

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ДЕСТРУКЦИИ НАФТАЛИНА И САЛИЦИЛАТА В ШТАММЕ *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS3701 В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА АЗОТА, ЖЕЛЕЗА И КИСЛОРОДА

Позднякова-Филатова И.Ю.¹, Скулкина К.М.², Петриков К.В.¹,
Ветрова А.А.¹, Казанцева О.А.¹, Фролова А.А.¹, Захарова М.В.¹

¹ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия,

irafilatova24@gmail.com

²МГУ, Москва, Россия

Эффективность биопрепаратов для ремедиации почв на основе штаммов-деструкторов нефтепродуктов может снижаться при перенесении эксперимента из лабораторных условий в полевые. Существует ряд работ, в которых показано снижение биодеструкции ароматических углеводородов при наличии альтернативных источников углерода или при недостатке железа, т.е. в условиях, учитывающих особенности природных экосистем. Чтобы решить данную проблему, необходимо знать, что именно ухудшает трансформацию нефтепродуктов и их метаболитов. Однако в настоящий момент отсутствует информация о том, как процессы их деструкции связаны с глобальными метаболическими процессами клетки на регуляторном уровне.

Pseudomonas putida BS3701 способен использовать как нафталин, так и салицилат, в качестве единственных источников углерода и энергии. Гены, вовлеченные в деструкцию нафталина до салицилата, организованы единым опероном, расположенным на плазмиде pBS1141. Конверсия салицилата в катехол осуществляется, предположительно, лишь салицилатгидроксилазой NahU, ген *nahU* локализован на хромосоме и не входит в состав других оперонов. Нами были смоделированы условия дефицита азота, железа и кислорода при выращивании штамма *Pseudomonas putida* BS3701, после чего произведено измерение количества мРНК генов, участвующих в деструкции нафталина и салицилата, методом RT-qPCR. Это стало отправной точкой при отборе транскрипционных регуляторов, потенциально способных оказывать влияние на процесс деструкции.

Для постановки RT-qPCR были подобраны специфические праймеры к гену нафталин 1,2-диоксигеназы (*nahAa*) и салицилатгидроксилазы (*nahU*), в качестве нормировочного использовали ген *16S rRNA*. В результате процесса амплификации образовывался единственный, специфический, продукт, а эффективность амплификации была ~2.

Моделирование процесса дефицита азота достигалось уменьшением концентрации хлорида аммония с 5 мМ до 1 мМ. Создание условий дефицита азота подтверждалось увеличением количества мРНК гена глутаминсинтазы. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали как сукцинат, так и салицилат. Независимо от источника углерода профиль уровня

мРНК при изменении количества азота в среде культивирования был одинаков: количество мРНК достоверно снижалось при выращивании клеток в условиях дефицита.

В литературе описано два регуляторных белка, способных оказывать влияние на процесс инициации транскрипции в условиях дефицита азота: активатор NtrC-P, который регулирует сигма 54-зависимые гены, и репрессор Lrp. В связи с тем, что при снижении количества азота мы наблюдали уменьшение количества мРНК, для дальнейших исследований был выбран транскрипционный регулятор Lrp. Мы очистили Lrp-6His и проверили его способность к связыванию с регуляторной областью нафталин 1,2-диоксигеназы (*nahAa*) и салицилатгидроксилазы (*nahU*). Выяснили, что Lrp-6His способен образовывать комплекс с ДНК, константа диссоциации ДНК-белкового комплекса для обеих регуляторных областей в созданных условиях была 150 нМ.

Моделирование процесса дефицита железа достигалось путем добавления в ростовую среду хелатора 2,2-дипиридила в конечной концентрации 100 мМ. Создание условий дефицита железа подтверждалось увеличением количества мРНК генов, участвующих в синтезе сидерофоров. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали как глюкозу, так и салицилат. Независимо от источника углерода профиль уровня мРНК при изменении количества доступного железа в среде культивирования был одинаков: количество мРНК достоверно снижалось при выращивании клеток в условиях дефицита.

В литературе описан регуляторный белок Fur (Ferric uptake regulator), который в присутствии ионов Fe^{2+} способен связываться в промоторной области некоторых генов и угнетать процесс транскрипции. Помимо этого Fur может функционировать как антирепрессор, конкурируя с белком нуклеоида H-NS и вытесняя его с промотора. Наши экспериментальные данные указывают на то, что Fur не может выступать в качестве репрессора для исследуемых нами генов, в связи с этим в дальнейшем проверяли его способность конкурировать с белком H-NS за промоторную область ДНК. Мы очистили Fur-6His и H-NS-6His проверили их способность к связыванию с регуляторной областью нафталин 1,2-диоксигеназы (*nahAa*) и салицилатгидроксилазы (*nahU*). Выяснили, что H-NS-6His способен образовывать комплекс с ДНК, константа диссоциации ДНК-белкового комплекса для обеих регуляторных областей в созданных условиях была 5 нМ. Fur-6His оказался не способен образовывать комплекс.

Моделирование процесса дефицита кислорода достигалось заполнением емкости для культивирования практически под «горлышко». При культивировании в условиях ограниченного содержания кислорода выход на стационарную фазу роста наблюдался на 5 сутки, в то время как при росте в «стандартных» условиях стационарной фазы культура достигала через 24 часа.

Дефицит кислорода отразился и на КОЕ, оно было на порядок ниже, в сравнении с культивированием в «стандартных» условиях. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали как глюкозу, так и салицилат. Независимо от источника углерода профиль уровня мРНК при изменении количества кислорода в среде культивирования был одинаков: количество мРНК достоверно увеличивалось при выращивании клеток в условиях дефицита.

Нафталин 1,2 диоксигеназа и салицилатгидроксилаза относятся к классу оксидоредуктаз. Молекулярный кислород является для них кофактором, без которого сам фермент становится нефункциональным. Возможно, посредством экстенсивного наращивания количества мРНК генов ферментов деструкции клетка старается скомпенсировать недостаток энзиматической активности и повысить эффективность потребления ароматического субстрата. В условиях изменения количества кислорода, бактериальная клетка может испытывать окислительный стресс, т.е. увеличение продукции АФК будет стимулировать процесс транскрипции посредством активации редокс-чувствительных транскрипционных регуляторов. Одним из таких белков является транскрипционный фактор OxyR, в условиях окислительного стресса он активирует процесс транскрипции подконтрольных генов. В то же время в литературе присутствуют данные о белке нуклеоида репрессоре H-NS, синтез которого блокируется в условиях окислительного стресса, вследствие чего может наблюдаться увеличение количества мРНК контролируемых им генов. Мы очистили OxyR-6His и проверили его способность к связыванию с регуляторной областью нафталин 1,2-диоксигеназы (*nahAa*) и салицилатгидроксилазы (*nahU*). OxyR-6His оказался не способен образовывать комплекс.

В дальнейшем планируется исследование участия белков Lrp и H-NS в регуляции транскрипции генов деструкции нафталина и салицилата штамма *Pseudomonas putida* BS3701.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-05071.