

Возможно, завтра человек найдёт для генных слияний новые интересные и полезные применения...

Работа выполнена в рамках ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 14.574.21.0028, шифр 2014-14-576-0058-20.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патрушев Л. И. Искусственные генетические системы. Наука, Москва 2004.
2. Елисеев Б. Д. Автореферат диссертации на соискание степени кандидата биологических наук. Москва 2011.
3. Ljungcrantz P., Carlsson H., Mansson M.— O. et al. *Biochemistry* 1989, 28, 8786-8792.
4. Simons R. W., Houman F., Kleckner N. *Gene* 1987, 53, 85-96.

APPLICATIONS OF GENE FUSIONS FOR RESOLVING OF FUNDAMENTAL AND APPLIED TASKS

Shumkov M. S.¹, Shumkova E. S.¹, Plotnikova E. G.^{2,3}

¹A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow; ²Perm State National Research University, Perm;

³Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

The proposed review aims to give a short introduction into construction and different ways of usage of gene fusions. The gene expression measurement, recombinant proteins purification, hybrid enzymes creation and living-cell biosensors construction are under consideration.

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОВ ДЕСТРУКЦИИ БИФЕНИЛА/ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ *RHODOCOCCLUS RUBER* P25

Шумкова Е. С.^{1,2}, Ульссон Б. Э.^{2,3}, Плотникова Е. Г.^{2,4}

¹Институт биохимии имени А. Н. Баха, РАН, Москва; ²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь;

³Государственный университет Сковде, Сковде, Швеция; ⁴Институт экологии и генетики микроорганизмов, УрО РАН, Пермь, Россия

Rhodococcus ruber P25 представляет интерес как активный деструктор бифенила/полихлорбифенилов – чрезвычайно устойчивых и опасных загрязнителей природной среды. С использованием платформы GS Juno (Roche) проведено секвенирование генома штамма P25. В результате анализа контигов выявлен кластер генов деструкции бифенила, организация которого отличается от известных к настоящему времени *bph*-оперонов.

Ключевые слова: *Rhodococcus ruber*, полихлорированные бифенилы, *bph*-оперон, бифенил 2,3-диоксигеназа.

Актуальность и цель работы. *Rhodococcus ruber* P25 представляет интерес как активный деструктор полихлорбифенилов (ПХБ) – чрезвычайно устойчивых и опасных загрязнителей природной среды [1].

Разложение бифенила/ПХБ у бактерий проходит по общему, «верхнему пути» биодеградации бифенила, в процессе которого

бифенил расщепляется до пентадиеновой и (хлор) бензойной кислоты в результате четырех последовательных ферментативных реакций с участием мультикомпонентной бифенил 2,3-диоксигеназы (БДО), включающей три α-, три β-субъединицы, ферредоксин и ферредоксин редуктазу; бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназы, 2,3-дигидроксибифенил

1,2-диоксигеназы и 2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеноат (ГОФДК) гидролазы. БДО – ключевой фермент, специфичность которого определяет спектр конвертируемых бактериями конгенеров ПХБ [2].

Ранее с использованием ДНК *R. ruber* P25 были получены нуклеотидные последовательности гена α -субъединицы БДО (*bphA1*) соответствующие активному центру (АЦ) и кластеру Риске (КР) (GenBank по. КР985699). Дедуктивные аминокислотные последовательности оказались на 99 и 100% (соответственно АЦ и КР) сходны с геном α -субъединицы фенилпропионат диоксигеназы бактерий рода *Rhodococcus* (WP_010592303.1) и на 97 и 99% (соответственно АЦ и КР) – *nah/bph*-генами диоксигеназы *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP_006933068.1). Полную нуклеотидную последовательность гена *bphA1* получить не удалось [3].

У большинства бактерий гены, отвечающие за деградацию бифенила и ПХБ, организованы в кластеры. Известно несколько типов кластеров *bph*-генов [2]. Данных о структуре *bph*-оперона *R. ruber* в литературе нет.

Цель работы – выявить гены деградации бифенила в контигах, полученных в результате геномного секвенирования *R. ruber* P25.

Материалы и методы. Объект исследования – штамм *R. ruber* P25 (=ИЭГМ896), выделенный из почвы, загрязненной галогенированными ароматическими соединениями [1]. Выделение тотальной ДНК проводили по общепринятому методу [4]. Секвенирование генома и сборку контигов осуществляли на платформе GS Junior (Roche). Поиск открытых рамок трансляции (ORF) осуществляли с использованием программ GeneMark и GLIMMER. Трансляцию нуклеотидных последовательностей проводили в UniproUGENE. Поиск гомологичных последовательностей проводили по базам данных GenBank/DBJ/EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с использованием алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты. Проведено секвенирование генома активного деструктора бифенила/ПХБ *R. ruber* P25. Суммарная длина контигов составила 5728255 п.н., что сопоставимо с размером генома *R. pyridinivorans* SB3094 (NC_023150.1), наиболее близкого по гену 16S рРНК виду *R. ruber*, для которого известен полный геном.

В результате анализа контигов выявлен кластер генов «верхнего пути» деградации бифенила/ПХБ. Организация *bph*-оперона

у штамма P25 отличается от таковой у известных бактерий-деструкторов бифенила/ПХБ: *bphRorf2orf1A4DCA1A2A3* Транскрипция *orf1* и *orf2* идет в направлении, противоположном *bphR* и *bphA4DCA1A2A3B*. Предполагается, что выявленные гены кодируют следующие белки: *bphR* (723 п.н.) – регулятор транскрипции семейства IclR; *orf2* (234 п.н.) – гипотетический белок, содержащий тетраатрикопептид-повторы (TPR); *orf1* (1644 п.н.) – гипотетический белок с неизвестной функцией; *bphA4* (1257 п.н.) – ферредоксин редуктазу; *bphC* (870 п.н.) – 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназу; *bphD* (846 п.н.) – ГОФДК-гидролазу; *bphA1* (1332 п.н.) – α -субъединицу БДО; *bphA2* (561 п.н.) – β -субъединицу БДО; *bphA3* (390 п.н.) – ферредоксин; *bphB* (768 п.н.) – бифенил 2,3-дигидродиол дегидрогеназу. После *bphB* расположены гены, кодирующие ферменты «нижнего пути» деградации бифенила – *bphFGEorf0*, участвующие в конверсии 2-гидроксипента-2,4-диеновой кислоты до ацетилСоА: 4-гидрокси-2-оксвалерат альдолаза, ацетальдегид дегидрогеназа, 2-кето-4-пентеноат гидратаза, соответственно; *orf0* кодирует белок-регулятор транскрипции. Транскрипция генов *bphFGE* идет в направлении, противоположном генам «верхнего пути» деградации бифенила. Проведен BLAST-анализ транслированных нуклеотидных последовательностей генов *bph*-оперона. Выявлен следующий уровень сходства аминокислотных последовательностей с гомологичными белками (%): *BphR* – регулятор транскрипции семейства IclR, *R. ruber* (WP_040275720.1) – 99; *Orf1*, *Orf2* – не найдено значимого сходства; *BphA4* – пиридин нуклеотид-дисульфид оксидоредуктаза *R. ruber* (WP_040275731.1) – 99, *Rhodococcus* sp. P14 (WP_010592306.1) – 99, ферредоксин редуктаза *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP_006933073.1) – 89; *BphD* – ГОФДК-гидролаза *R. ruber* (WP_040275733.1) – 100, *Rhodococcus* sp. P14 (WP_010592305.1) – 99, *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP_044475720.1) – 95; *BphC* – 2,3-дигидроксибифенил 1,2-диоксигеназа *R. ruber* (CDZ92501.1) – 99, *Rhodococcus* sp. EsD8 (CCW10449.1) – 94; *BphA1*-3-фенилпропионат диоксигеназа *Rhodococcus* sp. (WP_010592303.1) – 100, α -субъединица *nah/bph*-подобной диоксигеназы *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP_006933068.1) – 97; *BphA2* – β -субъединица бензол 1,2-диоксигеназы *Rhodococcus* sp. (WP_010592302.1) – 100, *R. ruber* (WP_017680463.1) – 98, β -субъединица БДО

Rhodococcus sp. EsD8 (WP_006933066.1) – 94; VphA3 – (2Fe-2S)-содержащий белок *R. ruber* (WP_026137690.1) – 100, ферредоксин 3-фенилпропионат диоксигеназа *Rhodococcus* sp. EsD8 (WP_006933065.1) – 94; VphB – 2,3-дигидрокси-2,3-дигидрофенилпропионат дегидрогеназа *R. ruber* (WP_040275749) – 100.

Таким образом, вероятно, что выявленный оперон участвует в деструкции бифенила/ПХБ. Структура *bph*-оперона *R. ruber* P25 отличается от известных к настоящему времени оперонов деструкции бифенила/ПХБ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-96049 р_урал_а. Геномное секвени-

рование выполнено в ЦКП «Геном» при ИМБ РАН (Москва).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плотникова Е. Г., Рыбкина Д. О., Демаков В. А. Штамм бактерий *Rhodococcus ruber* – деструктор полихлорированных бифенилов. Патент РФ № 2262531. Опубликовано 20.10.2005 г. Бюл. № 29.
2. Шумкова Е. С., Егорова Д. О., Боронникова С. В., Плотникова Е. Г. Молекулярная биология 2015, 4, в печати.
3. Pieper D. H., Seeger M. J Mol Microbiol Biotechnol 2008, 15, 121-138.
4. Ausbel F. M. et al. Short protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, 1995.

ORGANIZATION OF BIPHENYL AND POLYCHLORINATED BIPHENYLS DESTRUCTION GENES IN *RHODOCOCCUS RUBER* P25

Shumkova E. S.^{1,2}, Olsson B. E.^{2,3}, Plotnikova E. G.^{2,4}

¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS, Moscow, Russia; ²Perm State National Research University, Perm, Russia; ³University of Skövde, Skövde, Sweden; ⁴Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UB RAS, Perm, Russia

Rhodococcus ruber P25 is of interest as an active destructor of biphenyl and polychlorinated biphenyls – highly resistant and dangerous environmental pollutants. Genome sequencing of the strain P25 was conducted with GS Junor (Roche) platform. Biphenyl destruction genes cluster was identified after contigs analysis. It's organization is different from the currently known *bph*-operons.