

РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БЕЛКИ ТЕПЛОВОГО ШОКА, В СИНТЕЗЕ БИОСУРФАКТАНТОВ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS* 5Ap

© 2023 г. А. А. Букляревич^a, М. А. Титок^a, *

^aБелорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 18.01.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

В результате проведенного исследования впервые установлена роль структурных *groESL*, *dnaJ* и регуляторного генов *hrcA*, кодирующих синтез белков теплового шока, в синтезе биосурфактантов бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. Для регуляторного белка, кодируемого геном *hrcA*, сайты связывания CIRCE выявлены в промоторных участках генов *groESL*, *groEL2* и *fmdB*. Установлено, что по сравнению с температурой 28°C в поздней логарифмической фазе роста в среде с гексадеканом при 42°C экспрессия генов *groESL* и *groEL2* возрастала в 4.4 и в 5.3 раза соответственно. В то же время при разных температурных режимах (28 и 42°C) изменение экспрессии генов *hrcA* и *fmdB* не регистрировали. В отсутствие негативного регулятора HrcA увеличивалась экспрессия генов *groESL* в 14.4 и 3.5 раза, гена *groEL2* — в 9.6 и 2.7 раза и гена *fmdB* — в 1.82 и 2.52 раза при температуре 28 и 42°C соответственно. Продукты генов *dnaJ* и *hrcA* необходимы для синтеза трегалолипидов при разных температурных режимах, причем их роль возрастала при повышенной температуре (у мутанта с нарушенным геном *dnaJ* синтез трегалолипидов при температуре 28 и 42°C снижался в 1.8 и в 2.5 раз соответственно, а у мутанта с нарушенным геном *hrcA* — в 1.5 и в 6.6 раз соответственно). В то же время эмульгирующая активность не изменялась у всех мутантных вариантов при 28°C и уменьшалась при температуре 42°C в 1.4 и 1.9 раз, соответственно, у мутантов с нарушенным геном *groESL* и *hrcA*. Полученные результаты свидетельствуют о сложной химической природе биоПАВ, продуцируемых бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap (эмульгаторы, включающие трегалолипиды и соединения иного химического состава). В синтезе этих соединений при разных температурных режимах ключевую роль играют шапероны Gro и регуляторный белок HrcA, тогда как продукт гена *dnaJ* необходим только для синтеза трегалолипидов.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, *groESL*, *dnaJ*, *hrcA*, HrcA-репрессор, биоПАВ

DOI: 10.31857/S0026365623600049, **EDN:** RIYXOI

Бактерии рода *Rhodococcus* способны утилизировать широкий круг ксенобиотиков природного и антропогенного происхождения при высокой осмолярности, низкой влажности, повышенных и пониженных значениях pH среды и температуры (Larkin et al., 2005; Pátek et al., 2021). Практически неограниченные адаптивные свойства данных микроорганизмов, безусловно, связаны с особенностями их генетической организации, в частности, с присутствием в хромосоме и внехромосомных генетических элементах большого числа генов биodeградации, с уникальной организацией клеточной поверхности, а также генетическими системами, поддерживающими функциональную активность ферментов в стрессовых условиях внешней среды. Использование углеводородных субстратов в качестве источников углерода требует активации и взаимодействия генети-

ческих систем, определяющих модификацию клеточной стенки, деграцию и нейтрализацию активных форм кислорода, образующихся в результате процессов их окисления, и сохранение шаперонами функционально активной конформации ферментов. При этом роль белков-шаперонов в поддержании клеточного гомеостаза возрастает при действии дополнительных стрессовых факторов (температура, pH, осмолярность и др.) (Bukliarevich et al., 2019).

Родоккокки имеют уникальные поверхностные структуры. Кроме внутренней цитоплазматической мембраны и клеточной стенки, они содержат поверхностно-активные соединения, представленные производными миколовых кислот (например, трегалозомиколаты, связанные с клеточной стенкой посредством арабиногалактана) и другими веществами разной химической при-

роды (липиды, липопротеины, гликопротеины, полисахариды и др.) (Sutcliffe et al., 2010). Данные соединения, изменяя клеточную поверхность, способствуют адгезии клеток к загрязняющим веществам, повышают их растворимость и доступность для деградации, тем самым обеспечивая устойчивость бактерий к гидрофобным субстратам (Iwabuchi et al., 2000; Kaczorek et al., 2018). Как правило, индукторами синтеза поверхностно-активных соединений у бактерий рода *Rhodococcus* являются алканы (например, *n*-гексадекан), в ходе окисления которых образуется ацетил-КоА, необходимый для синтеза биоПАВ (Kuyukina, Ivshina, 2010). Следует отметить, что алканы природного и антропогенного происхождения широко распространены в окружающей среде (продуцируются микроорганизмами, содержатся в местах, загрязненных углеводородами). У всех без исключения представителей рода *Rhodococcus* в хромосомах и внехромосомных генетических элементах присутствуют большое число генов, кодирующих синтез гидролаз (монооксигеназы, цитохромы P450), определяющих утилизацию алканов (Nie et al., 2014). Представляется, что роль данных систем не ограничивается только использованием алканов в качестве источников углерода. Например, алкан-1-монооксигеназы, обеспечивающие окисление *n*-гексадекана, влияют на синтез поверхностно-активных соединений (Bukliarevich et al., 2023).

В силу практической значимости бактерий рода *Rhodococcus*, наиболее активно изучаются системы деградации и поверхностно-активные соединения (ПАВ) данных микроорганизмов. В то же время роль белков-шаперонов в этих процессах практически не изучена. Ранее было установлено, что для утилизации ряда ароматических, полициклических и алифатических углеводородов бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap при температуре 42°C необходимы функционально активные гены, кодирующие структурные (GroESL) и регуляторные (HrcA) белки теплового шока. Показано, что у мутантов с нарушенными генами *groESL* и *hrcA* эффективность деградации *n*-гексадекана снижалась, соответственно, в 1.7 и 2.7 раза при температуре 42°C (Bukliarevich et al., 2019). Полученные результаты обосновали изучение роли структурных и регуляторных генов, кодирующих белки теплового шока, в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap.

Целью настоящей работы являлся анализ экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока, при разных температурах культивирования и определение эффективности синтеза биоПАВ (количество трегалолипидов, эмульгирующая активность) бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap с нарушенными генами *groESL*, *dnaJ* и *hrcA*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы, плазмиды и условия культивирования бактерий. В работе использовали штамм *R. pyridinivorans* 5Ap (депонирован в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси под номером БИМ В-939 Г) и плазмиду pK18mob (Schäfer et al., 1994). Бактерии культивировали в полноценной пептонно-дрожжевой среде (пептон ферментативный — 10 г, дрожжевой экстракт — 5 г, NaCl — 8 г) и минеральной модифицированной среде Мюнца (Pirog et al., 2010), содержащей 2% гексадекана в качестве источников углерода. Агаризованные среды содержали 1.5% агара.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК выделяли саркозильным методом (te Riele et al., 1986). Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (“Jena Bioscience”, Германия).

Амплификация и клонирование генов. Для амплификации фрагмента гена *dnaJ* использовали Phusion® High-Fidelity ДНК полимеразу (“NEB”, США) и праймеры производства ОДО “Прайм-тех” (Беларусь). Для амплификации фрагмента гена *dnaJ* размером 770 п.н. использовали праймеры F-*dnaJ* (5'-gga tgt gaa ccc cga cga gtc-3') и R-*dnaJ* (5'-tgg tctc gat cgt cac ctt gg-3'). Продукты амплификации очищали с помощью набора Agarose Gel Extraction Kit (“Jena Bioscience”, Германия) и лигировали с суицидальным вектором pK18mob, предварительно обработанным рестриктазой *SmaI* (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Введение плазмид в клетки бактерий. Трансформацию бактерий *E. coli* осуществляли согласно методу, приведенному в работе Sambrook et al. (1989).

Плазмиду pK18mob с клонированными фрагментами генов *hrcA*, *groESL* (Bukliarevich et al., 2019) и гена *dnaJ* в клетки *R. pyridinivorans* 5Ap вводили методом электропорации. Для электропорации использовали прибор Gene Pulser Xcell Microbial System (“Bio-Rad”, США), кюветы с просветом 1 мм и напряжение 1.8 кВ. Трансформанты отбирали на полноценной пептонно-дрожжевой среде с канамицином в концентрации 50 мкг/мл.

Анализ инсерционных мутантов. Интеграцию гибридных плазмид в хромосому бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции. В результате с использованием праймера M13F (5'-act ggc cgt cgt ttt aca-3'), отжигающегося на последовательности вектора pK18mob и праймера R-rt-*dnaJ* (5'-gca cca cga cct cga gat gc-3'), отжигающегося вне области встраивания гибридного вектора в ген *dnaJ*, были получены фрагменты искомого размера 966 п.н. С использованием праймера M13F и праймера *hrcRT-R* (5'-atg cga tgg ttc ccg gat agt c-3'), отжигающегося

вне области встраивания гибридного вектора в ген *hrcA*, были получены фрагменты искомого размера 999 п.н. С использованием праймера M13F и праймера groELSR (5'-ccg gaa ttc tca gtg cgc gtg acc gtg-3'), отжигающегося вне области встраивания гибридного вектора в гены *groESL*, были получены фрагменты искомого размера 2076 п.н.

Анализ синтеза биоПАВ. Для определения содержания гликолипидов бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap культивировали в минеральной минимальной среде с добавлением 2% гексадекана в течение 96 ч с аэрацией (140 об./мин). Экстракцию сурфактанта осуществляли с использованием метилтретбутилового эфира (Кузюкина et al., 2001) с последующим разведением полученного препарата в 10 раз. С использованием фенол-сернокислого метода (DuBois et al., 1956) определяли содержание трегалозы, являющейся частью гликолипида, на спектрофотометре Metertech SP-8001 (Тайвань).

Индекс эмульгирования определяли по методике, описанной в работе (Cooper, Goldenberg, 1987), и рассчитывали как отношение объема эмульсии, образуемой при перемешивании культуральной жидкости с гексадеканом, к общему объему раствора.

ПЦР в реальном времени. Для определения экспрессии генов использовали культуру бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в поздней логарифмической фазе роста при культивировании в минеральной модифицированной среде Мюнца, содержащей в качестве единственного источника углерода 2% гексадекана. Для получения препаратов тотальной РНК использовали набор Aurum™ Total RNA Mini Kit ("Bio-Rad", США), концентрацию РНК определяли спектрофотометрически; качество препаратов оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. Для удаления примесей геномной ДНК выделенную РНК (1 мкг) обрабатывали ДНКазой ("Thermo Fisher Scientific", США). Для синтеза кДНК использовали набор RevertAid RT Reverse Transcription Kit ("Thermo Fisher Scientific", США). Реакцию амплификации проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I ("Синтол", Россия) при режиме: 95°C – 3 мин; 95°C – 20 с, 60°C – 20 с, 72°C – 5 с (40 циклов). Контаминация геномной ДНК во всех исследуемых образцах не превышала 3%. В качестве референсного использовали ген 16S рРНК (SD – 0.82; CV – 8.5%). Относительное количество мРНК определяли по формуле Пфаффа (Pfaffl, 2001). Для статистического анализа данных использовали непарный критерий Стьюдента для сравнения данных с помощью программы RStudio версии 4.0.0. Результаты получены в пяти независимых повторях.

Для амплификации фрагмента гена *groEL* в режиме реального времени использовали праймеры gro2R-F (5'-cct gct cgt cag ctc caa ga-3') и gro2R-R (5'-gtg ccg cgg atc ttg ttg ag-3'), для генов *groESL* – gro1R-F (5'-ggc ttc ctg tgc ccc tac tt-3') и gro1R-R (5'-gcc gga ctc tgc gat ctt ct-3'), для гена *hrcA* – hrcRT-F (5'-cat cgg tga gga gac cca gtt c-3') и hrcRT-R (5'-atg cga tgg ttc ccg gat agt c-3'), для амплификации гена *fmdB* – fmdB-F (5'-cac ctac tca tat gcc tgc ac-3') и fmdB-R (5'-gat gcc gac cga gtt gaa gag-3'), для референсного гена 16S – 5Ap_835f (5'-gcc gta gcc aac gca tta ag-3') и 5Ap_1163r (5'-cac ctt cct ccg agt tga cc-3'). Для каждой пары праймеров эффективность амплификации определяли по значению угла наклона калибровочной кривой. Специфичность реакции подтверждали анализом кривой плавления и электрофорезом в агарозном геле.

Поиск сайтов связывания регуляторных белков. Для поиска сайтов связывания CIRCE белка HrcA использовали данные сайта <https://regprecise.lbl.gov/index.jsp>. Для анализа нуклеотидных последовательностей бактерий рода *Rhodococcus* использовали нуклеотидные последовательности геномов из базы данных GenBank: *R. equi* 103S (FN563149), *R. aetherivorans* Ic-dP1 (CP011341), *R. ruber* R1 (CP038030.2), *R. hoagii* ATCC 33701 (AP025268.1), *R. coprophilus* NCTC10994 (LS483468.1), *R. pyridinivorans* 5Ap (CP063450.1), *R. rhodochrous* EP4 (CP032221.1), *R. opacus* B4 (AP011115.1), *R. opacus* R7 (CP008947.1), *R. jostii* RHA1 (CP000431.1), *R. koreensis* R85 (CP070609.1), *R. quinshengii* 7B (CP003761.1), *R. erythropolis* CCM2595 (CP003761.1), *R. fascians* D188 (CP015235.1), *R. triatomae* DSM 44892 (CP048814.1). Нуклеотидные последовательности сайтов связывания белка HrcA выравнивали с помощью программы SnapGene (www.snapgene.com).

Для поиска сайтов связывания сигма-фактора σ^{70} использовали программы BPROM (Solovyev, Salamov, 2011) и Sapphire (Coppens, Lavigne, 2020). Для поиска сайтов связывания сигма-фактора σ^H использовали программу Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012). В качестве типового сайта связывания использовали последовательность GGAAC-(N₁₇₋₁₈)-GTT (Blumenstein et al., 2022).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система белков теплового шока является генерализованной, и их экспрессия может подвергаться негативной регуляции на стадии транскрипции специфическими белками-репрессорами (Roncarati, Scarlato, 2017). Одним из ключевых негативных регуляторов является белок HrcA. Данный репрессор в форме димеров связывается в области промоторов с определен-

ной нуклеотидной последовательностью CIRCE, представленной инвертированными повторами (TTGGCACTC-9N-GAGTGGCCCCAG), препятствуя инициации транскрипции. При этом функционально активная форма белка HrcA образуется в клетке в отсутствие стресса и обеспечивается белками GroE (Schumann, 2016). При воздействии стрессовых факторов в клетке накапливаются денатурированные белки, с которыми связываются шапероны GroE, возвращая их к нативной конформации. В этих условиях белок HrcA превращается в мономерную форму и теряет свойство репрессора, в результате чего усиливается транскрипция генов, кодирующих синтез белков теплового шока (Roncarati et al., 2014).

Сайты связывания белка HrcA у всех без исключения изученных в этом отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий обнаруживались перед опероном *groESL* (*groES-groEL*) (данные сайта <https://regprecise.lbl.gov/index.jsp>). Данный факт может свидетельствовать о сложившейся в процессе эволюции системе, регулирующей взаимоотношения между белком репрессором HrcA и белками теплового шока GroESL. Единственное исключение составляли некоторые представители гаммапротеобактерий, у которых участки связывания белка HrcA находились только перед геном *rpoH*, детерминирующим альтернативный сигма-фактор σ^H , обеспечивающий транскрипцию генетических детерминант, продукты которых необходимы для выживания в стрессовых условиях среды. Это психрофильные морские бактерии *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 и бактерии *Pseudoalteromonas tunicata* D2, колонизирующие морские водоросли и беспозвоночные. Наибольшим разнообразием локализации сайтов CIRCE характеризовались грамположительные бактерии. Они выявлялись не только перед опероном *groESL*, но и перед отдельно локализованными генами *groEL*, по-разному организованными оперонами, кодирующими шаперон DnaK, белки HrcA и DnaJ, перед детерминантами, определяющими синтез белков теплового шока Hsp90, ClpB, Hsp20 и транспозаз (данные сайта <https://regprecise.lbl.gov/index.jsp>). При этом расположение сайтов связывания HrcA могло варьировать у представителей одной таксономической группы. Например, для отдельных видов микобактерий они присутствовали перед геном *hrcA* и *groEL2*. У патогенных бактерий *Mycobacterium tuberculosis* сайты CIRCE локализовались перед опероном *groELS* и генами *groEL2* и *fmdB*.

Следует отметить, что роль HrcA в бактериальной клетке не ограничивается только функцией репрессора. Например, для бактерий *Listeria monocytogenes* и *M. tuberculosis* установлено, что данный белок позитивно регулировал экспрессию генов, продукты которых необходимы для трансляции и репликации, а также вовлеченные в

реакции на стресс и метаболизм (Hu et al., 2007). Помимо этого, активация транскрипции могла осуществляться белком HrcA совместно с сигма-факторами σ^H или σ^B , которые являются ключевыми регуляторами транскрипции большого количества генетических детерминант, продукты которых необходимы для выживания бактерий в стрессовых условиях, включая тепловой, кислотный и окислительный стрессы, а также во время углеродного и азотного голодания (Ferreira et al., 2001). Таким образом, белок HrcA является частью регуляторной системы, определяющей экспрессию генов, продукты которых необходимы для выживания бактерий в изменяющихся условиях внешней и внутренней среды.

Анализ локализации сайтов CIRCE у бактерий рода *Rhodococcus* показал, что они достаточно консервативны и, аналогично бактериям *M. tuberculosis*, локализованы перед опероном *groESL* (один сайт), генами *groEL* (два сайта) и *fmdB* (один сайт) (рис. 1, 2).

Исключение составили отдельные представители вида *R. jostii* (штамм RHA1) и *R. erythropolis* (штаммы PR4, R138), в хромосоме которых дополнительно присутствовали сайты CIRCE перед генами, кодирующими белки теплового шока семейства Hsp20 (данные сайта https://regprecise.lbl.gov/sites.jsp?regulog_id=6007).

Анализ транскрипционной активности генов в поздней логарифмической фазе роста бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в среде с гексадеканом показал, что экспрессия генов *groESL*, *groEL* возрастала при повышенной температуре культивирования (42°C) в 4.4 и в 5.3 раза соответственно (рис. 3). Данный результат является закономерным, поскольку известно, что при увеличении температуры белок HrcA, превращаясь в мономерную форму, утрачивает свойство репрессора, подавляющего транскрипцию этих детерминант (Roncarati et al., 2014). В то же время вне зависимости от температуры культивирования (28 и 42°C) количество матричной РНК, кодируемой геном *hrcA*, не изменялось. Такая же картина наблюдалась для гена *fmdB*, содержащего в промоторной области сайты связывания с HrcA (последовательность CIRCE) (рис. 3). При этом в регуляторной области гена *hrcA* обнаруживался промотор, узнаваемый базовым сигма-фактором (σ^{70}), что свидетельствовало о его конститутивной экспрессии при разных температурных режимах (рис. 1). В то же время в регуляторной области гена *fmdB* выявлялось два промоторных участка, один из которых узнавался базовым сигма-фактором (σ^{70}) и перекрывался с последовательностью CIRCE, а второй промотор мог активировать транскрипцию данной детерминанты в присутствии альтернативного сигма-фактора (σ^H) (рис. 1). Следует отметить, что транскрипционный фактор σ^H по-

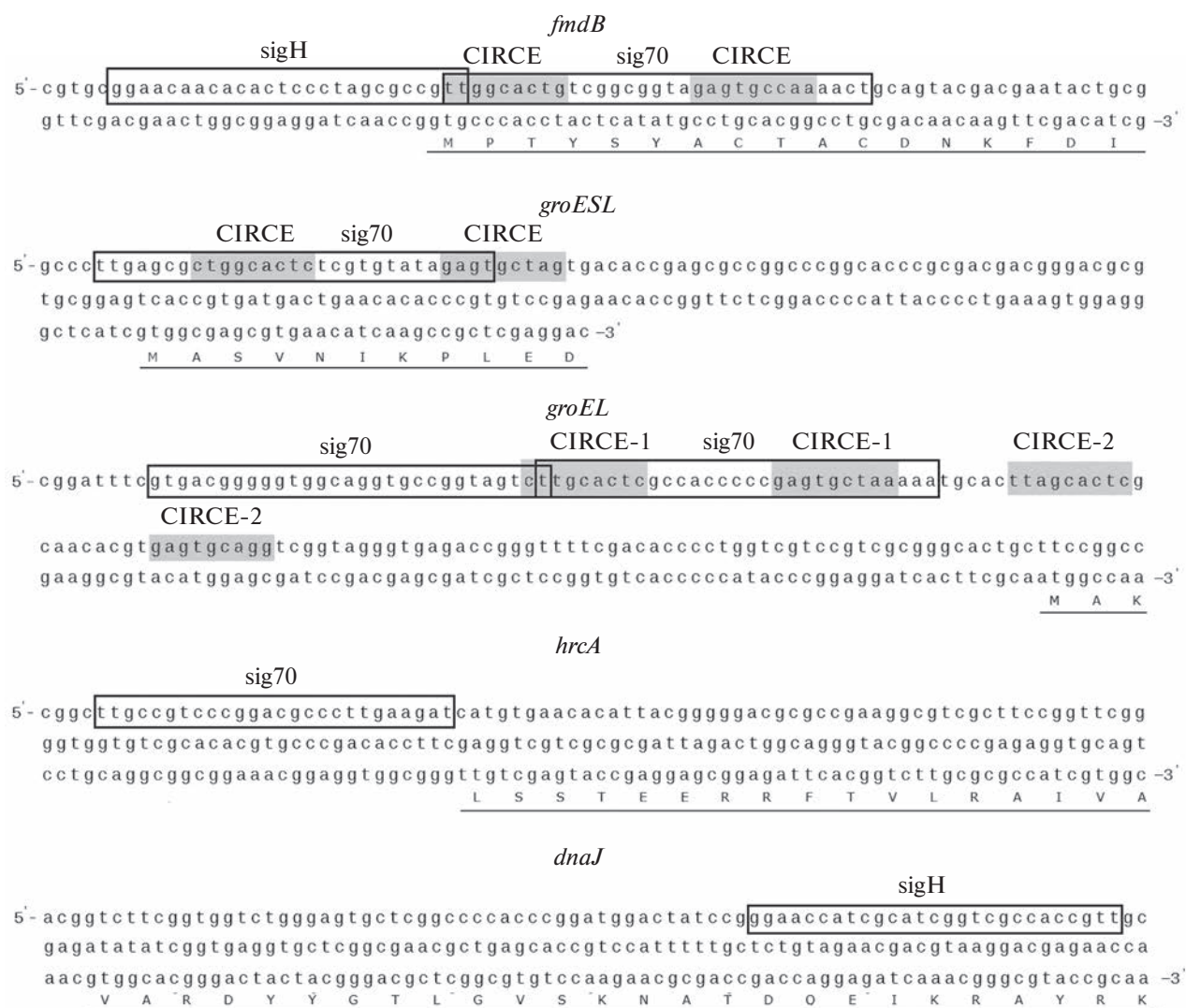


Рис. 1. Организация регуляторных последовательностей генов *hrcA*, *groELS*, *groEL*, *fmdB* и *dnaJ* в хромосоме бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap. Сайты связывания с базовым (σ^{70}) и альтернативными сигма (σ^H) факторами выделены прямоугольниками, сайты CIRCE выделены серым цветом. Старт-кодены и начало открытых рамок считывания подчеркнуты.

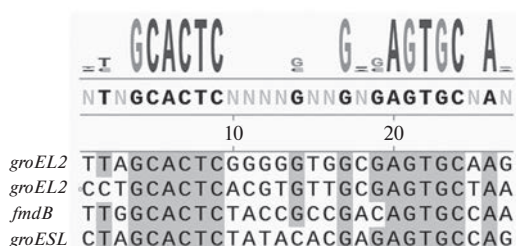
является в клетке в присутствии активных форм кислорода, образующихся, в том числе, при утилизации алифатических углеводов в качестве единственного источника углерода на этапе β -окисления жирных кислот (Kato et al., 2009; Jung et al., 2011). Подобная организация регуляторной последовательности гена *fmdB* характерна и для бактерий *M. tuberculosis*. Установлено, что ген *fmdB* (обозначенный как *ruc*), присутствуя в геноме прокариот, в том числе в составе оперонов *dnaK*, определяет синтез белков, содержащих консервативные функциональные домены, представленные цистеиновыми аминокислотами (CxxC-N₁₇-CxxC), связанными с ионами цинка и крайне чувствительными к окислительному стрессу (Ortiz de Orué Lucana et al., 2012). В при-

сутствии активных форм кислорода данные белки активируются и совместно шаперонами DnaK и DnaJ способны предотвращать необратимую денатурацию более 70 ферментов, в частности, необходимых для процессов окисления и синтеза жирных кислот (Becker et al., 2020).

При нарушении гена *hrcA* увеличение экспрессии в 14.4 и 9.6 раза регистрировали, соответственно, для генов *groELS* и *groEL2* при 28°C, в то время как их транскрипция при повышенной температуре увеличивалась только в 3.5 и 2.7 раза. Для гена *fmdB* увеличение экспрессии регистрировали при 28 и 42°C (соответственно, в 1.82 и 2.52 раза) (рис. 4).

Этот результат весьма закономерен для генов *groELS* и *groEL2*, поскольку белок HrcA репресси-

Обобщенная нуклеотидная последовательность CIRCE

CIRCE перед геном *fmdB*CIRCE перед опероном *groESL*

	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
	10 20
<i>R. hoagii</i> ATCC 33701	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. equi</i> 103S	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. aetherivorans</i> IcdP1	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. ruber</i> R1	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. coprophilus</i> NCTC10994	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. rhodochrous</i> EP4	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. opacus</i> R7	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. jostii</i> RHA1	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. koreensis</i> R85	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. quinshengii</i> 7B	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. erythropolis</i> CCM2595	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. fascians</i> D188	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. triatomae</i> DSM 44892	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA

	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
	TTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
	10 20
<i>R. hoagii</i> ATCC 33701	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. equi</i> 103S	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. aetherivorans</i> IcdP1	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. ruber</i> R1	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. coprophilus</i> NCTC10994	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. rhodochrous</i> EP4	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. opacus</i> R7	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. jostii</i> RHA1	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. koreensis</i> R85	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. quinshengii</i> 7B	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. erythropolis</i> CCM2595	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. fascians</i> D188	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA
<i>R. triatomae</i> DSM 44892	CTGGCACTGTCGCTGTAGAGTGCTAA

CIRCE-1 перед геном *groEL2*CIRCE-2 перед геном *groEL2*

	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
	10 20
<i>R. hoagii</i> ATCC 33701	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. equi</i> 103S	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. aetherivorans</i> IcdP1	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. ruber</i> R1	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. coprophilus</i> NCTC10994	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. rhodochrous</i> EP4	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. opacus</i> R7	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. jostii</i> RHA1	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. koreensis</i> R85	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. quinshengii</i> 7B	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. erythropolis</i> CCM2595	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. fascians</i> D188	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA
<i>R. triatomae</i> DSM 44892	CTGGCACTCAGCTGTGAGTGCTAA

	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
	10 20
<i>R. hoagii</i> ATCC 33701	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. equi</i> 103S	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. aetherivorans</i> IcdP1	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. ruber</i> R1	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. coprophilus</i> NCTC10994	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. rhodochrous</i> EP4	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. opacus</i> R7	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. jostii</i> RHA1	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. koreensis</i> R85	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. quinshengii</i> 7B	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. erythropolis</i> CCM2595	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. fascians</i> D188	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG
<i>R. triatomae</i> DSM 44892	TTAGCACTCGGNNGTGGCGAGTGCAAG

Рис. 2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей CIRCE перед геном *fmdB*, опероном *groESL* и отдельно локализованным геном *groEL2* у бактерий рода *Rhodococcus*.

рует транскрипцию данных детерминант только в отсутствии температурного стресса. При увеличении температуры культивирования до 42°C увеличение экспрессии данных генов можно объяснить тем, что примененный температурный режим не является абсолютно стрессовым для бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap, и белок HrcA, хотя и в меньшей степени, но обладает функцией репрессора. Увеличение экспрессии *fmdB* при разных температурных режимах свидетельствует о регуляции транскрипции данного гена белком HrcA путем

связывания с сайтом CIRCE. В то же время его транскрипция, как указывалось выше, дополнительно активируется РНК-полимеразой, связанной с фактором σ^H .

Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать в пользу того, что гены *groESL*, *groEL2* и *fmdB*, содержащие в регуляторных участках сайты связывания CIRCE, подвергаются негативной регуляции белком HrcA, поскольку его инактивация приводит к увеличению транскрипции данных детерминант при разных температурах

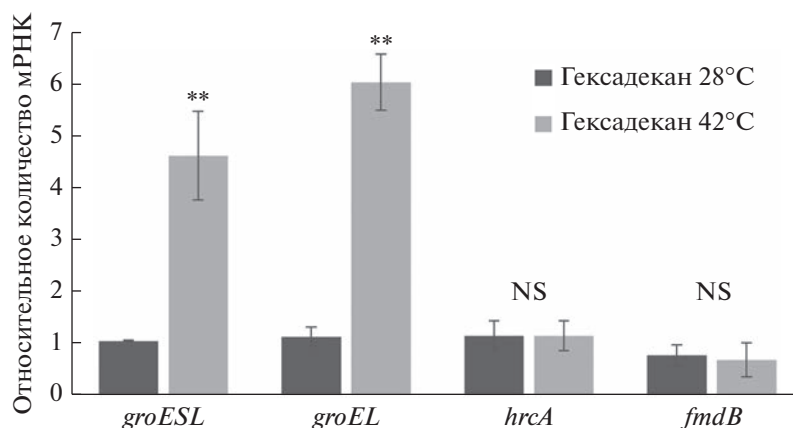


Рис. 3. Относительное количество мРНК, кодируемое генами *groESL*, *groEL2*, *hrcA* и *fmdB* при разных температурах культивирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar в минимальной среде, содержащей в качестве источника углерода 2% гексадекана. Обозначения: NS – $P > 0.05$; ** – $P \leq 0.01$.

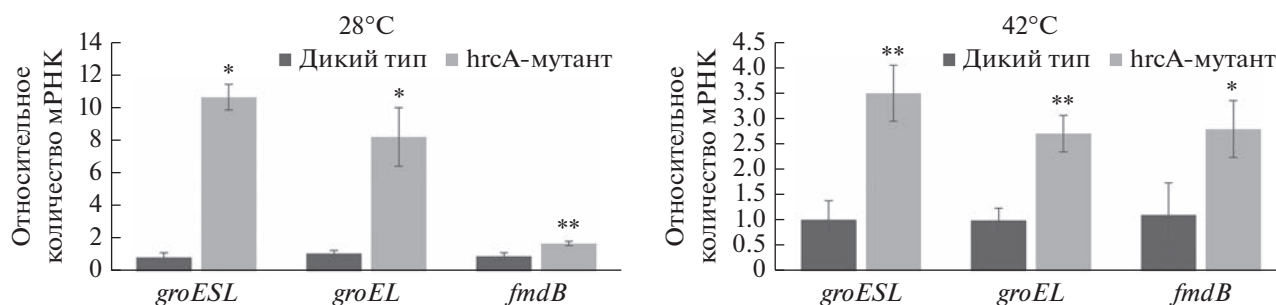


Рис. 4. Относительное количество мРНК, кодируемое генами *groESL*, *groEL2* и *fmdB* при разных температурах культивирования бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar дикого типа и с нарушенным геном *hrcA* в минимальной среде, содержащей в качестве источника углерода 2% гексадекана. Обозначения: * – $P \leq 0.1$; ** – $P \leq 0.01$.

культивирования. Бактерии дикого типа, используя гексадекан в качестве единственного источника углерода, вне зависимости от температуры выращивания испытывают окислительный стресс, что приводит к появлению в клетке альтернативного сигма-фактора (σ^H), обеспечивающего транскрипцию гена *fmdB*. В то же время повышение температуры до 42°C приводит к активации системы белков теплового шока, в результате чего увеличивается транскрипция генов *groESL* и *groEL2*. Одинаковая экспрессия гена *hrcA* при разных условиях культивирования свидетельствует в пользу того, что он синтезируется конститутивно, и его роль не ограничивается функцией репрессора генов *groESL*, *groEL2* и *fmdB*, содержащих в промоторных участках сайты его связывания CIRCE, а играет более значимую роль в клетках исследуемых бактерий.

Исходя из предположения, что бактерии *R. pyridinivorans* 5Ar при культивировании в среде с гексадеканом испытывают окислительный стресс и дополнительный тепловой стресс при увеличении температуры, была изучена роль му-

таций в генах *groESL*, *hrcA* и *dnaJ* в синтезе биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ar при разных температурных режимах. Обоснованием этому служили следующие соображения. Во-первых, гексадекан в концентрации 2% является обязательным индуктором синтеза биоПАВ данными бактериями. Во-вторых, ключевую роль в синтезе биоПАВ играют гены, кодирующие синтез алкан-1-монооксигеназ (Bukliarevich et al., 2023). В-третьих, установлено, что при температуре 42°C у мутантов с нарушенными генами *groESL*, *hrcA* снижалась эффективность деградации гексадекана (в 1.7 и 2.7 раза соответственно) (Bukliarevich et al., 2019). И, наконец, предполагали, что в случае окислительного стресса, вызванного гексадеканом, должны активироваться белки шапероны, обеспечивающие функциональную активность ферментов, в том числе, участвующих в синтезе биоПАВ. В этом плане определенный интерес представлял ген, кодирующий белок DnaJ, который совместно с шапероном DnaK способен восстанавливать конформацию нарушенных под действием стресса белков. Данная детерминанта

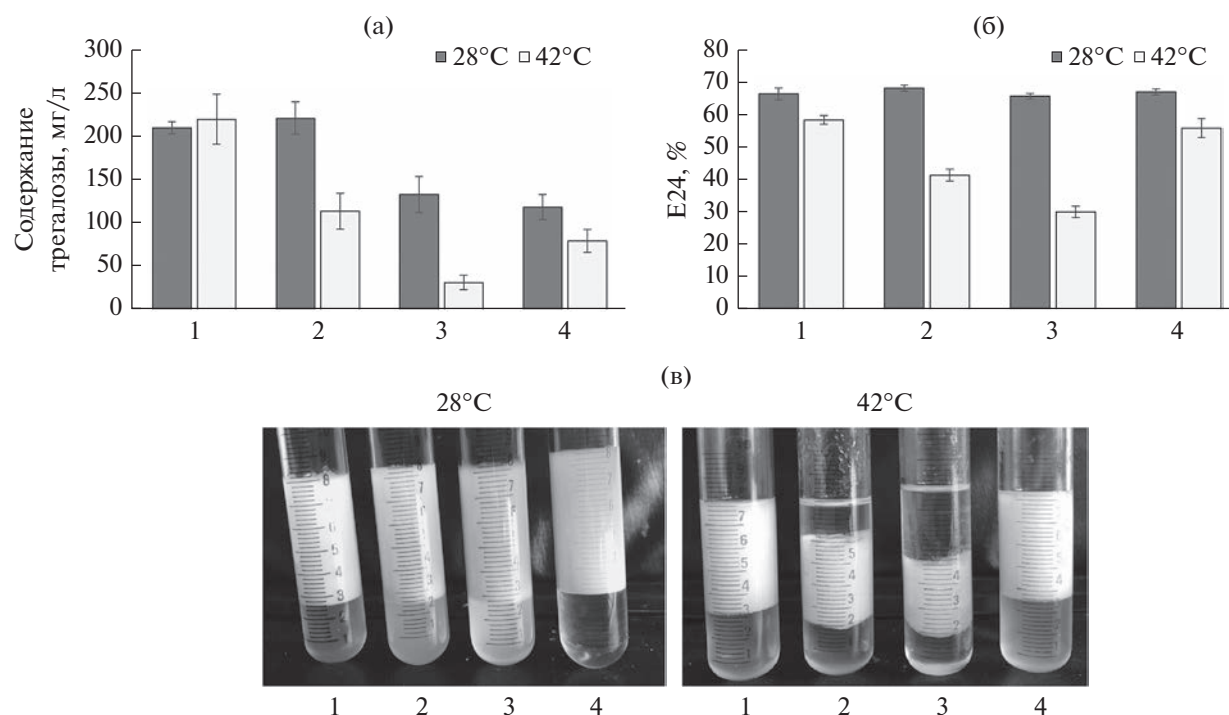


Рис. 5. Эффективность синтеза биоПАВ при разных температурах через 96 ч культивирования в минимальной среде с гексадеканом бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap: 1 – исходный штамм; 2 – мутант с инактивированными генами *groESL*; 3 – мутант с инактивированным геном *hrcA*; 4 – мутант с инактивированным геном *dnaJ*; (а) – содержание трегалозы в сыром сурфактанте; (б) – индекс эмульгирования; (в) – эмульгирующая активность.

локализовалась за геном *hrcA*, в 3'-концевой последовательности которого располагается регуляторный участок, способный обеспечивать ее считывание РНК-полимеразой, связанной с альтернативным фактором σ^H (рис. 1).

На основании ранее полученных результатов предполагали, что продуцируемые бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap биоПАВ имеют сложную химическую природу, и их эмульгирующая активность обеспечивается содержащими трегалозу сурфактантами и соединениями другого химического состава (Bukliarevich et al., 2023). В связи с этим у мутантов с нарушенными генами *hrcA*, *dnaJ* и *groESL* определяли количество синтезируемых трегалолипидов и индекс эмульгирования. В результате было установлено, что при температуре 28°C в среде с гексадеканом все мутантные бактерии сохраняли эмульгирующую активность, тогда как синтез трегалолипидов снижался у вариантов с нарушенными генами *hrcA* и *dnaJ* в 1.5 и 1.8 раза соответственно (рис. 5). При повышенном температурном режиме (42°C) снижение синтеза трегалолипидов регистрировали для всех исследованных мутантных вариантов. Для мутантов с нарушенными генами *groESL* и *dnaJ*, соответственно, в 1.7 и в 2.5 раза, а у мутанта с нарушенным геном *hrcA* – в 6.6 раза. В то же время эмульгирующая активность не снижалась у му-

танта с нарушенным геном *dnaJ* и достоверно уменьшалась у вариантов с нарушенными генами *groESL* и *hrcA* в 1.4 и 1.9 раза соответственно (рис. 5). Снижение синтеза трегалолипидов в отсутствие влияния на эмульгирующую активность при разных температурных режимах у мутанта с нарушенным геном *dnaJ* может свидетельствовать в пользу того, что данные соединения не являются ключевыми в составе биоПАВ. Действительно, при оптимизации условий культивирования наблюдали увеличение индекса эмульгирования, тогда как количество трегалолипидов практически не менялось (не более 200–300 мг/л, что более чем в 100 раз меньше известных продуцентов) (Bukliarevich et al., 2023). В то же время структурные Gро и регуляторный HrcA белки играют важную роль в синтезе трегалолипидов и эмульгаторов вне зависимости от температурных условий. Отсутствие влияния мутации *groESL* на синтез биоПАВ при 28°C объясняется тем, что при этой температуре шапероны GroESL в норме (без мутации) синтезируются в небольшом количестве, и их функция заключается в придании белку HrcA свойства репрессора. В отсутствие функциональной активности гена *hrcA* при температуре 28°C возрастала экспрессия генов *groESL* и *groEL2* (рис. 4), что могло влиять на увеличение образования эмульгаторов. Следует отметить, что подобное увеличение эмульгирующей активности наблюдали для бактерий *R. eryth-*

ropolis PR4 в присутствии дополнительных копий гена *groEL2* (Takihara et al., 2014). Снижение синтеза трегалолипидов и эмульгаторов при 42°C у мутантов с нарушенными генами *groESL* и *hrcA* свидетельствует об их значимости в синтезе биоПАВ. При этом отсутствие функционально активного белка GroESL частично может компенсироваться присутствием ненарушенного шаперона GroEL2. В то же время отсутствие регуляторного белка HrcA, утратившего функцию репрессора при 42°C, в большей степени снижало продукцию биоПАВ.

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о влиянии продуктов генов *hrcA*, *dnaJ* и *groESL* на синтез биоПАВ бактериями *R. pyridinivorans* 5Ap. Продукты генов *dnaJ* и *hrcA* необходимы для синтеза трегалолипидов при разных температурных режимах, причем их роль возрастала при повышенной температуре (у мутанта с нарушенным геном *dnaJ* синтез трегалолипидов при температуре 28 и 42°C снижался в 1.8 и в 2.5 раза соответственно, а у мутанта с нарушенным геном *hrcA* — в 1.5 и в 6.6 раза соответственно). В то же время эмульгирующая активность не изменялась у всех мутантных вариантов при 28°C и уменьшалась при температуре 42°C в 1.4 и 1.9 раза соответственно у мутантов с нарушенным геном *groESL* и *hrcA*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований (НИР № 3.6.2), грантов Министерства Образования Республики Беларуси (НИР № 752/57 и НИР № 757/57).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Букляревич А.А., Чернявская М.И., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н., Титок М.А. Влияние структурных и регуляторных белков теплового шока на деградацию углеводов бактериями *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 553–561.

Bukliarevich H.A., Charniauskaya M.I., Akhremchuk A.E., Valentovich L.N., Titok M.A. Effect of the structural and regulatory heat shock proteins on hydrocarbon degradation by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 573–579.

Букляревич А.А., Гуринович А.С., Филонов А.Е., Титок М.А. Молекулярно-генетический и функциональный анализ генов бактерий рода *Rhodococcus*, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ // Микробиология. 2023. Т. 92. С. 1–15.

Bukliarevich H.A., Gurinovich A.S., Filonov A.E., Titok M.A. Molecular-genetic and functional analysis of genes of *Rhodococcus* bacteria encoding synthesis alkan-1-monoxygenase // Microbiology. 2023. V. 92. № 2. P. 1–15.

Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. С. 651–658.

Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko I.A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. P. 599–606.

Becker S.H., Ulrich K., Dhabaria A., Ueberheide B., Beavers W., Skaar E.P., Iyer L.M., Aravind L., Jakob U., Darwin K.H. Mycobacterium tuberculosis Rv0991c is a redox-regulated molecular chaperone // mBio. 2020. V. 11. e01545-20.

Blumenstein J., Rädisch R., Štěpánek V., Grulich M., Dostálová H., Pátek M. Identification of *Rhodococcus erythropolis* promoters controlled by alternative sigma factors using *in vivo* and *in vitro* systems and heterologous RNA polymerase // Curr. Microbiol. 2022. V. 79. Art. 55.

Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. P. 224–229.

Coppens L., Lavigne R. SAPPHERE: a neural network-based classifier for $\sigma 70$ promoter prediction in *Pseudomonas* // BMC Bioinform. 2020. V. 21. Art. 415.

DuBois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.

Ferreira A., O'Byrne C.P., Boor K.J. Role of σB in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes* // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4454–4457.

Hu Y., Oliver H.F., Raengpradub S., Palmer M.E., Orsi R.H., Wiedmann M., Boor K.J. Transcriptomic and phenotypic analyses suggest a network between the transcriptional regulators HrcA and σB in *Listeria monocytogenes* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 7981–7991.

Iwabuchi N., Sunairi M., Anzai H., Nakajima M., Harayama S. Relationships between colony morphotypes and oil tolerance in *Rhodococcus rhodochrous* // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 5073–5077.

Jung J., Noh J., Park W. Physiological and metabolic responses for hexadecane degradation in *Acinetobacter oleivorans* DR1 // J. Microbiol. 2011. V. 49. P. 208–215.

Kaczorek E., Pacholak A., Zdarta A., Smulek W. The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase // Colloids and Interfaces. 2018. V. 2. Art. 35.

Kato T., Miyana A., Kanaya S., Morikawa M. Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23 // BMC Microbiol. 2009. V. 9. Art. 60.

Kuyukina M.S., Ivshina I.B. *Rhodococcus* Biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications // Biol-

- ogy of *Rhodococcus*, Microbiology Monographs / Ed. Alvarez H.M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. P. 291–313.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction // J. Microbiol. Methods. 2001. V. 46. P. 149–156.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. P. 282–290.
- Nie Y., Chi C.-Q., Fang H., Liang J.-L., Lu S.-L., Lai G.-L., Tang Y.-Q., Wu X.-L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments // Sci. Rep. 2014. V. 4. Art. 4968.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. The UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
- Ortiz de Orué Lucana D., Wedderhoff I., Groves M.R. ROS-mediated signalling in bacteria: zinc-containing Cys-X-X-Cys redox centres and iron-based oxidative stress // J. Signal Transduct. 2012. V. 2012. Art. 605905.
- Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains // Biotechnol. Adv. 2021. V. 53. Art. 107698.
- Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. Art. e45.
- Riele H. te, Michel B., Ehrlich S.D. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545.
- Roncarati D., Danielli A., Scarlato V. The HrcA repressor is the thermosensor of the heat-shock regulatory circuit in the human pathogen *Helicobacter pylori* // Mol. Microbiol. 2014. V. 92. P. 910–920.
- Roncarati D., Scarlato V. Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output // FEMS Microbiol. Rev. 2017. V. 41. P. 549–574.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
- Schumann W. Regulation of bacterial heat shock stimulons // Cell Stress Chaperones. 2016. V. 21. P. 959–968.
- Solov'yev V., Salamov A. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences // Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies / Ed. Li R.W. Nova Science Publishers, 2011. P. 61–78.
- Sutcliffe I., Brown A., Dover L. The rhodococcal cell envelope: composition, organisation and biosynthesis // Biology of *Rhodococcus*. Microbiology Monographs / Ed. Alvarez H.M. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. P. 29–71.
- Takahara H., Ogiwara J., Yoshida T., Okuda S., Nakajima M., Iwabuchi N., Sunairi M. Enhanced translocation and growth of *Rhodococcus erythropolis* PR4 in the alkane phase of aqueous-alkane two phase cultures were mediated by GroEL2 overexpression // Microbes Environ. 2014. V. 29. P. 346–352.

Role of the Structural and Functional Genes Encoding Heat Shock Proteins in Biosurfactant Synthesis by *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap

H. A. Bukliarevich¹ and M. A. Titok^{1, *}

¹Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Received January 18, 2023; revised February 20, 2023; accepted March 1, 2023

Abstract—The role of *groESL* and *dnaJ* structural genes and *hrcA* regulatory gene, encoding the synthesis of heat shock proteins, in biosurfactant synthesis by *R. pyridinivorans* 5Ap was determined. The CIRCE binding sites for the regulatory protein coded by *hrcA* gene were revealed in the promoter regions of *groESL*, *groEL2*, and *fmdB* genes. *GroESL* and *groEL2* genes expression during the late exponential phase in the medium with hexadecane at 42°C was higher than at 28°C (4.4 and 5.3 times, respectively). At the same time, no changes in expression of *hrcA* and *fmdB* genes were observed at two different temperature modes (28 and 42°C). In the absence of the negative regulator HrcA, *groESL* expression increased 14.4 and 3.5 times, that of *groEL2*, 9.6 and 2.7 times, and that of *fmdB*, 1.82 and 2.52 times at 28 and 42°C, respectively. Products of *dnaJ* and *hrcA* genes were required for trehalolipid synthesis at different temperature modes, with their role increasing at higher temperature (synthesis of trehalolipids by the mutant with impaired *dnaJ* gene decreased 1.8 and 2.5 times compared to 1.5 and 6.6 times, for the mutant with impaired *hrcA* at 28 and 42°C, respectively). At the same time, emulsifying activity of all mutant variants did not change at 28°C and decreased 1.4 and 1.9 times 42°C for the mutants with impaired *groESL* and *hrcA* genes, respectively. Our results indicated the complex chemical nature of the biosurfactants produce by *R. pyridinivorans* 5Ap (emulsifiers, including trehalolipids and compounds of other chemical composition). The Gro chaperones and the HrcA regulatory protein play the key roles in synthesis of these compounds at different temperature modes, while the *dnaJ* is required only for trehalolipid synthesis.

Keywords: *Rhodococcus*, *groESL*, *dnaJ*, *hrcA*, hrcA repressor, biosurfactants