

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ ФЕНОЛОКСИДАЗ АЗОСПИРИЛЛ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕСТРУКЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

М.А. Купряшина, Е.Г. Пономарева

ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Россия, г. Саратов

Ферменты способные к окислению широкого спектра ароматических соединений, таких как полифенолы, ароматические амины, дифенолы объединены в группу фенолоксидаз [1]. Наиболее важной с точки зрения биотехнологического применения является способность данных ферментов к деструкции лигнинов, синтетических красителей и других органополифенолов [2]. Как правило это гем- и медьсодержащие оксидазы и оксидоредуктазы, такие как Mn-пероксидаза, лакказы, диоксигеназа и ДуР-пероксидаза. На сегодняшний день пул фенолоксидаз обнаружен и у бактерий [3]. Ранее нами показана способность бактерии рода *Azospirillum* к продукции фенолоксилирующих ферментов и окислению таких соединений как 2,6-диметоксифенол, L-дигидроксифенилаланин, 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) (ABTS), модельных препаратов лигнина и синтетических красителей.

Цель работы – поиск с использованием методов биоинформатики генов-кандидатов ферментов фенолоксидазного комплекса бактерий рода *Azospirillum*, конструирование праймеров, комплементарных фрагментам обнаруженных генов и характеристика с использованием ПЦР-анализа обратных транскриптов в реальном времени их профилей экспрессии при культивировании азоспирилл в присутствии фенольных соединений. В качестве модельных соединений использовали 2,6-диметоксифенол и гваякол – это органические соединения, принадлежащее к классу фенолов, которые нашли широкое применение в различных отраслях промышленности, включая пищевую и фармацевтическую.

Поиск аминокислотных последовательностей ферментов фенолоксидазного комплекса бактерий рода *Azospirillum* осуществляли в базах данных Protein NCBI, UniProt, PeroxiBase. Сравнение аминокислотных последовательностей белков проводили с помощью инструмента Protein BLAST (Basic Local Alignment Tool, или BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Параметры поиска: база данных – non-redundant protein sequences, организм – *Azospirillum* (taxid : 191), алгоритм blastp (protein-protein BLAST). Поиск гомологии соответствующих последовательностей нуклеотидов проводили с использованием программ BLASTn. Изучаемая аминокислотная последовательность сравнивалась с транслированными последовательностями базы данных секвенированных нуклеиновых кислот с использованием алгоритма tblastn. Для конструирования праймеров использовали пакет программ Vector NTI версия 10 («Invitrogen», США) и нуклеотидные последовательности, опубликованные во всемирной базе данных (NCBI GenBank). Количественную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией с флуориметрической регистрацией результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили на базе научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского. Выделение РНК азоспирилл осуществляли колоночным методом с использованием коммерческого набора RuPlus («Биолабмикс, Россия»). Осадок бактерий получали из культуральной среды, содержащей 1 мМ модельных соединений. О начале процесса деструкции веществ судили по изменению окраски культуральной среды. Относительный уровень экспрессии генов определяли с помощью двухстадийной ОТ-ПЦР-РВ путем амплификации фрагментов гена-мишени и гена recA (recA-fw GTCGAAGTGCCTGGTGATCT, recA-rv GACGGAGGCGTAGAAGTTCA), выбранного в качестве референсного гена, на матрицах кДНК. Реакцию обратной транскрипции и постановку ПЦР-РВ проводили с использованием наборов реагентов «Биолабмикс, Россия». Амплификацию проводили с использованием прибора для ПЦР в режиме реального времени LightCycler 96 («Roche», Швейцария). Синтез праймеров осуществляли методом фосфорамидитной химии на автоматическом олигосинтезаторе Polygen 12 («Polygen», Германия). Анализ данных ПЦР и определение уровней генов фенолоксидаз проводили методом $\Delta\Delta C_t$ на сертифицированном программном обеспечении LightCycler® 96 Software, версия 1.1.0.1320. Опыты проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. Для статистической обработки полученных данных использовали статистический пакет анализа данных программы Microsoft Office Excel.

Нами был проведен анализ *in silico* по алгоритму, опирающемуся на сравнении аминокислотных последовательностей предполагаемых ферментов-гомологов фенолоксидаз. Нам удалось идентифицировать у бактерий рода *Azospirillum* несколько аннотированных последовательностей белков – гомологов пероксидаз, диоксигеназ, лакказоподобных оксидаз. На основе полученных данных был осуществлен подбор специфичных олигонуклеотидных праймеров, комплементарных фрагментам генов фенолоксидаз (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры к генам фенолоксидаз азоспирилл

Фермент	Праймеры (fw-прямой, rv-обратный)	Последовательность 5' – 3'
Дур-пероксидаза	DyP-fw	TCTGCCTCAACACGGACATC
	DyP-rv	CGTGGACGTGGAAACCTACA
Каталаза/пероксидаза HPI	CatPer-fw	ACGCTGACGAACGACTTCTT
	CatPer-rv	GCCTGGACGAAGGTGATGAA
Лакказа	Lcc-fw	GCAACACCGTCACCATCAAC
	Lcc-rv	TCTGTATCGACATGGAAGGC
Катехол-1,2-диоксигеназа	Dyox-fw	TTCATGAACAGGGGCTCACC
	Dyox-rv	CAGGAAGTGGTCGAAACCGA

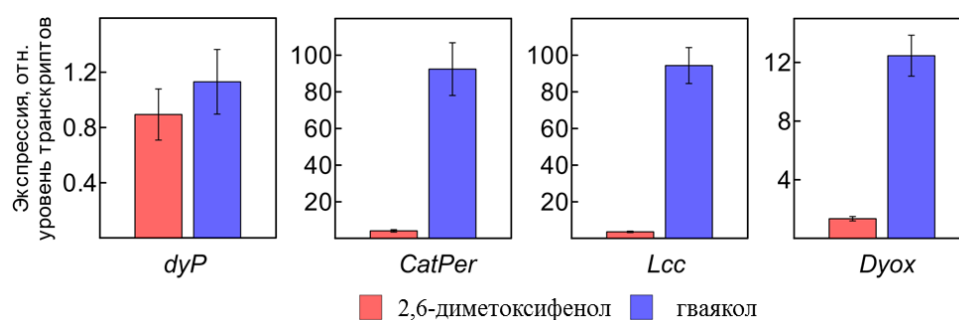


Рис. 1. Анализ транскрипционной активности генов фенолоксилирующих ферментов

Далее мы исследовали отклик ферментативной системы азоспирилл в процессе окисления 2,6 – диметоксифенола и гваякола. Был проанализирован уровень относительной экспрессии генов четырех фенолоксилирующих ферментов азоспирилл (рисунок 1). Анализ транскрипционной активности показал, что выбранные для исследования гены фенолоксидаз экспрессируются в различной степени в условиях культивирования бактерии в присутствии фенольных соединений. Наибольший отклик ферментативной системы азоспирилл наблюдался в отношении гваякола.

Мы предполагали, что катехол – 1,2-диоксигеназа (пирокатехаза) может играть ключевую роль в процессах деструкции фенольных соединений азоспириллой. Именно этот фермент описан у бактерий, проявляющих лигнинолитическую активность, как катализатор реакций деструкции ароматических соединений [4]. Однако наиболее выраженный эффект от присутствия модельных соединений фенола отмечался на уровне транскриптов генов CatPer и Lcc, кодирующих каталазу/пероксидазу HPI и лакказу, соответственно. Экспрессия CatPer и Lcc была намного выше по сравнению с другими исследуемыми генами фенолоксидаз, в том числе в разы превосходила экспрессию генов Dyox (катехол-1,2-диоксигеназа). По данным литературы для бактериальных DyP-пероксидаз показана лигнин-пероксидазная и Mn-пероксидазная активность, аналогичная ферментам грибов, участвующим в окислении синтетических красителей и других органоуполлютантов [5]. Наименьшее значение относительного уровня транскриптов при культивировании *A. brasilense* SR80 в присутствии гваякола и 2,6-диметоксифенола отмечался для гена DyP-пероксидазы.

Таким образом, проведен биоинформатический анализ последовательностей потенциальных целевых генов ферментов фенолоксидазного комплекса *A. brasilense*. Сконструированы праймеры, комплементарные фрагментам генов Дур-пероксидазы, каталазы/пероксидазы HPI, лакказы, катехол-1,2-диоксигеназы. В ходе проведенного исследования изучено изменение транскрипционной активности генов азоспирилл, кодирующих синтез фенолоксилирующих ферментов, при культивировании в присутствии модельных фенольных соединений. С использованием ПЦР-анализа обратных транскриптов в реальном времени получены данные о статистически значимом увеличении уровней экспрессии генов каталазы-пероксидазы HPI (CatPer), лакказы (Lcc), катехол-1,2-диоксигеназы (Dyox) *A. brasilense* SR80 в данных условиях. Наибольшие значения экспрессии генов-предшественников ферментов фенолоксидазного комплекса азоспирилл, нормированных относительно гена рекомбиназы азоспириллы *recA*, зарегистрированы в присутствии гваякола.

Полученные результаты являются важными в установлении роли фенолоксидаз азоспирилл в процессах деструкции ароматических соединений.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00570.

Литература

1. Sinsabaugh R.L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil // Soil Biol. Biochem. – 2010. – Vol. 42. – P. 391–404.
 2. Routoula E., Patwardhan S.V. Degradation of anthraquinone dyes from effluents: a review focusing on enzymatic dye degradation with industrial potential // Environ. Sci. Technol. – 2020. – Vol.54, No. 2. – P. 647–664.
 3. Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е. Способность бактерий рода *Azospirillum* к деколоризации синтетических красителей // Микробиология. – 2020. – Т. 89, № 4. – С. 453–461.
 4. Krastanov A., Alexieva Z., Yemendzhiev H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives // Eng. Life Sci. – 2013. – Vol. 13, No. 1. – P. 76–87.
 5. Casciello C., Tonina F., Berinia F., Fasolic E., Marinellia F., Pollegionia L., Rosini E. Peroxidase production and ligninolytic potentials of fresh water bacteria *Raoultella ornithinolytica* and *Ensifer adhaerens* // Biotechnol. Rep. – 2017. – Vol. 13. – P. 49–57.
-