

Гены *nhmCD* – мочевино-зависимые регуляторы активности промотора генов нитрилгидратазы из *Rhodococcus rhodochrous* M8**Научный руководитель – Лавров Константин Валерьевич***Исаева С.М.¹, Шемякина А.О.²*

1 - Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева, Почвоведения, агрохимии и экологии, Микробиологии и иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: sofya.m.isaeva@gmail.com*; 2 - Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Курчатовский институт, Москва, Россия, *E-mail: shemyakina.a.o@gmail.com*

Бактерии рода *Rhodococcus* обладают большим потенциалом для применения в биотехнологии в качестве биокатализаторов и биоремедиационных агентов благодаря разнообразному спектру уникальных катаболических ферментов и прочной клеточной стенке. Конструирование штаммов родококков для промышленности затруднено, в частности, скудным набором высокоактивных регулируемых промоторов.

Промышленный штамм *Rhodococcus rhodochrous* M8 [6] обладает высокоактивным промотором генов нитрилгидратазы P_{nh} [1], индуцируемым при выращивании клеток на мочевины как источнике азота. Предполагаемыми транскрипционными регуляторами P_{nh} являются близкорасположенные гены *nhmCD* [2, 3], но степень их участия в его регуляции детально не изучалась. Цель данной работы - изучение степени участия генов *nhmCD* в мочевино-зависимой регуляции активности P_{nh} в производных от *R. rhodochrous* M8 штаммах.

Были сконструированы две плазмиды, $pRY3-nhmCD-P_{nh}-aam$ и $pRY3-P_{nh}-aam$. Они содержат ген репортёр (ациламидаза *aam* из *Rhodococcus erythropolis* TA37 [5]) под контролем P_{nh} и различаются наличием или отсутствием генов *nhmCD*. Количество продукта данного гена-репортёра, измеряемое по ациламидазной активности целых клеток, позволяет судить об активности контролирующего его промотора [3].

Плазмиды ввели в штамм *R. rhodochrous* M33Δ, производный от штамма M8, лишённый собственных P_{nh} и *nhmCD* [4]. Оба плазмидных штамма выращивали на минимальной синтетической среде MS с глюкозой и апрамицином, в двух вариантах, с мочевиной 6 г/л или NH_4NO_3 2 г/л в качестве единственных источников азота. Удельную ациламидазную активность клеток (Аам) измеряли в динамике в течение 91 ч, для расчётов брали значения в 44 часа культивирования, когда ОП обоих штаммов достигала 3 ед. Аам активность индуцировалась мочевиной в 49 раз в присутствии генов *nhmCD* (ок. 12 и 0,2 мкмоль / мин * мг с.в.к. +/- мочевины), и не зависела от присутствия мочевины в отсутствие этих генов (ок. 12 мкмоль / мин * мг с.в.к. в обоих вариантах, см рис. 1).

Различия в количестве ациламидазы в клетках позволяет считать, что гены *nhmCD* являются мочевино-зависимыми регуляторами промотора P_{nh} . Данные результаты закладывают основу для разработки новой регуляторной системы экспрессии для бактерий *Rhodococcus*.

Благодарим за помощь в работе: Лаврова К.В., Новикова А.Д., Леонову Т.Е., Яненко А.С.

Выполнено в рамках Тематического плана НИЦ "Курчатовский институт"

Источники и литература

- 1) Grechishnikova E.G., Shemyakina A.O., Novikov A.D., Kalinina T.I., Lavrov K.V., Yanenko A.S. Structure of the Regulatory Region of Nitrile Hydratase Genes in *Rhodococcus rhodochrous* M8, a Biocatalyst for Production of Acrylic Heteropolymers // *Microbiology*. 2024. No. 93(4). P. 472-477.

- 2) Komeda H., Kobayashi M., Shimizu S. A Novel Gene Cluster Including the Rhodococcus rhodochrous J1 nhlBA Genes Encoding a Low Molecular Mass Nitrile Hydratase (L-NHase) Induced by Its Reaction Product // Journal of biological chemistry. 1996. No. 271(26). P. 15796-15802.
- 3) Lavrov K. V., Shemyakina A. O., Grechishnikova E. G., Gerasimova T. V., Kalinina T. I., Novikov A. D., Leonova T. E., Ryabchenko L. E., Bayburdov T. A., Yanenko A. S. A new concept of biocatalytic synthesis of acrylic monomers for obtaining water-soluble acrylic heteropolymers // Metab. Eng. Commun. 2024. No. 18. P. e00231
- 4) Lavrov K. V., Shemyakina A. O., Grechishnikova E. G., Novikov A. D., Kalinina T. I., Yanenko A. S. In vivo metal selectivity of metal-dependent biosynthesis of cobalt-type nitrile hydratase in Rhodococcus bacteria: a new look at the nitrile hydratase maturation mechanism? // Metallomics. 2019. No. 11. P. 1162-1171.
- 5) Lavrov K.V., Zalunin I.A., Kotlova E.K. Yanenko A.S. A new acylamidase from Rhodococcus erythropolis TA37 can hydrolyze N-substituted amides // Biochemistry (Moscow). 2010. No. 75. P. 1006-1013.
- 6) Pogorelova T.E., Ryabchenko L.E., Sunzov N.I., Yanenko A.S. Cobalt-dependent transcription of the nitrile hydratase gene in Rhodococcus rhodochrous M8 // FEMS Microbiol. Lett. 1996. No. 144. P. 191-195.

Иллюстрации

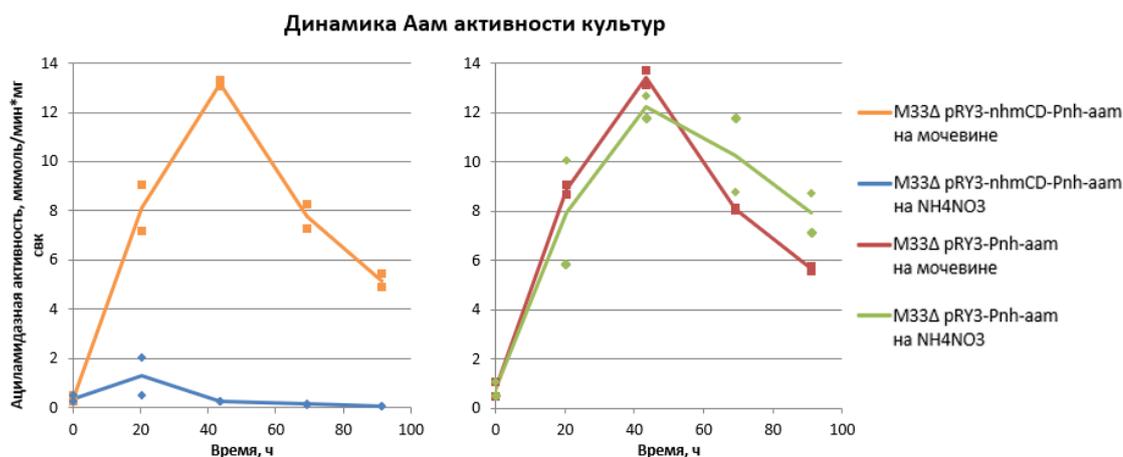


Рис. : Динамика Аам активности штаммов М33Δ pRY3-Pnh-aam и М33Δ pRY3-nhmCD-Pnh-aam при выращивании с мочевиной или NH4NO3 в качестве единственных источников азота.