

УДК 579.252.2

СТРУКТУРА РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНОВ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ В *RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS* M8 – БИОКАТАЛИЗАТОРЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКРИЛОВЫХ ГЕТЕРОПОЛИМЕРОВ

© 2024 г. Е. Г. Гречишникова^{а,*}, А. О. Шемякина^а, А. Д. Новиков^а,
Т. И. Калинина^а, К. В. Лавров^а, А. С. Яненко^а

^аНИИ “Курчатовский институт”, Курчатовский геномный центр, Москва, 123182, Россия

*e-mail: sel-sanguine@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

После исправления 06.02.2024 г.

Принята к опубликованию 08.02.2024 г.

Штамм *Rhodococcus rhodochrous* M8 является платформенным для разработки биотехнологий биокаталитического получения акриловых мономеров, сырья для получения акриловых гетерополимеров. Сконструирована генетическая система для изучения кобальт-зависимой транскрипции генов нитрилгидратазы в этом штамме, на основе репортерного гена металл-независимой ациламидазы из *Rhodococcus qingshengii* TA37. Показано, что кобальт-регулируемый промотор расположен на значительном удалении (около 0.5 т.п.н.) от генов нитрилгидратазы. Удаление участка между промотором и генами нитрилгидратазы существенно снижает как активность промотора, так и степень регулируемости кобальтом. Полученные результаты улучшают возможности рационального конструирования регулируемых экспрессионных кассет с использованием промотора генов нитрилгидратазы в *Rhodococcus* и дальнейшей разработки биокатализаторов на основе этих бактерий.

Ключевые слова: нитрилгидратаза, *Rhodococcus*, биокатализ, регуляция транскрипции

DOI: 10.31857/S0026365624040059

Работа направлена на изучение особенностей системы кобальт-зависимой регуляции транскрипции генов кобальт-содержащей нитрилгидратазы (далее – НГ) в *Rhodococcus rhodochrous* M8 (Pogorelova et al., 1996). Этот штамм является платформенным для разработки биотехнологий биокаталитического получения акриловых мономеров, сырья для получения акриловых гетерополимеров. Система регуляции транскрипции генов НГ в этом штамме состоит из регуляторной области генов НГ и гена кобальт-зависимого транскрипционного регулятора CblA (Lavrov et al., 2018). Эти генетические элементы используются для конструирования штаммов-биокатализаторов на основе *Rhodococcus* для получения акриловых мономеров и дальнейшего получения акриловых гетерополимеров (Lavrov et al., 2013; Lavrov, Yanenko, 2013; Lavrov et al., 2014; Lavrov et al., 2019; Shemyakina et al., 2021; Grechishnikova et al., 2023).

Структура регуляторной области генов НГ недостаточно изучена, в частности, неизвестна локализация в ней собственно промотора. В задачи работы входили биоинформатический анализ

межгенной области перед генами НГ для выявления предполагаемого кобальт-индуцибельного промотора и экспериментальная локализация этого промотора.

Культуры штамма *R. rhodochrous* M8 и его производных выращивали в колбах Эрленмейера (объем среды 50 мл) при 30°C и встряхивании при 300 об./мин на жидкой минимальной синтетической (МС) среде следующего состава (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 2.5; KH_2PO_4 – 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.004; глюкоза – 5; мочевины – 6. Если указано в тексте, добавлялись также $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01 г/л и апрамицин – 0.1 г/л. Удельную ациламидазную активность клеток измеряли, как описано ранее (Lavrov et al., 2018), и выражали в единицах, соответствующих количеству мкМ 4'-нитроанилина, появившегося за 1 минуту в расчете на 1 мг клеток по сухому весу ($\text{мкМ}_{\text{п-на}}/\text{мин} \times \text{мг с.в.кл.}$). Биоинформатические инструменты использовали при их стандартных настройках, процедуры клонирования проводили согласно рекомендациям фирм-производителей ферментов. Конъюгационные скрещивания, введение плазмид электропорацией

и RT-qPCR проводили, как описано нами ранее (см. соответствующие ссылки в тексте).

Штаммы *R. rhodochrous* M8, M33, M33 aam и M50 хранятся в БРЦ ВКПМ НИЦ “Курчатовский институт” под номерами Ас-2021, Ас-2017, Ас-1960 и Ас-2133 соответственно.

Биоинформатический анализ промоторной области генов нитрилгидратазы. Протяженность межгенной области перед генами НГ, в которой может находиться промотор, определяли с использованием полной последовательности генома *R. rhodochrous* M8 (Novikov et al., 2021). Для обнаружения предполагаемых генов перед генами НГ использовали как аннотации, полученные с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2016), так и дополнительные проверки с помощью InterProScan 5 software (Jones et al., 2014). Ближайшей к *nhmB*, первому гену оперона НГ (на расстоянии около 0.6 т.п.н.), оказалась предполагаемая открытая рамка считывания, обозначенная $\Delta nhmE$, гомологичная части предполагаемого гена *nhhE* с неизвестной функцией из *R. rhodochrous* J1 (Komeda et al., 1996). Предполагаемая регуляторная область протяженностью 0.6 т.п.н. (обозначена также P_{nh569} , рис. 1а) была проанализирована с помощью ресурса BPROM (<http://www.softberry.com/>) и аналогов (PromoterHunter (http://www.phisite.org/main/index.php?nav=tools&nav_sel=hunter), NNPP2.2 (Reese, 2001), SAPHIRE.CNN (Coppens et al., 2022)).

В результате были выделены два предполагаемых промотора: P1 на расстоянии [–472; –419] от стартового кодона и P2 на расстоянии [–85; –39] (рис. 1б). Дополнительно, весь регион был проанализирован с помощью ресурса EMBOS palindrom (Rice et al., 2000) (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/help/palindrome>) для поиска предполагаемых сайтов посадки кобальт-зависимого регулятора, которые, по литературным данным (Busenlehner et al., 2003), могут быть несовершенными инвертированными повторами. Такие повторы были выявлены около обоих предполагаемых промоторов (рис. 1б).

Тестирование системы оценки кобальт-зависимой транскрипции в *Rhodococcus*. Экспериментальная проверка предсказаний промоторов в исследуемой регуляторной области требовала удобной системы оценки транскрипционной активности конструируемых вариантов этой области. Для этого была протестирована система оценки уровней кобальт-зависимой транскрипции, содержащая в качестве репортера ген металл-независимой ациламидазы из *R. qingshengii* TA37 (Lavrov, Yanenko, 2013). Активность этого фермента легко измеряется по цветной реакции гидролиза *n*-нитроацетанилида, без разрушения клеток (Lavrov et al., 2010).

Для тестирования системы использовали штамм *R. rhodochrous* M33 aam, полученный ранее (Lavrov et al., 2018) в результате введения гена ациламидазы

aam в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33, $\Delta nhmCD$ производный от штамма M8. Ген вводили таким образом, чтобы он оказался под транскрипционным контролем регуляторной области генов НГ. Для этого заменяли гены субъединиц нитрилгидратазы *nhmBA* на ген *aam* при сохранении структуры локуса нитрилгидратазы и его регуляторной области P_{nh569} . Замену *nhmBA* на *aam* проводили путем двойной рекомбинации с неспособной к автономной репликации в родококках плазмидой pRY1- P_{nh569} -aam-nhmG. Рекомбинация проходила после конъюгативного введения этой плазмиды по методике (Riabchenko et al., 2006) по плечам, содержащим последовательности P_{nh569} и *nhmG*, в результате чего был получен штамм *R. rhodochrous* M33 aam (рис. 1в).

Штамм *R. rhodochrous* M33 aam в течение 1 сут выращивали на жидкой среде в присутствии и в отсутствие ионов кобальта и измеряли ациламидазные активности клеток и уровни транскрипции P_{nh569} (с помощью RT-qPCR). В присутствии

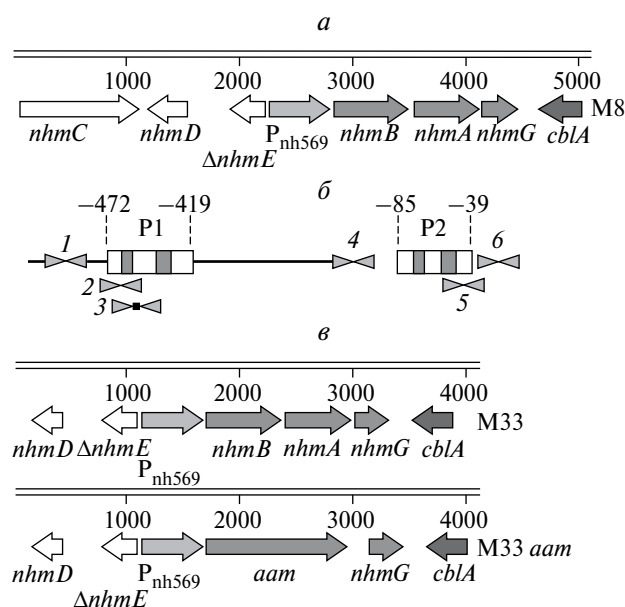


Рис. 1. Структуры ДНК-локусов, описываемых в работе: а – гены кластера НГ в *R. rhodochrous* M8. *nhmC*, *nhmD* – гены амид-зависимых регуляторов транскрипции генов НГ, $\Delta nhmE$ – предположительная открытая рамка считывания с неизвестной функцией, P_{nh569} – регуляторная область генов НГ, *nhmB*, *nhmA* – гены β и α субъединиц НГ соответственно, *nhmG* – ген белка-металлошаперона НГ, *cblA* – ген кобальт-зависимого регулятора транскрипции генов НГ; б – предполагаемые промоторы (P1 и P2) и сайты связывания кобальт-зависимого регулятора *cblA* (пары стрелок 1–6) в регуляторной области P_{nh569} перед геном *nhmB*; в – структура кластера генов НГ в штаммах *R. rhodochrous* M33 и *R. rhodochrous* M33 aam (в последнем гены *nhmBA* заменены на ген ациламидазы *aam*). $\Delta nhmD$ – частично делетированный *nhmD*.

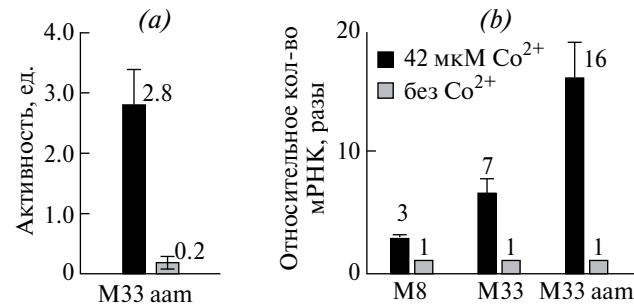


Рис. 2. Сравнение активностей промотора НГ по уровням транскрипции и активности репортерного гена *aam*: а – ациламидазные активности клеток в штамме *R. rhodochrous* M33 *aam*, выращенных с добавкой и без добавки CoCl₂; б – уровни транскрипции оперона P_{nh569}-*nhmBAG* в штаммах *R. rhodochrous* M8, M33 и оперона P_{nh569}-*aam-nhmG* в штамме *R. rhodochrous* M33 *aam*, выращенных в присутствии и в отсутствие CoCl₂, определенные с помощью RT-qPCR. Все данные получены при отборе клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста.

ионов кобальта ациламидазные активности клеток и уровни транскрипции активировались сходно (в 14 и 16 раз выше, чем без ионов кобальта, рис. 2а и 2б). Дополнительно, сходные тенденции кобальт-зависимой активации транскрипции были обнаружены в тех же условиях роста в штаммах *R. rhodochrous* M8 и M33, содержащих под контролем P_{nh569} гены *nhmBA* (рис. 2б). Таким образом, ациламидазная активность клеток, в которых *aam* находится под контролем P_{nh569},

может быть использована для оценки уровней транскрипции, инициирующихся в исследуемой регуляторной области.

Локализация кобальт-индуцируемого промотора. Промоторная активность исследуемой регуляторной области была обнаружена ранее (Lavrov et al., 2018), однако детальная проверка предсказаний промоторов в ней требовала конструирования экспрессионных кассет, содержащих разные делеционные варианты этой области. Для проверки функционирования предполагаемых промоторов P1 и P2, входящих в регуляторную область P_{nh569}, была сконструирована серия автономно реплицирующихся плазмид на базе плазмиды pRY16 (Lavrov et al., 2018), содержащих варианты экспрессионной кассеты 2Tfd-P_{nhN}-*aam-nhmG-cblA*. В этих вариантах репортерный ген ациламидазы *aam* находился под контролем вариантов регуляторной области разной протяженности: P_{nh569}, P_{nh408}, P_{nh235}, P_{nh157}, P_{nh31} (индекс обозначает длину варианта от стартового кодона). Фрагмент 2Tfd (двойной терминатор транскрипции из бактериофага *fd*) был введен для снижения влияния возможных вышележащих промоторов на активность исследуемого участка. Также был сконструирован контрольный вариант с максимально короткой регуляторной областью P_{nh31}, не содержащий 2Tfd (рис. 3а).

Плазмиды ввели в штамм *R. rhodochrous* M50, производный от штамма M8, не содержащий кластера НГ *nhmBAG-cblA*; полученные штаммы выращивали в присутствии апрамицина в течение 3 сут в присутствии и в отсутствие ионов кобальта. Штамм с наиболее длинным вариантом

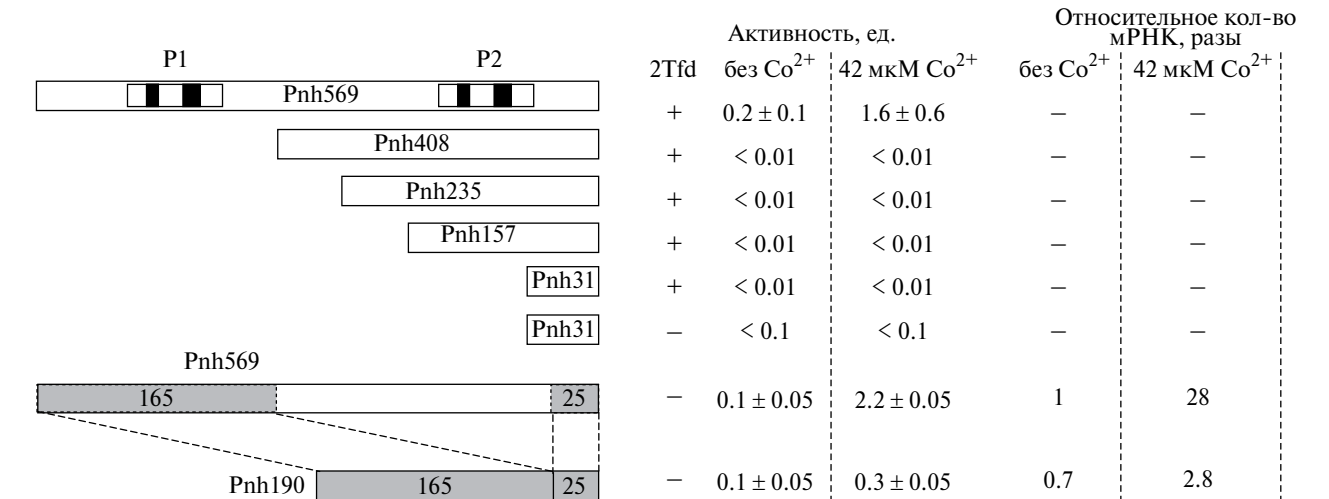


Рис. 3. Структуры делеционных вариантов регуляторной области P_{nh569} (слева), ациламидазные активности (в середине) и относительное количество мРНК *aam-nhmG* (справа) в штаммах *R. rhodochrous*, содержащих репортерный ген *aam* под контролем этих вариантов. а – Варианты регуляторной области, протестированные в составе экспрессионной кассеты P_{nhN}-*aam-nhmG-cblA* на автономной плазмиде pRY16 в штамме *R. rhodochrous* M50 (стационарные культуры); б – варианты регуляторной области, протестированные в составе такой же экспрессионной кассеты, введенной в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 *aam* (экспоненциально растущие культуры).

регуляторной области P_{nh569} проявил ациламидазную активность, и она регулировалась ионами кобальта (1.6 ± 0.6 и 0.2 ± 0.1 ед. $\pm$ Co^{2+} соответственно). Штаммы с укороченными вариантами регуляторной области не проявили ациламидазной активности. Контрольный вариант без 2Tfd фрагмента проявлял минимальную активность, измерившуюся на пределе обнаружения использованной методики, около 0.05 ед. (рис. 3а). Последнее указывает на невысокий уровень транскрипции с вышележащих промоторов, не влияющий существенно на уровни активности исследуемых фрагментов регуляторной области. Полученные результаты указывают на то, что для инициации транскрипции требовался участок ДНК, содержащий предполагаемый промотор P1.

Для уточнения функции участков регуляторной области сконструировали уменьшенный вариант P_{nh569} , обозначенный P_{nh190} . Этот вариант был лишен внутреннего участка, содержащего предполагаемый промотор P2. P_{nh190} состоял из фрагмента 165 п.н., содержащего промотор P1, и фрагмента 25 п.н., прилегающего к старт-кодону *nhmB* (содержит SD-сайт; рис. 3б). Кассету P_{nh190} -aam в составе интегративной плазмиды ввели в хромосому штамма *R. rhodochrous* M33 aam и таким же образом сконструировали изогенный штамм для сравнения *R. rhodochrous* M33 P_{nh569} -aam с регуляторной областью полной длины. Оба штамма выращивали в жидких средах (без апрамицина) в присутствии и в отсутствие ионов кобальта в течение 24 ч (до конца экспоненциальной фазы роста). Штамм с кассетой P_{nh190} -aam продемонстрировал ациламидазную активность и способность к индукции ионами кобальта, однако уровень его активности в присутствии ионов кобальта оказался в несколько раз ниже, по сравнению с уровнем активности штамма с кассетой P_{nh569} -aam в таких же условиях (рис. 3б).

Разницы в относительных количествах мРНК в присутствии и в отсутствие ионов кобальта у штаммов M33 P_{nh190} -aam и M33 P_{nh569} -aam коррелировали с различиями в их ациламидазных активностях в тех же условиях, т.е. различались в 4 раза и на порядок соответственно (рис. 3б).

Таким образом, промоторной активностью и способностью к регуляции ионами кобальта обладал участок ДНК, содержащий предсказанный промотор P1. Однако сниженные (по сравнению с более полным вариантом P_{nh569}) уровни активности указывают на существенную роль внутреннего участка регуляторной области от -404 до -26 , содержащего предполагаемый промотор P2. При этом, варианты регуляторной области, содержащие только предполагаемый P2 (P_{nh408} , P_{nh235} , P_{nh157}) не проявили промоторной активности. В этой связи интересно отметить, что ранее (Komeda et al., 1996) в сходной (но не идентичной) регуляторной

области генов нитрилгидратазы из штамма *R. rhodochrous* J1 сайты инициации транскрипции (TSS) картировались в районе 71 и 48 нуклеотидов перед стартовым кодоном *nhhB* (гомолог *nhmB*). Промотор НГ в штамме J1, соответствующий таким позициям TSS, может располагаться в районе, аналогичном участку P2 в штамме M8 (рис. 1б). К сожалению, Komeda и соавторы не приводят описания экспериментов по картированию TSS или ссылок на такие описания. Кроме того, в этой работе не проведено тестирование промоторной активности участка, аналогичного P2, с помощью какого-либо репортера, поэтому оценить достоверность результатов затруднительно. Данные, полученные нами при использовании гена-репортера, указывают на то, что если транскрипция и иницируется на участке P2, то количества такого транскрипта недостаточно для синтеза измеряемого количества ациламидазы.

Возможная роль внутреннего участка в транскрипционной активности исследуемой регуляторной области может быть связана с наличием РНК-эффекторов, например, рибопереклюкателей (Nudler, Mironov, 2004), и/или иных вторичных структур. Биоинформатически обнаружить рибопереклюкатели нам не удалось (инструментами Riboswitch Scanner (Mukherjee, Sengupta, 2016) и Infernal (Nawrocki, Eddy, 2013)), что позволяет лишь говорить об отсутствии в исследуемом участке известных структур такого рода.

Что касается вторичных структур мРНК, не относящихся к рибопереклюкателям, на расстоянии -398 и -237 п.н. от старт-кодона гена *nhmB* (внутри области, удаленной при конструировании P_{nh190} варианта) предсказываются две шпильки со стеблями протяженностью 10 и 7 пар нуклеотидов соответственно (с помощью Unafold (Markham, Zuker, 2008) и RNAstructure (Reuter, Mathews, 2010)). Возможное влияние предполагаемых шпилек на уровни активности регуляторной области, а также других возможных эффектов (например, кооперативных взаимодействий между отдаленными участками ДНК (Dandanell et al., 1987), взаимодействия транскрипционных регуляторов с анализируемыми участками ДНК в исследуемой регуляторной области) станут предметом дальнейшего экспериментального изучения.

В результате проведенной работы мы обнаружили, что кобальт-регулируемый промотор расположен на значительном удалении (около 0.5 т.п.н.) от контролируемых им генов НГ, что нехарактерно для бактериальных промоторов. Участок между обнаруженным нами промотором и НГ генами существенен как для уровня транскрипционной активности промотора, так и для степени его контроля в присутствии ионов кобальта. Полученные результаты выявляют сложность структуры регуляторной области генов нитрилгидратазы и создают

базис для дальнейших исследований этого практически значимого промотора, важных для дальнейшей разработки биокатализаторов на основе бактерий *Rhodococcus*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ Курчатовский институт, при частичной поддержке Соглашения МОН 075-15-2019-1659 о создании геномных центров мирового уровня (определение уровней транскрипции с помощью RT-qPCR).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Busenlehner L.S., Pennella M.A., Giedroc D.P. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. P. 131–143.
- Coppens L., Wicke L., Lavigne R. SAPHIRE. CNN: Implementation of dRNA-seq-driven, species-specific promoter prediction using convolutional neural networks // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022. V. 20. P. 4969–4974.
- Dandanell G., Valentin-Hansen P., Erik Løve Larsen J., Hammer K. Long-range cooperativity between gene regulatory sequences in a prokaryote // *Nature*. 1987. V. 325. P. 823–826.
- Grechishnikova E.G., Shemyakina A.O., Novikov A.D., Lavrov K.V., Yanenko A.S. *Rhodococcus*: sequences of genetic parts, analysis of their functionality, and development prospects as a molecular biology platform // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2023. V. 43. P. 835–850.
- Jones P., Binns D., Chang H.-Y., Fraser M., Li W., McAnulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G. InterProScan 5: genome-scale protein function classification // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. P. 1236–1240.
- Komeda H., Kobayashi M., Shimizu S. Characterization of the gene cluster of high-molecular-mass nitrile hydratase (H-NHase) induced by its reaction product in *Rhodococcus rhodochrous* J1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 4267–4272.
- Lavrov K., Zalunin I., Kotlova E., Yanenko A. A new acylamidase from *Rhodococcus erythropolis* TA37 can hydrolyze N-substituted amides // *Biochemistry (Moscow)*. 2010. V. 75. P. 1006–1013.
- Lavrov K., Larikova G., Yanenko A. Novel biocatalytic process of N-substituted acrylamide synthesis // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013. V. 49. P. 702–705.
- Lavrov K., Yanenko A. Cloning of new acylamidase gene from *Rhodococcus erythropolis* and its expression in *Escherichia coli* // *Russ. J. Genet.* 2013. V. 49. P. 1078–1081.
- Lavrov K., Novikov A., Ryabchenko L., Yanenko A. Expression of acylamidase gene in *Rhodococcus erythropolis* strains // *Russ. J. Genet.* 2014. V. 50. P. 1003–1007.
- Lavrov K., Grechishnikova E., Shemyakina A., Novikov A., Kalinina T., Epremyan A., Glinskii S., Minasyan R., Voronin S., Yanenko A. Optimization of the expression of nitrilase from *Alcaligenes denitrificans* in *Rhodococcus rhodochrous* to improve the efficiency of biocatalytic synthesis of ammonium acrylate // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. P. 861–869.
- Lavrov K.V., Shemyakina A.O., Grechishnikova E.G., Novikov A.D., Derbikov D.D., Kalinina T.I., Yanenko A.S. New *cblA* gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous* // *Res. Microbiol.* 2018. V. 169. P. 227–236.
- Markham N.R., Zuker M. UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 453. P. 3–31.
- Mukherjee S., Sengupta S. Riboswitch Scanner: an efficient pHMM-based web-server to detect riboswitches in genomic sequences // *Bioinformatics*. 2016. V. 32. P. 776–778.
- Nawrocki E.P., Eddy S.R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches // *Bioinformatics*. 2013. V. 29. P. 2933–2935.
- Novikov A.D., Lavrov K.V., Kasianov A.S., Topchiy M.A., Gerasimova T.V., Yanenko A.S. Complete genome sequence of *Rhodococcus* sp. strain M8, a platform strain for acrylic monomer production // *Microbiol. Resour. Announce*. 2021. V. 10. № 10. Art. e01314-20. <https://doi.org/10.1128/mra.01314-20>
- Nudler E., Mironov A.S. The riboswitch control of bacterial metabolism // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 11–17.
- Pogorelova T.E., Ryabchenko L.E., Sunzov N.I., Yanenko A.S. Cobalt-dependent transcription of the nitrile hydratase gene in *Rhodococcus rhodochrous* M8 // *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. V. 144. P. 191–195.
- Reese M.G. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome // *Comput. Chem.* 2001. V. 26. P. 51–56.
- Reuter J.S., Mathews D.H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis // *BMC Bioinf.* 2010. V. 11. P. 1–9.
- Riabchenko L., Podcherniaev D., Kotlova E., Ianenko A. Cloning the amidase gene from *Rhodococcus*

- rhodochrous* M18 and its expression in *Escherichia coli* // Genetika. 2006. V. 42. P. 1075–1082.
- Rice P., Longden I., Bleasby A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite // Trends Genet. 2000. V. 16. P. 276–277.
- Shemyakina A. O., Grechishnikova E. G., Novikov A. D., Asachenko A. F., Kalinina T. I., Lavrov K. V., Yanenko A. S. A set of active promoters with different activity profiles for superexpressing *Rhodococcus* Strain // ACS Synth. Biol. 2021. V. 10. P. 515–530.
- Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E. P., Zaslavsky L., Lomsadze A., Pruitt K. D., Borodovsky M., Ostell J. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 6614–6624.

SHORT COMMUNICATIONS

Structure of the Regulatory Region of Nitrile Hydratase Genes in *Rhodococcus rhodochrous* M8, a Biocatalyst for Production of Acrylic Heteropolymers

E. G. Grechishnikova^{1, *}, A. O. Shemyakina¹, A. D. Novikov¹,
T. I. Kalinina¹, K. V. Lavrov¹, and A. S. Yanenko¹

¹NRC “Kurchatov Institute”, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: sel-sanguine@yandex.ru

Received October 24, 2023; revised February 6, 2024; accepted February 8, 2024

Abstract. *Rhodococcus rhodochrous* strain M8 is a platform for development of the biotechnologies for biocatalytic production of acrylic monomers, the raw material for synthesis of acrylic heteropolymers. A genetic system for investigation of the cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in this strain was constructed, based the reporter gene of the metal-independent acylamidase from *Rhodococcus qingshengii* TA37. The cobalt-regulated promoter was shown to be located at a significant distance (~0.5 kb) from nitrile hydratase genes. Excision of the region between the promoter and the nitrile hydratase genes decreased significantly both the promoter activity and the degree of regulation by cobalt. Our results improve the possibilities for rational design of regulated expression cassettes using the promoter of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus*, and for further development of biocatalysts based on these bacteria.

Keywords: nitrile reductase, *Rhodococcus*, biocatalysis, transcription regulation