

УДК 579.2

**РОЛЬ БЕЛКА ACDR В ТРАНСКРИПЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ АЦК-ДЕЗАМИНАЗЫ У
METHYLOBACTERIUM RADIOTOLERANS JCM2831****Г.А. Екимова***Пушчинский научный центр биологических исследований РАН (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН),
Россия*

Аэробные метилотрофные бактерии – обширная группа метилотрофных прокариот, использующих окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии. В настоящее время известно, что многие аэробные метиловобактерии симбиотически связаны с растениями, колонизуя с высокой плотностью листовую поверхность, присутствуют в ризосфере и в семенах. Взаимосвязь растений с метилотрофами обусловлена, с одной стороны, тем, что растения выделяют в окружающую среду метанол, метан, формальдегид, формиат, метилированные амины, метилсернистые соединения и галометаны, которые активно потребляют метилотрофы. С другой стороны, метилотрофные бактерии стимулируют рост и развитие растений за счет биосинтеза фитогормонов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов), витаминов, повышают фотосинтетическую активность и устойчивость к фитопатогенам и тяжелым металлам, а также фиксируют молекулярный азот. Одним из способов воздействия бактерий на растения является повышение их устойчивости к неблагоприятным факторам, за счёт снижения уровня стрессового гормона этилена, посредством деградации его предшественника 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) Бактериальный фермент АЦК-деаминаза катализирует гидролиз АЦК до неактивных α -кетобутирата и ионов аммония. Ген АЦК-деаминазы (*acdS*) и активность фермента обнаружены у многих бактерий различного таксономического положения, ассоциированных с растениями, в том числе у *Methylobacterium radiotolerans*, розовоокрашенного факультативного метилотрофа. Нами обнаружено, что выше структурного гена *acdS* дивергентно располагается ген *acdR*, кодирующий предположительный транскрипционный регулятор из LRP – семейства.

В настоящее время изучены гены и охарактеризованы АЦК-деаминазы нескольких микроорганизмов, а транскрипционная регуляция гена *acdS* исследована только у *Pseudomonas putida* UW4, поэтому целью нашей работы стало изучение транскрипционной регуляции гена *acdS*, кодирующего АЦК-деаминазу у *M. radiotolerans* JCM 2831.

Для детального изучения функций регуляторного белка ген *acdR* *M. radiotolerans* клонировали в экспрессионном векторе pHUE. При помощи гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* и последующей металл-хелатной хроматографии получили электрофоретически гомогенный препарат рекомбинантного белка AcdR. Молекулярная масса субъединицы AcdR составила примерно 18 кДа, что соответствует теоретически рассчитанной.

³²P-меченый ПЦР-фрагмент, содержащий регуляторный участок гена *acdS*, и очищенный рекомбинантный белок AcdR использовали в экспериментах по образованию комплексов AcdR-ДНК в присутствии АЦК. Установлено, что добавление рекомбинантного белка AcdR приводит к уменьшению электрофоретической подвижности специфического ПЦР-фрагмента в присутствии гетерологичной ДНК и АЦК. Показано, что АЦК служит низкомолекулярным эффектором белка-регулятора. Выявлено, что при низких концентрациях АЦК связывание происходит с кооперативным эффектом, свидетельствующим о том, что AcdR является мультимерным белком. Комплекс ДНК-AcdR-АЦК характеризовался довольно высокой стабильностью, поскольку он не разрушался в течение 30 минут, а время полураспада составило 1 час.

Для подтверждения участия AcdR в регуляции *acdS* получены делеционные и комплементированные мутанты по этим генам, которые были протестированы на наличие АЦК-деаминазной активности. Активность фермента у делеционных мутантов по обоим генам не обнаружена, как и у штаммов, комплементированных исходной плазмидой. В случае комплементации плазмидами, несущими соответствующие гены, активность фермента восстановилась.

Таким образом, впервые показано, что белок AcdR является активатором транскрипции гена *acdS* у *M. radiotolerans* JCM2831 в присутствии эффектора АЦК.