\*значения взяты с сайта производителя белков ЗАО ЕВРОГЕН