

УДК 579.258

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *ALKB* И *MMOAA* В КЛЕТКАХ *RHODOCOCCUS* SPP. В ПРИСУТСТВИИ *n*-АЛКАНОВ C₃–C₁₆

Л.П. Комарова, А.В. Криворучко, И.Б. Ившина

ФГАОУ ВО “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия

“Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН” – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

В присутствии *n*-алканов C₃–C₄ и C₉–C₁₆ в клетках коллекционных штаммов *Rhodococcus* в 30000–3000000 раз увеличивается уровень экспрессии генов *alkB*, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ. В клетках *R. ruber* в присутствии *n*-алканов C₃–C₄ в 26000–52000 раз также увеличивается уровень экспрессии гена *mmoAa*, кодирующего синтез α -субъединицы пропанмонооксигеназы. В присутствии *n*-алканов C₅–C₈ экспрессия данных генов не изменяется по сравнению с контролем (среда LB).

Ключевые слова: актиномицеты рода *Rhodococcus*, *n*-алканы, биодegradация, экспрессия генов, алкан-1-монооксигеназы *AlkB*, пропанмонооксигеназа *MmoA*.

EXPRESSION OF THE *ALKB* AND *MMOAA* GENES IN *RHODOCOCCUS* CELLS IN THE PRESENCE OF C₃–C₁₆ *n*-ALKANES

L.P. Komarova, A.V. Krivoruchko, I.B. Ivshina

Perm State University, Perm, Russia

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Centre, Perm, Russia

In the presence of *n*-alkanes C₃–C₄ and C₉–C₁₆ in collection strains of *Rhodococcus* cells, the expression level of *alkB* genes encoding the synthesis of alkan-1-monooxygenases increases in 30000–3000000 times. Additionally in *R. ruber* cells in the presence of *n*-alkanes C₃–C₄, the expression level of *mmoAa* gene encoding the synthesis of α -subunit of propane monooxygenase increases in 26000–52000 times. In the presence of toxic *n*-alkanes C₅–C₈, the expression of *alkB* and *mmoAa* genes does not change compared to the control (LB medium).

Keywords: actinomycetes of the genus *Rhodococcus*, *n*-alkanes, biodegradation, gene expression, alkane-1-monooxygenases *AlkB*, propane monooxygenase *MmoA*.

Введение. Актиномицеты рода *Rhodococcus* способны к биодegradации широкого спектра углеводородных соединений, в том числе линейных и разветвленных алканов с длиной цепи от 2 до ≥ 31 атома углерода, бензола и его гомологов, полициклических ароматических углеводородов, а также производных углеводородов и гетероатомных компонентов нефти. В связи с этим перспективно использование родококков в качестве нефтедеструкторов, продуцентов биосурфактантов, а также биоиндикаторов при нефтегазопроисловых

исследованиях [2,3,5]. Подбор наиболее подходящих для биотехнологии штаммов и получение генно-модифицированных клонов с улучшенными функциональными характеристиками связаны с определением путей метаболизма углеводов и идентификацией генов и ферментов, участвующих в деградации данных соединений. Родококки обладают способностью экспрессировать более одной ферментной системы, участвующих в окислении углеводов, включая метан/пропан монооксигеназы MmoABC, алкан-1-монооксигеназы AlkB, цитохром-P450-зависимые монооксигеназы, диоксигеназы, лакказы, пероксидазы, дегидрогеназы [2,3,5,6]. Субстратная специфичность этих ферментов и их роль в окислении определённых соединений недостаточно исследованы [4]. Одним из методов изучения функций ферментов является определение уровней экспрессии кодирующих их генов [1,4].

Цель настоящей работы – определение уровней экспрессии генов *alkB* и *mmoAa*, кодирующих алкан-1-монооксигеназы и α -субъединицу гидроксилазы А в составе пропанмонооксигеназного комплекса MmoABC соответственно, у родококков в присутствии *n*-алканов C₃–C₁₆.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, #285 WFCC, <http://www.iegmcoll.ru/>) с известными полногеномными последовательностями: *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, ИЭГМ 1156, *Rhodococcus* sp. ИЭГМ 1354, ИЭГМ 1372, ИЭГМ 1379, ИЭГМ 1381 и ИЭГМ 1404.

Геномные последовательности этих штаммов депонированы в открытых базах данных DDBJ/ENA/GenBank под номерами CCSD01000001–CCSD01000115, JASHLE010000001–JASHLE010000075, JASHKT010000001–JASHKT010000118, JASHKS01000000–JASHKS010000104, JASHKR010000001–JASHKR010000230, JASHKQ010000001–JASHKQ010000043 и JASHKP010000001–JASHKP010000055 соответственно.

Бактерии выращивали в среде LB (Sigma-Aldrich, США), в жидкой или на агаризованной минеральной среде “*Rhodococcus-surfactant*” (RS) в присутствии 0,1 вес. % *n*-пентана, *n*-гексана, *n*-гептана, *n*-октана, *n*-нонана, *n*-декана, *n*-ундекана, *n*-додекана, *n*-тридекана, *n*-тетрадекана, *n*-пентадекана или *n*-гексадекана, а также в атмосфере газо-воздушной смеси воздух: пропан или *n*-бутан 4:1 (все реактивы хч, Sigma-Aldrich, США). Состав среды RS, г/л: KH₂PO₄ – 2,0, K₂HPO₄ – 2,0, NaCl – 1,0, KNO₃ – 1,0, MgSO₄ × 7H₂O – 0,2, CaCl₂ – 0,02, FeCl₃ × 7·H₂O – 0,01, (NH₄)₂·SO₄ – 2,0 [<http://www.iegmcoll.ru/medium/med11.html>, 15.07.2024].

Бактерии выращивали при перемешивании (160 об/мин) или стационарно, при температуре 28°C в течение 24–48 ч.

Клетки разрушали с помощью 40 мг/мл лизоцима (Helicon, Москва) при температуре 37°C в течение 1 ч и далее порционно добавляли 10% додецилсульфата натрия либо путем перемешивания с металлическими шариками диаметром 1 мм (Китай), 10 шт/мл, с помощью гомогенизатора FastPrep-24 5G MP (Biomedicals, США) в течение 2 мин. Для выделения РНК использовали набор RNA Solo с ДНКазой в составе (Евроген, Москва).

Далее проводили ПЦР с обратной транскрипцией для получения кДНК на матрице РНК с использованием набора реактивов с ревертазой MMLV или Mint (Евроген, Москва) согласно инструкциям производителя. Для постановки ПЦР использовали праймеры, последовательности которых приведены в табл. 1.

Условия проведения ПЦР: 95°C – 3 мин, далее 35 циклов с чередованием температур 95°C – 30 с, 60°C/70°C – 30 с, 72°C – 30 с, в последнем цикле 72°C – 10 мин. Исходную концентрацию РНК и кДНК контролировали при помощи флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Уровни экспрессии генов определяли по количеству полученных транскриптов, при этом определяли относительные уровни экспрессии в клетках, выращенных в присутствии *n*-алканов C₃–C₁₆ по сравнению с контролем (среда LB). Все эксперименты проводили в 3-кратной повторности.

Таблица 1

Праймеры, использованные в работе

Таргетная последовательность	Название	Последовательность 5' → 3'	Ссылка
<i>alkB1</i> RHRU231v1_860124	P1-330015-F P2-330015-R	GGAATTAATTCCGGATCCGGTGGGGGA CGGTG AGTGCGGCCGCAAGCTTGCTGTGCCG GGCG	Разработаны авторами
<i>alkB2</i> RHRU231v1_330015	P3-860124-F P4-860124-R	GGAATTAATTCCGGATCCGACGACGTC GGACATCG TCGAGCTGCGAATAACTCTC	
<i>mmoAa</i> RHRU231v1_30049	mmoA1-F mmoA2-R	TTCATGGAGATCATGAAGCC GACGACCTGCAAATTCATG	
<i>alkB</i> консервативный домен	<i>alkB</i> Forward <i>alkB</i> Reverse	TACTACCGGTACTGCACCTAC CTGGAAGTGATACAGGAAGAT	[6]

Результаты и обсуждение. По нашим данным, гены *alkB* и *mmoAa* экспрессируются в клетках *R. ruber* и *Rhodococcus* sp. в присутствии *n*-алканов C₃–C₁₆. Уровень экспрессии генов *alkB* у *R. ruber* зависит от длины цепи алкана. Количество транскриптов, образующихся на матрице *alkB1* или *alkB2* (у *R. ruber* 2 алкан-1-монооксигеназы), увеличивается в 30000–3000000 раз в присутствии *n*-алканов C₃–C₄ и C₉–C₁₆ по сравнению с контролем (среда LB). Исключение составляют *n*-тридекан и *n*-пентадекан, добавление которых в среду культивирования родококков приводит к незначительному (в 8 и 10 раз соответственно) увеличению относительного уровня экспрессии генов *alkB*, что может быть связано с особенностями их усвоения и включения в метаболизм бактериальных клеток.

Нами зарегистрировано усиление экспрессии обоих генов *alkB* *R. ruber*, однако уровни их экспрессии между собой значительно отличаются, обычно, один из двух генов экспрессируется сильнее. В отдельных случаях (например, при использовании *n*-нонана, *n*-тридекана, *n*-пентадекана или *n*-гексадекана) увеличивается экспрессия только одного гена, тогда как уровень экспрессии второго гена не изменяется по сравнению с контролем (рис. 1). Это свидетельствует о достаточно сложной регуляции первичных этапов окисления алканов родококками, позволяющей им рационально использовать клеточные ресурсы. В то же время наличие двух генов *alkB* гарантированно обеспечивает вовлечение алканмонооксигеназ в процесс метаболизации *n*-алканов и использование данных соединений в качестве ростовых субстратов. В присутствии *n*-пентана, *n*-гексана, *n*-гептана и *n*-октана (C₅–C₈) увеличения экспрессии генов *alkB* в клетках *R. ruber* не наблюдается (рис. 1).

Известно, что эти соединения являются летучими и высокотоксичными субстратами [<https://www.iloencyclopaedia.org/ru/part-xviii-10978/guide-to-chemicals/item/1049-hydrocarbons-saturated-and-alicyclic>, 15.07.2024]. В этом случае рост бактериальных клеток в их присутствии, по-видимому, связан с участием других оксидоредуктаз, не относящихся к алканмонооксигеназам и экспрессирующихся в условиях ответа клеток на стресс.

Экспрессируемая в клетках *R. ruber* пропанмонооксигеназа MmoAa более специфична в отношении *n*-алканов по сравнению с алкан-1-монооксигеназами AlkB. Установлены предпочтения этого фермента в отношении газообразных алканов – пропана и *n*-бутана. В присутствии данных углеводородов отмечается высокое, в 26000–52000 раз, увеличение уровня экспрессии гена *mmoAa*, тогда как в присутствии *n*-алканов с длиной цепи ≥C₅ экспрессия данного гена не изменяется либо увеличивается не более чем в 134 раза.

Эти результаты соответствуют современным представлениям о субстратной специфичности пропан/бутан монооксигеназ в отношении короткоцепочечных алканов [4]. В клетках *Rhodococcus* sp., растущих в присутствии пропана, отмечено также увеличение в 80–600000 раз уровня экспрессии генов *alkB*.

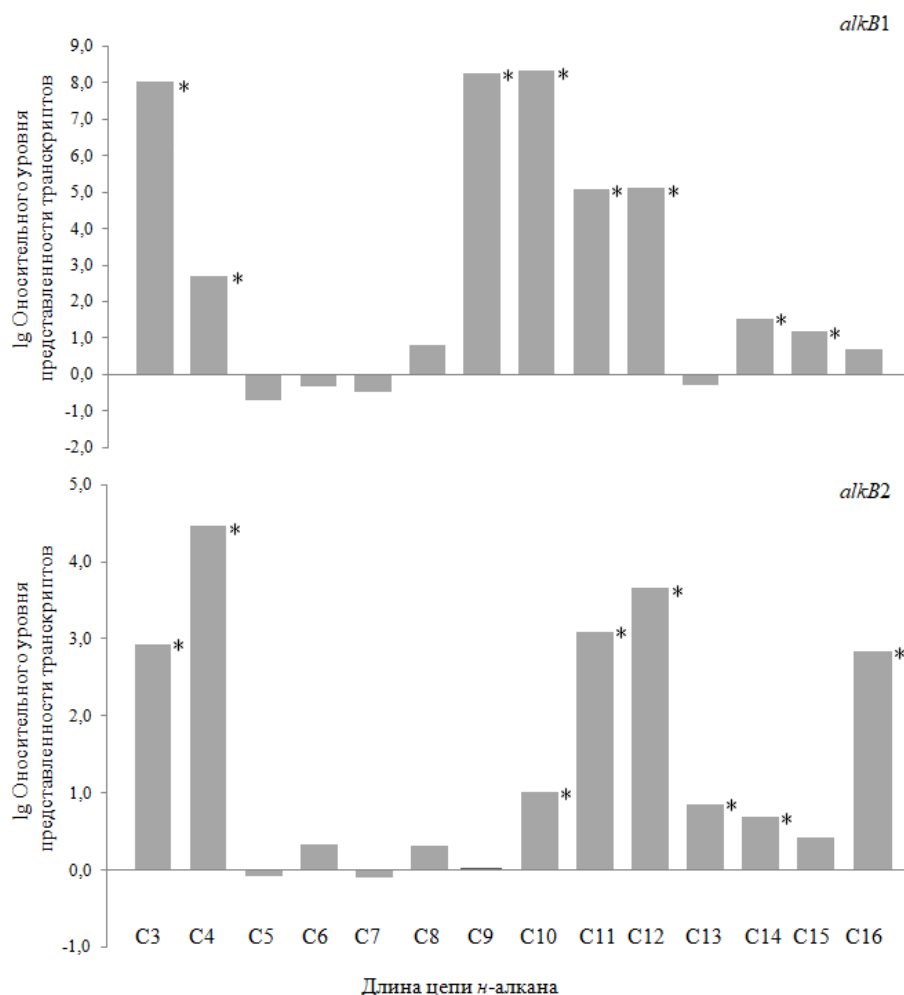


Рис.1. Изменения уровней экспрессии генов *alkB1* и *alkB2* в клетках *R. ruber* ИЭГМ 231 в присутствии *n*-алканов C₃–C₁₆. * Статистически достоверно от контроля (LB) при $p < 0,05$

Заключение. Таким образом, в процессах окисления *n*-алканов у родококков участвуют, по крайней мере, два типа ферментов – алкан-1-монооксигеназы AlkB и пропанмонооксигеназы MmoAa. Алкан-1-монооксигеназы AlkB обладают широкой субстратной специфичностью и участвуют в окислении *n*-алканов C₃–C₄ и C₉–C₁₆.

Пропанмонооксигеназа MmoAa более специфична: уровень ее экспрессии в клетках *R. ruber* значительно повышается в присутствии газообразных *n*-алканов – пропана и *n*-бутана. Рост родококков в присутствии жидких *n*-алканов C₅–C₈, по-видимому, связан с участием других типов ферментов, не относящихся к AlkB и MmoAa: экспрессия кодирующих их генов в присутствии данных соединений в клетках *Rhodococcus* spp. не увеличивается.

Благодарности. Исследование выполнено в рамках госзаданий 122031400671-1, 124020500028-4 и проведено с использованием оборудования ЦКП “Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов” и “Исследование материалов и веществ” Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук. ПФИЦ УрО РАН.

Библиографический список

1. Патрушев Л.И. Экспрессия генов. Москва. 2000. 526 с.
2. Fernandes P.J., Powell J.A.C., Archer J.A.C. Construction of *Rhodococcus* random mutagenesis libraries using Tn5 transposition complexes // *Microbiology Society*. 2001. V. 147. No. 9. P. 2529–2536.
3. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Hydrocarbonoxidizing bacteria and their potential in eco-biotechnology and bioremediation. In: *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications* // Ed. Kurtböke I. Elsevier, Amsterdam. 2017. P. 121–148.
4. Koch D.J., Chen M.M., van Beilen J.B., Arnold F.H. *In vivo* evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases AlkB and CYP153A6 // *Applied and Environmental Microbiology*. 2009. V. 75. No. 2. P. 337–344.
5. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Production of trehalolipid biosurfactants by *Rhodococcus*. *Biology of Rhodococcus*, 2nd edition // Ed. H. Alvarez. Springer Nature. 2019. P. 271–298.
6. Táncsics A., Benedek T., Szoboszlai S., Veres P.G., Farkas M., Mathe I., Marialigeti K., Kukolya J., Lanyi S., Kriszt B. The detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monooxygenase gene of members of the genus *Rhodococcus* // *Systematic and Applied Microbiology*. 2015. V. 38. P. 1–7.