

АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «Научно-исследовательский институт  
Аджиномото-Генетика»

*На правах рукописи*

**ДОРОШЕНКО ВЕРА ГЕОРГИЕВНА**

**НАПРАВЛЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМЫ *ESCHERICHIA COLI*  
ДЛЯ СИСТЕМНОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА  
*L*-ФЕНИЛАЛАНИНА**

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук  
03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Научный консультант:  
доктор биологических наук, профессор Машко Сергей Владимирович

Москва 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Системный подход к разработке продуцентов полезных соединений ..</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Биосинтез фенилаланина и принципы получения его сверхпродукции в <i>E. coli</i>.....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Цели и способы получения <i>L</i> -фенилаланина.....	15
1.2.2. Биосинтез фенилаланина .....	16
1.2.2.1. Общий ароматический путь .....	16
1.2.2.1a. Синтез хоризмовой кислоты .....	24
1.2.2.2. Специфичный для фенилаланина путь биосинтеза.....	25
1.2.3. Регуляция биосинтеза фенилаланина .....	28
1.2.3.1. Посттранскрипционная регуляция .....	28
1.2.3.2. Транскрипционная регуляция ароматического пути и синтеза фенилаланина в <i>E. coli</i> .....	29
1.2.4. Биосинтез эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата .....	33
1.2.5. Метаболическая инженерия продуцента фенилаланина <i>E. coli</i> .....	35
1.2.5.1. Инженерия центрального метаболизма .....	35
1.2.5.2. Основные подходы получения продуцента фенилаланина .....	35
<b>1.3. Признак утилизации сахарозы в энтеробактериях и его введение в штаммы <i>E. coli</i>, не растущие на сахарозе .....</b>	<b>37</b>
1.3.1. Факультативность признака утилизации сахарозы.....	37
1.3.2. Мобильность кластеров сахарозных генов <i>scr</i> и <i>csc</i> .....	37
1.3.3. Утилизация сахарозы в энтеробактериях .....	39
1.3.4. Перенос генов утилизации сахарозы в штаммы <i>E. coli</i> <i>Suc</i> <sup>-</sup> .....	41
<b>1.4. Повышение устойчивости к синтезируемому продукту за счёт активации его экспорта из клетки .....</b>	<b>44</b>
1.4.1. Идентификация экспортёров аминокислот у бактерий .....	44
1.4.2. Общая характеристика экспортёров аминокислот.....	48
1.4.3. Регуляция экспортёров аминокислот и их физиологические функции ..	48
1.4.4. Структурно-функциональный анализ экспортёров аминокислот .....	51
<b>1.5. Характеристика регуляторных систем <i>E. coli</i>, элементы которых использовались в работе .....</b>	<b>54</b>
<b>1.5.1. Индукция клеточного ответа на лимитацию по неорганическому фосфору .....</b>	<b>55</b>

1.5.1.1. Гомеостаз $P_i$ .....	55
1.5.1.2. Промоторы Pho-регулона и их использование.....	60
<b>1.5.3. Контроль уровня клеточных белков с помощью протеолиза и генетически кодируемая целевая деградация белка.....</b>	<b>64</b>
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>69</b>
<b>2.1. Химические вещества и ферменты .....</b>	<b>69</b>
<b>2.2. Бактериальные штаммы и плазмиды.....</b>	<b>69</b>
<b>2.3. Олигонуклеотиды.....</b>	<b>69</b>
<b>2.4. Среды и культивирование штаммов.....</b>	<b>76</b>
2.4.1. Культивирование на лабораторных средах .....	76
2.4.2. Проведение ферментаций.....	76
2.4.3. Культивирование штаммов для анализа потоков.....	78
2.4.4. Определение выживаемости и минимальных ингибирующих концентраций .....	78
<b>2.5. Конструирование штаммов и плазмид методами молекулярной генетики .....</b>	<b>79</b>
2.5.1. Отбор транспозиций Tn2555.3 из pBRS5.2 в RP4 .....	79
2.5.2. Перенос генетических признаков с помощью трансдукции.....	79
2.5.3. Му-опосредованная интеграция генов в хромосому <i>E. coli</i> .....	80
<b>2.6. Манипуляции с ДНК.....</b>	<b>81</b>
2.6.1. Методики работы с ДНК .....	81
2.6.2. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции .....	83
2.6.3. Картирование точек интеграции Mu-кассет в хромосоме <i>E. coli</i> .....	83
2.6.4. Конструирование плазмид pMS1 и pMDV3-P <sub>φ10</sub> - <i>yddG</i> .....	84
2.6.5. Получение плазмид для экспрессии гена <i>ARO2</i> из <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в <i>E. coli</i> .....	86
<b>2.7. Рекомбинационная инженерия <i>E. coli</i> MG1655 .....</b>	<b>88</b>
2.7.1. Получение делеций генов.....	88
2.7.2. Получение штаммов, продуцирующих <i>L</i> -гистидин.....	89
2.7.3. Замена промотора перед геном <i>yddG</i> в хромосоме <i>E. coli</i> .....	89
2.7.4. Конструирование штаммов для изучения регуляции гена <i>yddG</i> .....	90
2.7.5. Конструирование штаммов, содержащих аллели <i>tyrA-ssrA</i> .....	91
2.7.6. Тюнинг экспрессии гена <i>pgl</i> в продуценте фенилаланина DV157 .....	93

2.7.7. Получение генетических модификаций $P_{tac}$ - <i>aroC</i> и $P_{tac}$ - <i>ARO2</i> в хромосоме .....	93
2.7.8. Замена нативного промотора <i>aroG</i> на промоторы генов Pho-регулона <i>phoA</i> и <i>pstS</i> .....	95
<b>2.8. Манипуляции с РНК .....</b>	<b>96</b>
2.8.1. Выделение РНК .....	96
2.8.2. ПЦР, сопряженная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).....	97
2.8.3. Определение стартовой точки транскрипции.....	97
<b>2.9. Манипуляции с белками.....</b>	<b>98</b>
2.9.1. Получение клеточных экстрактов и анализ белков .....	98
2.9.2. Двумерный электрофорез для протеомного анализа .....	99
2.9.3. Идентификация белков из гелей с помощью масс-спектрометрии.....	99
<b>2.10. Аналитические методы и определение ферментативных активностей .....</b>	<b>100</b>
2.10.1. Определение концентраций аминокислот, глюкозы, $P_i$ .....	100
2.10.2. Тестирование секреции фенилаланина .....	101
2.10.3. Определение активности $\beta$ -галактозидазы .....	101
2.10.4. Определение активности префенатдегидрогеназы .....	102
2.10.5. Определение активности 6-фосфоглюконолактоназы .....	103
2.10.6. Определение активности щелочной фосфатазы.....	104
2.10.7. Определение активности ДАНР-синтазы .....	105
<b>2.11. Анализ метаболических потоков .....</b>	<b>105</b>
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>107</b>
<b>3.1. Получение генетически стабильных штаммов-продуцентов <i>E. coli</i>, способных утилизировать сахарозу .....</b>	<b>107</b>
3.1.1. Анализ первичной структуры одного из вариантов сахарозного транспозона Tn2555 .....	107
3.1.2. Модель транспозиции Tn2555.....	108
3.1.3. Интеграция генов <i>scr</i> в хромосому <i>E. coli</i> .....	112
3.1.4. Продукция триптофана и фенилаланина из сахарозы в <i>E. coli</i> .....	112
<b>3.2. Получение модельных продуцентов с помощью рекомбинационной инженерии.....</b>	<b>115</b>
<b>3.3. Повышение устойчивости к синтезируемому продукту за счёт расширения его экспорта из клетки .....</b>	<b>123</b>
3.3.1 Интеграция промотора $P_L$ перед геном <i>yddG</i> в хромосоме <i>E. coli</i> и свойства полученных штаммов.....	123

3.3.2. Получение штаммов <i>E. coli</i> с дополнительной копией гена <i>yddG</i> в хромосоме и их характеристика.....	128
3.3.3 Увеличение продукции ароматических аминокислот в результате сверхэкспрессии <i>yddG</i> в штаммах-продуцентах .....	132
3.3.4 Репеллентные свойства <i>DL-p-f-Phe</i> для <i>E. coli</i> с $P_L$ - <i>yddG</i> .....	134
3.3.5. Сравнение протеомов штаммов с $P_L$ - <i>yddG</i> и без этой модификации...	135
3.3.6. Молекулярно-генетическая характеристика YddG .....	138
<b>3.4. Получение продуцента фенилаланина Tyr<sup>+</sup>, не накапливающего тирозин.....</b>	<b>144</b>
<b>3.5. Исследование достаточности восстановленного флавина для хоризматсинтазы <i>E. coli</i> при продукции <i>L</i>-фенилаланина .....</b>	<b>150</b>
3.5.1. Экспрессия гена <i>ARO2</i> , кодирующего хоризмат-синтазу <i>S. cerevisiae</i> , в <i>E. coli</i> .....	150
3.5.2. Сравнение двух типов хоризмат-синтаз в продуценте фенилаланина DV1017 .....	154
3.5.3. Сравнение двух типов хоризмат-синтаз в продуценте фенилаланина DV1017 $\Delta$ <i>tyrR</i> .....	155
3.5.4. Тестирование бифункциональности <i>ARO2</i> в продуценте фенилаланина DV1017 $\Delta$ <i>pgi</i> .....	156
<b>3.6. Конструирование модельного продуцента с метаболической регуляцией синтеза <i>L</i>-фенилаланина.....</b>	<b>158</b>
3.6.1 Конкуренция между синтезом фенилаланина и накоплением биомассы .....	158
3.6.2. Моделирование стационарной фазы в периодической ферментации с помощью $P_i$ -лимитации.....	160
3.6.3. Использование промоторов генов <i>Pho</i> -регулона для контроля экспрессии гена <i>aroG4</i> .....	163
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>166</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>168</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	<b>169</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>172</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность и проработанность темы исследования

Производство аминокислот с помощью ферментации является одним из столпов промышленной биотехнологии, а получение штаммов для этого производства всегда было на переднем крае биоинженерных технологий (Wendisch, 2020). Технологии, разработанные с целью получения продуцентов аминокислот, использовались и используются в дальнейшем, как для получения продуцентов других полезных соединений, так и в исследовательской практике.

Датой рождения микробиологического производства аминокислот считается 1957 г., когда был изобретён дешёвый способ получения глутамата натрия из сахара и аммония посредством ферментации *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita et al., 1957). Если *C. glutamicum* может продуцировать глутаминовую кислоту и лизин при определённых условиях культивирования, то получение других аминокислот микробиологическим способом удалось достичь только с помощью специально полученных штаммов, первоначально отобранных методами мутагенеза и селекции, позже с помощью генно-инженерных подходов.

Внедрение последних подходов позволило заменить термин «селекция» в отношении получения новых штаммов на термин «конструирование». Одним из первых сконструированных таким образом штаммов был штамм-продуцент *L*-треонина на основе *Escherichia coli*, полученный во ВНИИГенетика в 80-ых годах прошлого века, под руководством акад. В.Г. Дебабова и проф. Ю.И. Козлова (Debabov, Kozlov, 1992; Debabov, 2003). В это время, благодаря молекулярно-генетической изученности и разработанности соответствующего инструментария, бактерия *E. coli* переходит из объекта исследований в один из первостепенных объектов для развития микробиологического производства (Юзбашев и др., 2013).

Позже методология получения продукции полезных соединений с помощью живых клеток стала называться метаболической инженерией (*Bailey*, 1991). Метаболическая инженерия – это направленное улучшение процесса биосинтеза практически важного целевого продукта и свойств метаболизма организма как целостной системы путем модификации специфических биохимических реакций и их регуляции или создания новых метаболических путей с использованием технологии рекомбинантных ДНК и других молекулярно-биологических и биохимических методов.

Первый промышленный продуцент *L*-фенилаланина *E. coli* был получен в американской компании NutraSweet, название которой является товарным знаком-маркой аспартама, низкокалорийного подсластителя, синтезируемого из фенилаланина и аспарагиновой кислоты (*Grinter*, 1997).

Основной принцип конструирования продуцентов заключался в перенаправлении потока углерода по заданному пути. Это достигалось за счёт целенаправленно отбираемых мутаций, снимающих репрессию пути биосинтеза, амплификации целевых биосинтетических генов на плазмидах, инактивации конкурирующих путей биосинтеза. Для получения продуцентов использовались устойчивые к ретроингибированию формы ключевых ферментов биосинтеза фенилаланина: 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат (ДАНР)-синтазы (ЕС 4.1.2.15) и хоризматмутазы/префенатдегидратазы (ЕС 5.4.99.5/1.3.1.12). С помощью клонирования соответствующих генов на плазмидах усиливали активности ферментов общего ароматического пути и собственно биосинтеза фенилаланина из хоризматовой кислоты. Амплифицируя гены *tktA* и *ppsA*, кодирующие транскетолазу (ЕС 2.2.1.1) и фосфоенолпируватсинтазу (ЕС 2.7.9.2), соответственно, увеличивали пулы предшественников, интермедиатов центрального метаболизма, эритрозо-4-фосфата (Е4Р) и фосфоенолпирувата (РЕР). Продуценты фенилаланина *E. coli* были ауксотрофами по тирозину. Последний признак предотвращал побочную продукцию тирозина, являющуюся следствием почти идентичных (за

исключением двух последних реакций) путей синтеза тирозина и фенилаланина в *E. coli*.

Настоящая работа, в основном, посвящена разработке новых подходов или стратегий дальнейшего усовершенствования продуцента фенилаланина. Эти подходы должны были оптимизировать метаболизм клетки с учётом требований производства, т.е. процессов ферментации и очистки продукта. При этом необходимо было принимать во внимание появившиеся в ряде стран новые законодательные ограничения, касающиеся использования плазмидных штаммов в производстве продуктов для пищевой промышленности и медицины.

Для интеграции целевых генов в хромосому кишечной палочки в АО «АГРИ» проф. В.З. Ахвердяном с сотрудниками была оптимизирована их Мu-опосредованная транспозиция (Ахвердян и др., 2007; Саврасова и др., 2007). Используя этот метод, бывший ещё на стадии доработки, мы оптимизировали разработанную ранее совместно с проф. В.А. Лившицем стратегию получения продуцентов, усваивающих сахарозу. Содержащая сахарозу меласса – побочный продукт сахарного производства, является выгодным сырьём для микробиологической промышленности. Однако, этот признак является факультативным у энтеробактерий и лабораторные штаммы *E. coli*, исторически используемые в качестве платформ для получения продуцентов аминокислот, не росли на средах, содержащих сахарозу в качестве источника углерода.

Поворотным моментом для перехода к конструированию бесплазмидных продуцентов *E. coli* явилось внедрение в практику АО «АГРИ» технологий рекомбинационной инженерии. В частности, под руководством проф. С.В. Машко и при участии автора этой работы была модифицирована методика Даценко и Ваннера (Datsenko, Wanner, 2000), основанная на Red-зависимой системе гомологичной рекомбинации бактериофага  $\lambda$ .

К началу настоящей работы плазмидные продуценты *E. coli* могли накапливать более 50 г/л фенилаланина, т.е. до титров, значительно



превышающих растворимость этой аминокислоты в среде культивирования (~ 25 г/л). Для увеличения продуктивности штамма в этих условиях необходимо было активировать экспорт продукта из клетки. Здесь наши исследования, касающиеся потенциального экспортёра ароматических аминокислот YddG, явились продолжением работ проф. В.А. Лившица с сотрудниками, которые уже нашли потенциальные экспортёры различных аминокислот в кишечной палочке (*Aleshin et al.*, 1999; *Лившиц*, 2006).

Ауксотрофия по тирозину (Tyr<sup>-</sup>) и связанная с этим необходимостью добавлять его в ферментационную среду ставила себестоимость фенилаланина в прямую зависимость от себестоимости *L*-тирозина. В то же время, при использовании продуцента Tyr<sup>+</sup>, тирозин, накапливающийся в культуральной жидкости, затруднял очистку продукта. Необходима была стратегия получения продуцента со сниженным уровнем тирозина в качестве примеси.

При поиске узких мест в пути биосинтеза фенилаланина в *E. coli* мы обратили внимание на то обстоятельство, что хоризмат-синтазы (EC 4.2.3.5) бактерий и растений утратили флавин-восстанавливающий домен, в отличие от подобных ферментов из дрожжей и грибов.

Для получения фенилаланина использовался периодический процесс с подпиткой глюкозы, где основное накопление продукта происходило в стационарной фазе. Один из предшественников фенилаланина E4P являлся интермедиатом пентозофосфатного пути, в который направлялось менее трети углерода из глюкозы при росте клеток дикого штамма на этом субстрате. Поэтому стратегия, направленная на дальнейшее увеличение продукции, была нацелена на оптимизацию синтеза фенилаланина в стационарной фазе и снижение его накопления во время роста.

Разработанные в работе стратегии являлись составными частями комплексного процесса создания промышленного продуцента, отвечающего требованиям коммерчески выгодного технологического процесса получения продукта. Наши стратегии материализовались в форме прецезионных генетических модификаций хромосомы *E. coli*. Эти модификации получали в

лабораторных штаммах с известной первичной структурой, но с возможностью переноса в любой штамм кишечной палочки. Под системным конструированием мы понимаем создание продуцента с требуемыми свойствами с помощью комбинирования необходимых генетических модификаций.

Все исследования данной работы были проведены на некоммерческих штаммах, которые мы называли модельными продуцентами.

**Цель** исследований - разработка новых молекулярно-генетических подходов для конструирования бесплазмидного продуцента *L*-фенилаланина на основе *E. coli* с улучшенными технологическими свойствами.

В ходе работы решались следующие задачи:

- получение генетически стабильных штаммов *E. coli*, растущих на сахарозе;
- конструирование модельных продуцентов с помощью рекомбинационной инженерии;
- повышение устойчивости к синтезируемому продукту за счёт усиления его экспорта из клетки;
- получение продуцента *L*-фенилаланина  $\text{Tug}^+$ , не зависящего от тирозина и не накапливающего его в процессе ферментации;
- исследование достаточности восстановленного флавина для хоризматсинтазной реакции при продукции *L*-фенилаланина в *E. coli*;
- конструирование модельного продуцента с метаболической регуляцией синтеза *L*-фенилаланина.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

На основные результаты данной работы компания Аджиномото получила патенты, подтверждающие их приоритетность и практическую значимость.

Было показано, что кластер сахарозных генов *scr*, кодирующих ферменты утилизации сахарозы с транспортом, зависимым от фосфотрансферазной системы (PTS) бактерии, находится в составе

псевдотранспозона Tn2555, который неспособен перемещаться как единое целое. Предложен способ получения сахарозоположительных продуцентов с генетически детерминированной структурой, содержащих гены утилизации сахарозы в хромосоме. (Патент РФ 2212447 и его аналоги: EP 1149911; US 6960455; US 7179623).

Охарактеризован экспортер ароматических аминокислот YddG. Получены модификации хромосомы, которые были использованы в продуцентах ароматических аминокислот (Патент РФ 2222596 и его аналоги US 7666655; EP 1449918).

Разработан новый подход инактивации конкурирующего пути биосинтеза, основанный на протеолитической деградации продукта прецизионно сконструированного аллеля целевого гена. С использованием этого подхода был впервые получен продуцент *L*-фенилаланина *E. coli*, не нуждающийся в тирозине и не накапливающий его в процессе ферментации (Патент РФ 2264459 и его аналоги: US 9376695; FR 2922218; JP 5217850; US 9708637).

Впервые продемонстрировано использование гетерологичной хоризмат-синтазы для получения продукции фенилаланина штаммом *E. coli*.

Впервые показано использование промоторов Pho-регулона для повышения продукции аминокислот, в частности, фенилаланина (Патент РФ 2405040 и его аналоги: EP 1990416; US 8394612).

Большинство из разработанных подходов, исследованных или аналогичных генетических модификаций, было практически использовано автором и его коллегами при создании продуцентов фенилаланина на основе *E. coli*, внедрённых фирмой Аджиномото (Япония) в действующее мировое биотехнологическое производство.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации представлялись в отчётах и отчётных докладах в АО «АГРИ» и в Аджиномото (Япония) на протяжении ряда лет (2002-2013 гг.); на международной конференции по транспозиции (1987 г.) в Санта-Фе (США);

на IV Съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); Международной школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2008); на III международной конференции по прикладной микробиологии BioMicroWorld 2009 в Лиссабоне (Португалия), на школе-конференции, посвященной 50-летию Института ГосНИИГенетика (Пушино, 2018).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы, из которых 11 экспериментальных работ, две обзорные статьи, 10 патентов (без учёта их аналогов в разных странах).

### **Место проведения работы и благодарности**

Работа была выполнена в АО «АГРИ». Основные результаты были получены в период работы автора над проектом «Фенилаланин» (2000-2013 гг.), сначала в качестве ответственного исполнителя, а затем – руководителя проекта, который был приостановлен ввиду решения поставленных задач.

Автор искренне признателен всем соавторам своих публикаций. Особо хочется отметить сотрудников группы автора: Ларису Айрих, Ирину Цыренжапову и Анну Слесарёву. Автор благодарен своему первому научному руководителю Виталию Аркадьевичу Лившицу за длительное научное сотрудничество. Автор особо признателен своему научному консультанту Сергею Владимировичу Машко за дискуссии, стимулирующие написание этой работы.

**Личный вклад соискателя** состоял в формулировании целей и разработке стратегий исследования, планировании работы группы сотрудников, личном участии в лабораторных экспериментах, обобщении и интерпретации результатов.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из стандартных основных разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов,

заклучения и списка литературы, включающего 308 цитируемых источников. Работа изложена на 210 страницах, включая 46 рисунков и 28 таблиц.

### **Положения, выносимые на защиту**

- (1) Разработан способ получения продуцентов, усваивающих сахарозу, с помощью miniMu-интеграции кластера генов *scr* в хромосому *E. coli* и последующего картирования mini-Mu-*scr* инсерций методом обратной ПЦР.
- (2) С помощью рекомбинационной инженерии получены модельные продуценты гистидина и ароматических аминокислот, которые были спланированы на основе данных о пути биосинтеза и его регуляции.
- (3) Охарактеризован ген *yddG*, кодирующий белок цитоплазматической мембраны *E. coli*, искусственная сверхэкспрессия которого в хромосоме с использованием промотора  $P_L$ , увеличивала продукцию ароматических аминокислот в соответствующих модельных продуцентах.
- (4) С помощью С-концевого программируемого протеолиза подобран уровень активности хоризматмутазы/префенатдегидрогеназы, кодируемый геном *tyrA* *E. coli*, необходимый для роста продуцента *L*-фенилаланина и ограничивающий накопление *L*-тирозина в процессе ферментации.
- (5) С использованием модельных продуцентов фенилаланина с известной первичной структурой и двух типов хоризмат-синтаз исследована достаточность флавина в хоризматсинтазной реакции в условиях продукции *L*-фенилаланина.
- (6) Продемонстрирована метаболическая активация синтеза фенилаланина с помощью промоторов  $P_{pstS}$  и  $P_{phoA}$  генов Pho-регулона, обеспечивающего клеточный ответ на лимитацию по неорганическому фосфату ( $P_i$ ). Эти промоторы были использованы для контроля гена устойчивой к фенилаланину ДАНР-синтазы, которая дерепрессировала ароматический путь биосинтеза.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Системный подход к разработке продуцентов полезных соединений

Разработка промышленного штамма является комплексной задачей, которую в целом можно сформулировать, как инженерную оптимизацию клеточного метаболизма с учетом промышленных процессов ферментации и очистки продукта. Эту задачу можно концептуализировать как набор стратегий, нацеленных на решение определённых подзадач, примерный список которых представлен на Рисунке 1.1. Данная работа включает разработку стратегий для решения некоторых таких подзадач, нерешённых прежде.

Следующие главы «Обзора литературы», помимо общей информации о биосинтезе фенилаланина, содержат известные данные из специальных разделов научной информации, которые использовались в работе.

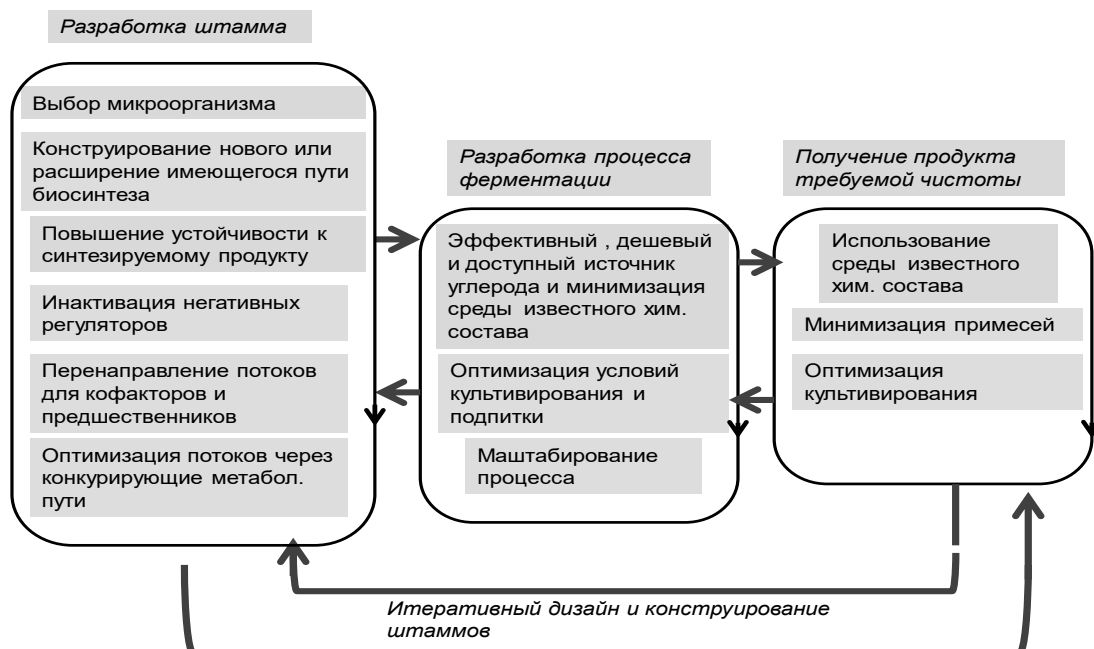


Рисунок 1.1 - Системная метаболическая инженерия продуцента биопродукта (по (Lee, Kim, 2015))

## 1.2. Биосинтез фенилаланина и принципы получения его сверхпродукции в *E. coli*

### 1.2.1. Цели и способы получения *L*-фенилаланина

Ароматическая аминокислота фенилаланин относится к незаменимым аминокислотам, поэтому входит в состав биодобавок и витаминов. Используется также в фармацевтическом производстве, в косметологии для усиления запаха (*Bongaerts et al.*, 2001). Однако, потребностью в крупномасштабном производстве Фен обязан аспартату (*L*-аспартил-*L*-фенилаланин метил), низкокалорийному подсластителю (в 200 раз слаще сахара), для производства которого используется ~ 70% производимого фенилаланина. В Таблице 1.1 перечислены известные методы получения фенилаланина, из которых микробная ферментация обладает серьезными преимуществами, заключающимися в высоком выходе биологически активного *L*-энтатомера фенилаланина при относительно низких затратах, а также безопасностью для окружающей среды.

Таблица 1.1 - Методы получения фенилаланина ( по (*Sprenger G. A.*, 2007))

Метод	Описание
Химический	Гидролиз белков Алкилирование аминмалонового эфира
Ферментативный	Аминирование циннамата/трансаминирование фенилпирувата
Микробиологический: биотрансформация	Из фенилапирувата и аспартата с помощью рекомбинантной <i>E. coli</i> , продуцирующей аминотрансферазу
Микробиологический: Микробная ферментация	Синтез из глюкозы и аммония в клетках штаммов-продуцентов <i>E. coli</i> , <i>C. glutamicum</i>

### 1.2.2. Биосинтез фенилаланина

Метаболическая инженерия продуцента Фен была основана на его биосинтезе из E4P и PEP. Биосинтез Фен, как и других ароматических аминокислот (AA), включает общий ароматический и специфичный для каждой аминокислоты путь. Способностью синтезировать AA: фенилаланин, тирозин, триптофан из источника углерода обладают микроорганизмы (бактерии, грибы, дрожжи), растения, некоторые простейшие (*Richards et al.*, 2006).

Биосинтез фенилаланина на биохимическом, генетическом и молекулярно-биологическом уровнях был наиболее полно охарактеризован у *E. coli* (*Pittard, Yang*, 2008). Биотехнологические задачи инициировали исследование синтеза AA у коринобактерий (*Ikeda*, 2006). Отсутствие синтеза AA у животных стимулировало его исследование у патогенных бактерий, например, для разработки нового поколения лекарственных препаратов против туберкулёза (*Rosado et al.*, 2013). К настоящему времени достигнут значительный прогресс в изучении ароматического биосинтеза у растений, где синтезу фенилаланина отводится особая роль (*Maeda, Dudareva*, 2012; *Qian et al.*, 2019). Наибольшее количество вторичных метаболитов у растений образуется из фенилаланина. Поток углерода на фенилаланин достигает 30% от всего фотосинтетически фиксированного углерода и увеличивается до 50% в стрессовых условиях (*Tohge et al.*, 2013). Обнаруженные особенности биосинтеза фенилаланина в растениях, такие как отсутствие ретроингибирования, множественность генов биосинтетического пути, были уже воспроизведены в продуцентах фенилаланина на основе *E. coli* (*Backman et al.*, 1990).

#### 1.2.2.1. Общий ароматический путь

Углеродный скелет AA образуется в общем ароматическом пути, называемым также путём шикимата, по первому идентифицированному



промежуточному продукту этого пути, который был найден в плодах японского звёздчатого аниса *shikimi* (Bohm, 1965).

Путь шикимата (Рисунок 1.2) начинается с конденсации E4P и PEP, продуктов центрального метаболизма и через семь реакций, консервативных у всех организмов, заканчивается образованием хоризмата.

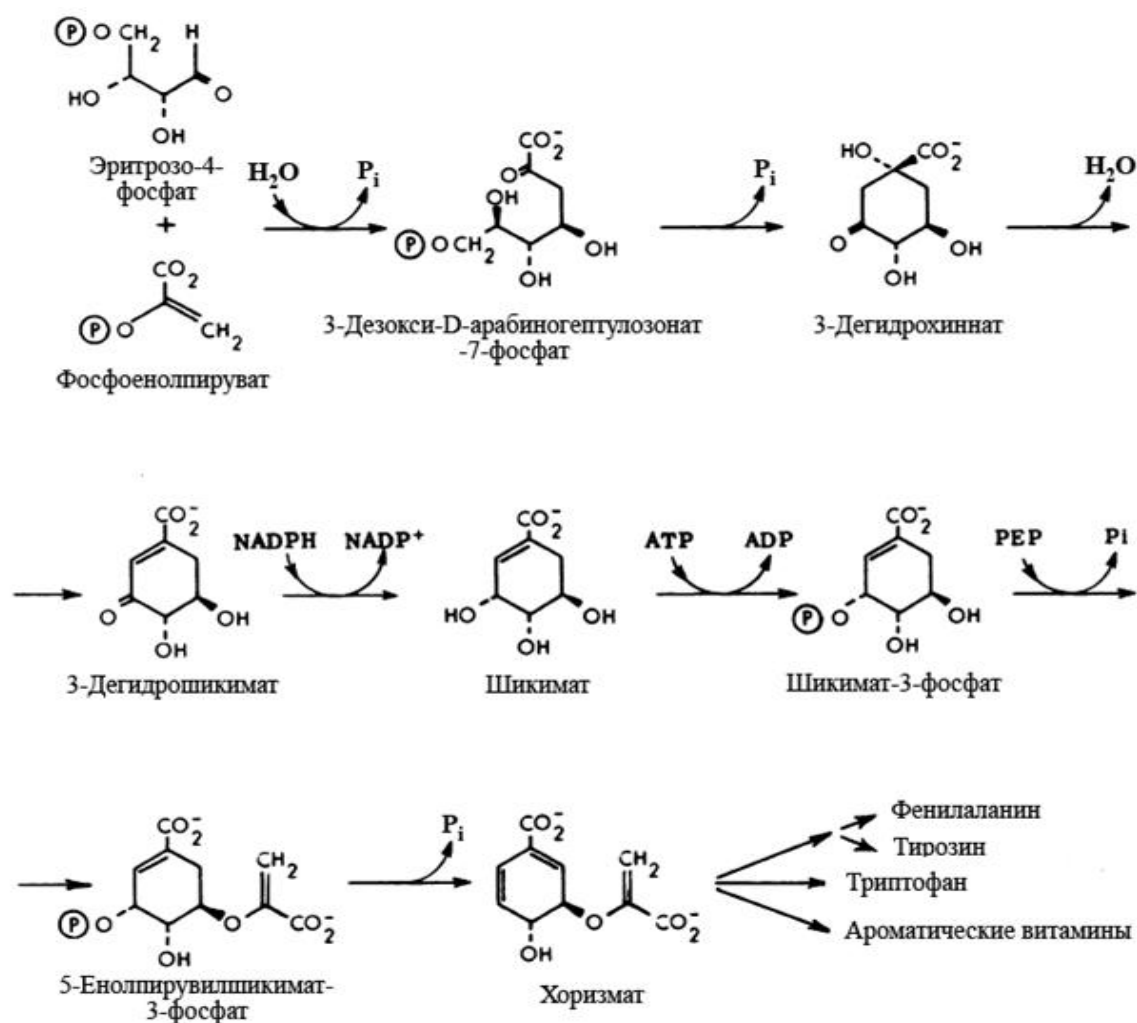


Рисунок 1.2 - Реакции общего ароматического пути

Все ферменты этого пути охарактеризованы биохимически (Таблица 1.2). Первый фермент общего ароматического пути, ДАНР-синтаза, направляет

поток углерода из центрального метаболизма и является критичным, как для осуществления природных функций, так и для метаболической инженерии продуцентов ароматических соединений. В большинстве исследованных организмов имеются два и более генов ДАНР-синтаз (*Pittard, Yang, 2008; Maeda, Dudareva, 2012; Tohge et al., 2013*). ДАНР-синтазы являются металлоферментами, нуждающимися для своей активности в двухвалентных металлах. По субъединичной структуре эти ферменты бывают димерами или тетрамерами (*Zhou et al., 2012*). Все полученные структуры мономеров ДАНР-синтаз содержат  $(\beta/\alpha)_8$  бочонок или ТИМ-баррель, названный по аналогичной структуре триозофосфатизомеразы, а также могут иметь дополнительные структурные элементы, участвующие, например, в аллостерической регуляции (*Hartmann et al., 2003*) (Рисунок 2.3).

ДАНР-синтазы из разных организмов были подразделены на два типа (I и II) на основании филогенетического анализа (*Walker et al., 1996*). Ферменты I типа имеют мол. м. менее 40 кД, ферменты II или растительного типа – более 50 кД. Гомология ферментов I и II составляет не более 10%. Ферменты I типа были в свою очередь подразделены на подтипы I $\alpha$  и I $\beta$  (*Jensen et al., 2002*).

У *E. coli* имеется три ДАНР-синтазы подтипа I $\alpha$ , которые ингибируются фенилаланином (AroG), тирозином (AroF) и триптофаном (AroH) (*Pittard, Yang, 2008*). Если первая ДАНР-синтаза функционирует в виде тетрамера, то остальные две – в димерной форме. Триптофановая ДАНР-синтаза *E. coli* является минорной по активности. В продуцентах фенилаланина использовали тирозиновую или мутатные варианты фенилаланиновой ДАНР-синтазы (*Bongaerts et al., 2001; Sprenger 2007*).

Ферменты 2-7 реакций пути шикимата (Таблица 1.2) за исключением шикимат киназы и дегидрошикимат дегидрогеназы уникальны в *E. coli* (*Pittard and Yang, 2008*). В других организмах они часто обозначаются сокращённо по названиям генов соответствующих ферментов *E. coli*. В растениях большинство

ферментов пути шикимата, как минимум, дублировано (Maeda, Dudareva, 2012).

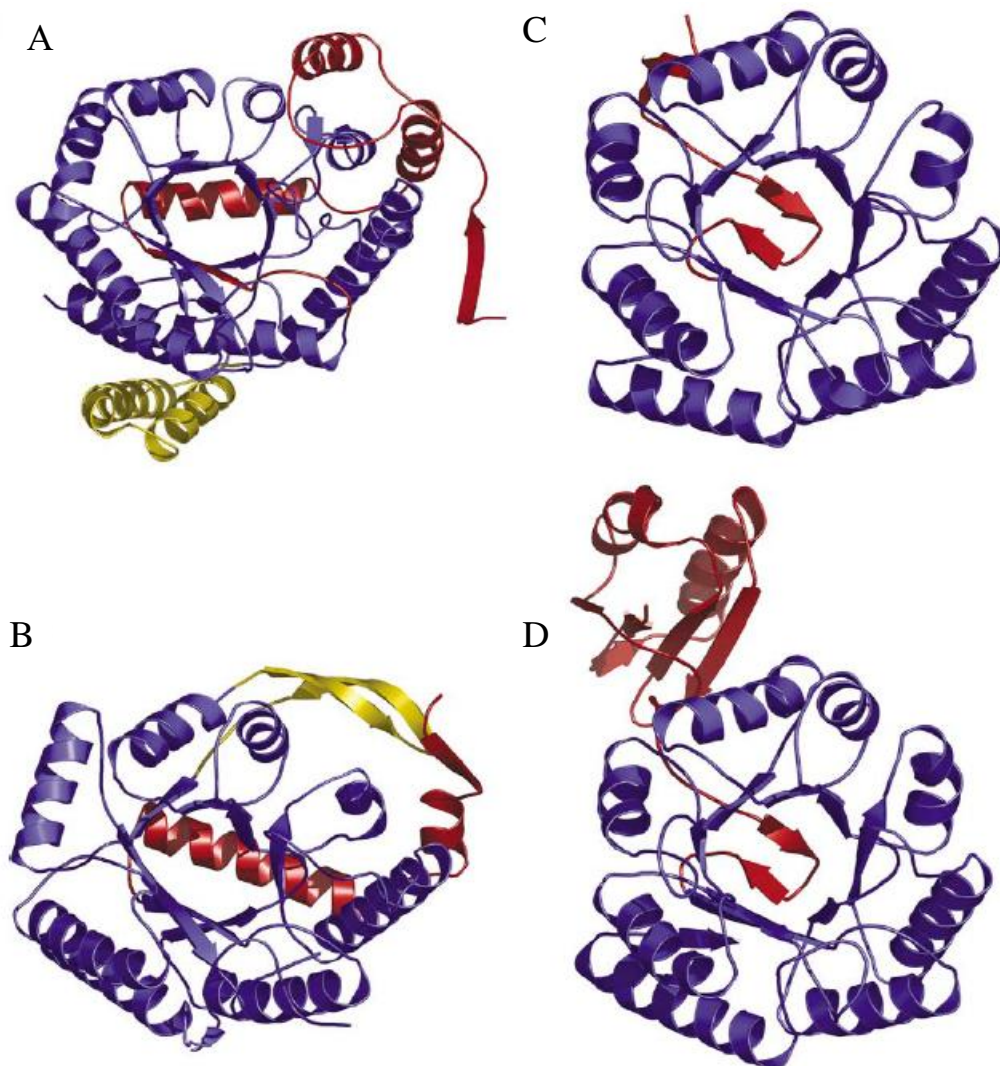


Рисунок 1.3 - Структуры мономеров ДАНР-синтаз I типа (А) и II типа (В–D)  
 А - ДАНР-синтаза из *M. tuberculosis*, ингибируется Фен и Три; В – *E. coli* AroG, ингибируемая Фен ( $I\alpha$ ); С - нерегулируемая из *Pyrococcus furiosus* ( $I\beta(1)$ ); D - ингибируемый Фен или Тир фермент из *Thermotoga maritima* ( $I\beta(2)$ ) . ТИМ-баррель показан синим цветом, дополнительные домены - желтым (N-концевые) и красным цветами (воспроизведено по (Webby et al., 2005)).

В физиологических условиях ферменты *E. coli* не ингибируются продуктами ароматического пути. При получении продуцентов ароматических соединений *E. coli* было сделано наблюдение об ингибировании AroB и AroE тирозином и шикиматом, соответственно, но механизм этого ингибирования не исследовался (Dell, Frost, 1993; Barker. Frost, 2001).

Две шикимат киназы *E. coli*, кодируемые генами *aroL* и *aroK*, отличаются константами Михаэлиса ( $K_m$ ) по отношению к шикимату: 200 мкМ и более 5 мМ соответственно (Pittard, Yang, 2008). Для получения ауксотрофии по ароматическим соединениям у *E. coli* необходимо инактивировать оба гена шикимат киназ (Keseler et al., 2017).

Шикимат дегидрогеназы *E. coli* различаются более существенно. Основной фермент кодируется геном *aroE*, при инактивации которого бактерия становится ароматическим ауксотрофом. Он катализирует NADPH-зависимое восстановление дегидрошикимата до шикимата. Другой фермент с расширенной специфичностью к кофакторам кодируется геном *ydiB*. Он может использовать  $NAD^+$  или  $NADP^+$ . В продуцентах обычно использовался AroE (Sprenger, 2007). Для максимизации окислительно-восстановительной мощности фермента предложено было использовать YdiB (Lütke-Eversloh et al., 2007).

Последняя реакция общего ароматического пути, заключающаяся в трансформации 5-енолпирувилшикимат-3-фосфата (EPSP) в хоризмовую кислоту, рассмотрена ниже в отдельном разделе, т.к. этой стадии биосинтеза в продуценте Фен было уделено внимание в нашей работе.

Кристаллические структуры ферментов пути шикимата разрешены, в основном, не для белков *E. coli* (RCSB protein data bank). Поскольку шикиматный путь обнаружен у патогенов, вызывающих малярию (*Plasmodium falciparum*), туберкулёз (*Mycobacterium tuberculosis*), провоцирующих онкологические заболевания (*Helicobacter pylori*), то кристаллические структуры используют для подбора новых химических соединений,

ингибирующих ферменты шикиматного пути у патогенных организмов (Gonza'lez-Bello, Castedo, 2007; Rosado et al., 2013). С этой же целью исследовались и молекулярные механизмы соответствующих реакций. В частности, оказалось, что два типа дегидрохиннат-дегидратаз осуществляют одну и ту же реакцию по различным механизмам (Gonza'lez-Bello, Castedo, 2007). Фермент I типа AroD, присутствующий в большинстве организмов, выполняет биосинтетическую функцию в пути шикимата. Фермент II типа, выделенный первоначально как катаболитный у грибов (Hawkins et al., 1993), может, как участвовать в утилизации хинната в качестве источника углерода, так и выполнять биосинтетическую функцию в *M. tuberculosis* и *H. Pylori* (Gonza'lez-Bello, Castedo, 2007). Фермент II типа термостабилен, в отличие от фермента I типа и, возможно, еще найдёт себе применение в биотехнологии. Гены, кодирующие ферменты пути шикимата, как правило, рассредоточены по геному. Большинство известных ферментов этого пути из разных организмов являются монофункциональными (Richards et al., 2006). У растений охарактеризован бифункциональный фермент, обладающий дегидроквиазной и шикимат-дегидрогеназной активностями, катализирующий третью и четвёртую реакции соответственно (Maeda, Dudareva, 2012). Известны бифункциональные ферменты, сочетающие одну активность общего ароматического пути и одну из активностей ниже хоризмата, например, DAHPS-СМ или EPSPS-TyrA (Таблица 2.3). ДАНР-синтазы DAHPS-СМ относятся к наиболее вариабельному типу I $\beta$  и содержат на N-конце домен хоризматмутаза (СМ) (Wu, Woodard, 2006). ДАНР-синтаза такого типа аллостерически ингибируется префенатом, который связывается с доменом СМ.

При сравнительном анализе специфических активностей ферментов общего ароматического пути оказалось, что наименьшие активности при росте *E. coli* на минимальной среде были у дегидрохиннат и хоризмат-синтаз, AroB и AroC соответственно (Tribe et al., 1976). После искусственного усиления

активности ДАНР-синтазы в *E. coli* становилась лимитирующей активностью AroB, а после её расширения становились лимитирующими реакции, катализируемые AroL, AroA, AroC (Frost et al., 1995). При получении продуцентов ароматических аминокислот распространённым стал подход, заключающийся в усилении всех генов ароматического пути (Backman et al., 1990; Juminaga et al., 2012). Эти гены клонировали на плазмидах по отдельности или группируя в искусственные транскрипционные единицы.

Для повышения каталитической эффективности общего ароматического пути представляет интерес пентафункциональный фермент AROM, обнаруженный в дрожжах и грибах и катализирующий пять реакций, со второй по шестую (Рисунок 2.2) общего ароматического пути (Duncan et al., 1987). Таким образом обеспечивается туннелирование субстрата (substrate channeling or tunneling) и повышается эффективность катализа. В настоящее время принцип туннелирования субстрата используется при инженерии метаболических путей и достигается с помощью искусственно создаваемых ферментных комплексов (Smirnoff, 2019). Недостатком фермента AROM является сниженная активность первого фермента, дигидрохиннат-синтазы (Lambert et al., 1985).

Таблица 1.2 - Ферменты общего ароматического пути (*Pittard, Yang, 2008; Maeda, Dudareva, 2012*)

№	Название	Номер ЕС	Гены <i>E. coli</i>	Кофакторы	Типы	Примеры регуляции	Доп. ссылки
1	3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфат (ДАНР) синтаза	4.1.2.15	<i>aroF</i> <i>aroG</i> <i>aroH</i>	Двухвал. ионы металлов, например, $Mn^{2+}/Co^{2+}$	Типы I, II; подтипы I $\alpha$ , I $\beta$ I $\alpha$ : бифункциональные ферменты (ДАНРС-СМ)	Репрессия АА, арогенатом, активация Три, окис.-восстанов. контр.	—
2	Дегидрохиннатсинтаза	4.2.3.4	<i>aroB</i>	$NAD^+$ , $Co^{2+}$	один	Ингибирование Три > 0.1 мМ	Barker & Frost, 2001
3	Дегидрохиннат-дегидратаза	4.2.1.10	<i>aroD</i>	—	биосинтетическая и катаболитная	—	Gonza'lez-Bello & Castedo, 2007
4	Шикиматдегидрогеназа Хиннат/шикимат дегидрогеназа	1.1.1.25 1.1.1.282	<i>aroE</i> <i>ydiB</i>	$NADPH$ или $NADH/NADPH$	два	Ингибирование шикиматом в продуценте	Dell & Frost, 1993
5	Шикиматкиназа	2.7.1.71	<i>aroL</i> <i>aroK</i>	$ATP, Mg^{2+}/Mn^{2+}$	один	Энергетическое состояние клетки	—
6	5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза	2.5.1.19	<i>aroA</i>	—	чувствительный и устойчивый к глифосату Известен бифункциональный фермент: EPSPS-ТурА	—	Song et al., 2005
7	Хоризмат-синтаза	4.2.3.5	<i>AroC</i>	$FMNH_2$	Би и моно-функциональные (восстан. $FMNH_2$ )	окислительно-восстанов. контроль	White et al., 1988

### 1.2.2.1a. Синтез хоризмовой кислоты

Хоризмат-синтаза катализирует 1,4-элиминацию 3-фосфатной группы и протона в 5-енолпирувилшикат-3-фосфате с образованием хоризмовой кислоты (рис. 2.2.3). Хоризмат-синтазам всех организмов требуется для осуществления своей активности восстановленный флавин FMNH<sub>2</sub> в активном центре (*Balasubramanian et al.*, 1990; *White et al.*, 1988). В этой реакции выделяют три стадии. Это перенос протона с FMNH<sub>2</sub> на каталитический остаток фермента, перенос протона с EPSP на FMNH<sup>-</sup> и элиминация фосфата из EPSP<sup>-</sup> (*Lawan et al.*, 2019). В целом, реакция не является окислительно-восстановительной.

Ферменты из дрожжей, грибов и простейших являются бифункциональными, т.е. способны сами восстанавливать FMN за счёт NADPH (*Ehammer et al.*, 2007; *Ely et al.*, 2008). Хоризмат-синтазы бактерий и растений – монофункциональные и теоретически их активности могут зависеть от окислительно-восстановительного потенциала клетки, т.к. восстановленный флавин является крайне нестабильным соединением.

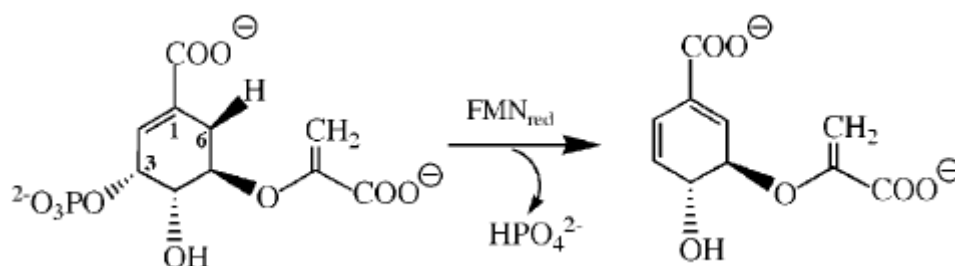


Рисунок 1.4 - Реакция, катализируемая хоризмат-синтазой



### 1.2.2.2. Специфичный для фенилаланина путь биосинтеза

Собственный путь синтеза фенилаланина начинается из хоризмовой кислоты. Из хоризмовой кислоты также образуются тирозин, триптофан, энтерохелин и ароматические витамины. У *E. coli* это фолиевая кислота (витамин B9), убихинон (коэнзим Q), менахинон (витамин K) (Pittard, Yang, 2008).

Если Три образуется из хоризмовой кислоты через шесть инвариантных у всех организмов реакций, то Фен и Тир могут синтезироваться из хоризмовой кислоты двумя способами (Рисунок 1.5). В *E. coli* присутствует биосинтез I, когда Фен и Тир образуются через фенилпировиноградную кислоту и 4-гидроксифенилпируват соответственно (Caspi et al., 2018). В растениях охарактеризован биосинтез II: Фен и Тир образуются через арогенат. Как показано на Рисунке 2.5, биосинтетические пути расходятся после префеновой кислоты, которая образуется из хоризмовой кислоты. Хоризмат-мутаза, катализирующая образование префената, конкурирует за хоризмат с ферментами других путей, расходящимися из хоризмата, и поэтому является стратегически важным ферментом для продуцентов фенилаланина и тирозина (Ikeda, 2006; Lütke-Evarsloh et al., 2007).

Хоризмат-мутазы в организмах, синтезирующих АА, различаются по структуре, функциональности и способам регуляции их активности (Romero et al., 1995; Li et al., 2009). Два типа хоризматмутаза выделены на основании анализа кристаллических структур: AroH и AroQ-подобные (Lee et al., 1995). Ферменты AroH-типа являются гомотримерами, представляющими собой три симметричных псевдо- $\alpha/\beta$ -барреля. Хоризмат-мутазы такого типа являются монофункциональными, нерегулируемыми и присутствуют, в основном, в грамположительных бактериях, относящихся к группе *Bacillus/Clostridia* (Helmstaedt et al., 2004).

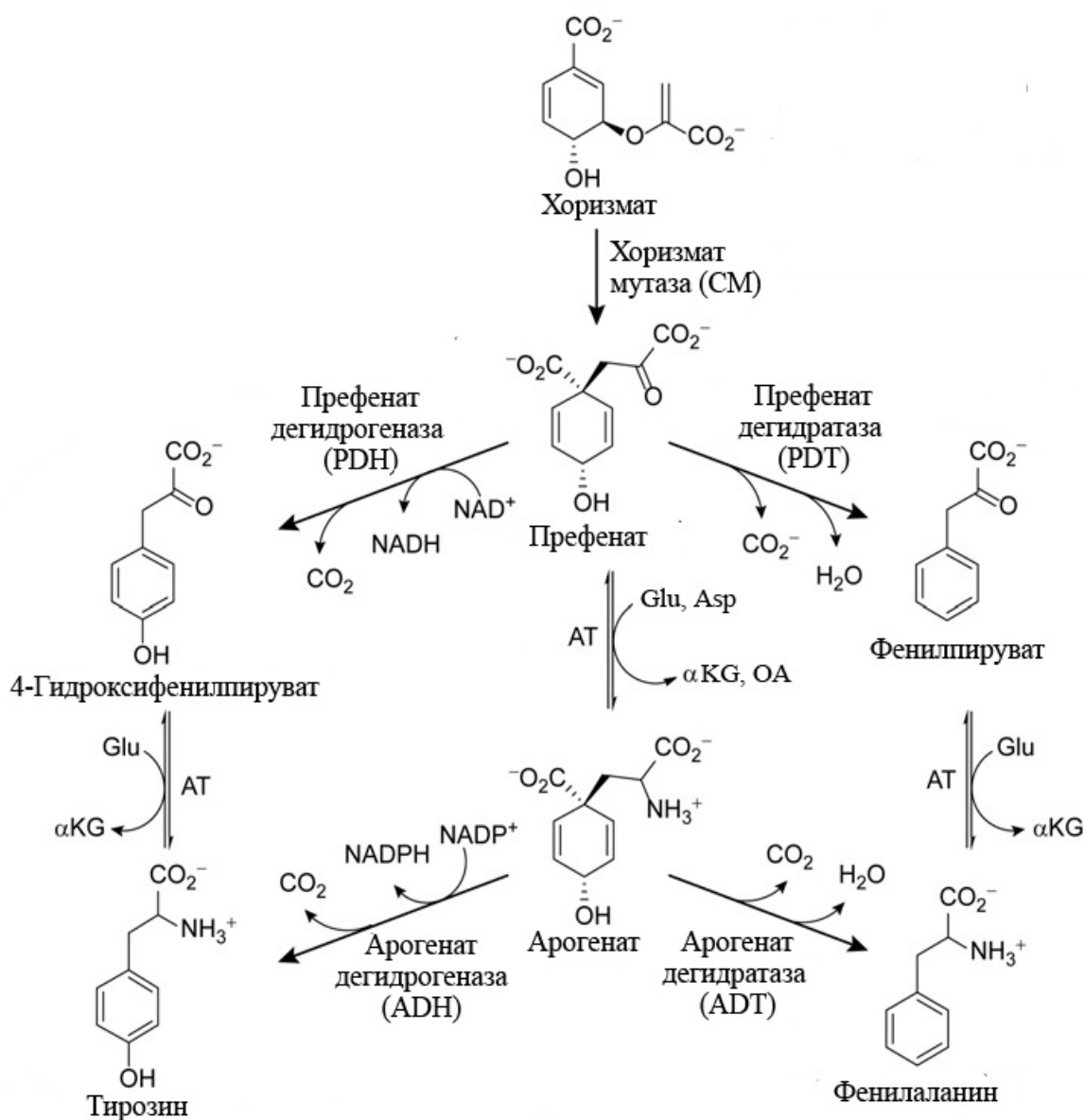


Рисунок 1.5 - Биосинтетические пути фенилаланина и тирозина

AT- аминотрансфераза.

Хоризмат-мутазы ArgQ-типа широко распространены в микроорганизмах. Структура таких ферментов полностью состоит из  $\alpha$ -спиралей. Они функционируют как гомодимеры. Большинство из них – монофункциональные, но встречаются и бифункциональные ферменты. Примерами последних являются бифункциональные ферменты *E. coli*, сочетающих хоризматмутазную и префенат-дегидратазную (Р-белок) или префенат-дегидрогеназную активности (Т-белок), а также уже упоминавшийся выше фермент *B. subtilis*,

имеющий хоризматмутаазную и ДАНР-синтаазную активности (*Romero et al.*, 1995).

Монофункциональные хоризмат-мутаазы подразделяются на нерегулируемые (например, у *C. glutamicum* (*Li et al.*, 2009)) и регулируемые (у низших эукариот): репрессуруемые тирозином и/или фенилаланином или активуруемые триптофаном (*Romero et al.*, 1995). Бифункциональные ферменты Р и Т ингибуруются по типу обратной связи фенилаланином и тирозином соответственно.

Нерегулируемая АА хоризмат-синтаза у *C. glutamicum* является аллостерическим регулятором одной из ДАНР-синтааз этой бактерии (*Li et al.*, 2009). СМ образует комплекс с ДАНР-синтаазой, активуру или репрессуру её в зависимости от отсутствия или присутствия префената в клетке.

Наличие различных путей биосинтеза фенилаланина определяется присутствием ферментов с префенат-дегидратаазной (PDT) или арогенат-дегидратаазной (ADT) активностями. PDT независимо от моно- или бифункциональности (Р-белки) имеют общий тип трехмерной структуры (*Kleeb et al.*, 2006). Реакция, катализуруемая PDT, может проходить спонтанно в кислых условиях. PDT ускоряет образование фенилпирувата более, чем в  $10^6$  раз (*Zhang et al.*, 1998) в результате необычного механизма. Геометрическое искажение префената в активном сайте фермента провоцирует согласование декарбоксилуирования и дегидратации (*Vleet et al.*, 2010).

Биосинтез Фен по типу II, в основном, происходит в растениях, а также в некоторых бактериях, способных обитать рядом. У *Pseudomonas aeruginosa* была идентифицирована циклогексадиенил дегидратаза (ген *pheC*), имеющая сродство как к префенату, так и к арогенату (*Zhao et al.*, 1992). Этот фермент выделяется в периплазму и, вероятно, участвует в утилизации арогената. Растения содержат несколько генов арогенатдегидратааз (*Cho et al.*, 2007). Для некоторых из них была показана также PDT активность. Недавно биосинтез Фен по типу I был охарактеризован в цветках *Petunia hybrida*, характеризующихся большим выделением летучих соединений, образующихся

из Фен (*Qian et al.*, 2019). Было показано, что основной синтез Фен по типу II происходит в пластидах. В неблагоприятных условиях индуцируется синтез Фен по типу I в цитозоле. Ферменты с PDT-активностью оказались изоформами ADT-белков. Первые отличались от вторых наличием N-концевого транзитного белка, ответственного за транспорт ADT-белков в пластиды.

### 1.2.3. Регуляция биосинтеза фенилаланина

Поток углерода в ароматический путь биосинтеза контролируется на посттранскрипционном и на транскрипционном уровнях. В бактериях эта регуляция зависит от внутриклеточного содержания АА, в растениях – от наличия вторичных метаболитов и общего стрессового статуса организма.

#### 1.2.3.1. Посттранскрипционная регуляция

У бактерий первые ферменты биосинтетического пути обычно регулируются по типу обратной связи, аллостерически, продуктами этого пути. Механизмы ингибирования фенилаланином и тирозином основных ДАНР-синтаз *E. coli* AroG и AroF были исследованы с помощью кристаллографических моделей их белков (*Shumilin et al.*, 2002; *Cui et al.*, 2019). Аминокислоты попадают в карман между субъединицами димеров, связываясь с а.о. антипараллельного  $\beta$ -листа (Met147, Pro150, Gln151, Ser180 для AroG и P148, Q152, S181, I213 для AroF) одного мономера и  $\beta$ -цепи (I10 для AroG и N8 для AroF) – другого. Конформационные изменения структуры димера после присоединения соответствующих аминокислот приводят к нарушению связывания с PEP у AroF и с PEP и E4P - у AroG. В результате изменения остатков, задействованных в связывании фенилаланина и тирозина, были получены устойчивые к ретроингибированию мутанты AroG и AroF соответственно (там же). AroG имеет тетрамерную структуру, но димер AroG, полученный с помощью единичных замен активен на 60-70% (*Shumilin et al.*, 2003). Предполагается, что тетрамерная форма AroG способствует более

высокой стабильности фермента, т.к. известно, что AroF нестабилен в стационарной фазе (Cui *et al.*, 2019).

Все арогенат- и префенатдегидратазы (моно и бифункциональные) имеют на С-конце регуляторный АСТ-домен, участвующий в аллостерической регуляции фенилаланином (Cho *et al.*, 2007). В Р-белках фенилаланином ингибируется не только активность PDT, но и активность СМ, правда, в два раза слабее, чем PDT (Pittard, Yang, 2008). Мутации в АСТ-доме хоризматмутаза/префенат-дегидратазы *E. coli*, снимающие ретроингибирование фермента были охарактеризованы (Nelms *et al.*, 1992).

Кристаллические структуры с фенилаланином для монофункциональных ферментов PDT из *Staphylococcus aureus* и *Chlorobium tepidum* разрешены (Tan *et al.*, 2008). Определен механизм аллостерической регуляции: фермент переходит в закрытый комплекс после попадания фенилаланина в карман между субъединицами димера.

### **1.2.3.2. Транскрипционная регуляция ароматического пути и синтеза фенилаланина в *E. coli***

В *E. coli*, как и в других родственных грамотрицательных бактериях, имеется общий ароматический регулятор TyrR. Он регулирует девять транскрипционных единиц, перечисленных в таблице 1.3 (Pittard, Yang, 2008).

Регуляция TyrR каждой из транскрипционных единиц уникальна. Предполагается, что во всех случаях транскрипционный контроль эволюционировал в направлении обеспечения физиологической роли белков данной транскрипционной единицы. Разнообразие транскрипционного контроля, осуществляемого TyrR, определяется как тонкими различиями в структуре TyrR боксов (TGТAAAN<sub>6</sub>ТТТАСА), так их локализацией, числом и, в некоторых случаях, взаимодействиями с другими транскрипционными факторами. Белок TyrR (57640 Да) в отсутствие эффекторов находится в гомодимерной форме. В такой форме он связывается с более строгими

(сильными) TyrR боксами и осуществляет независимую от кофакторов репрессию или активацию в присутствии отдельных АА (Таблица 1.3).

Эффекторами TyrR являются АТР, тирозин, фенилаланин и, в меньшей степени, триптофан. Основным эффектором тирозин, связываясь с TyrR в присутствии АТР, стимулирует образование гексамера, который соединяясь со «слабыми» TyrR боксами репрессирует транскрипцию или её активирует, в случае *folA*. Связывание с фенилаланином в присутствии АТР приводит к тому, что димеры TyrR, локализованные на сильных TyrR боксах, стимулируют соединение РНК-полимеразы или другого TyrR-димера с близлежащим слабым боксом. По структуре TyrR имеет три функциональных домена: аминоконцевой, ответственный за димеризацию и активацию, центральный, ответственный за связывание с АТР, тирозином, фенилаланином, и карбоксильный домен, ответственный за связывание с ДНК и димеризацию.

Как следует из таблицы 1.3, инактивация TyrR активирует гены ДАНР-синтазы (*aroF*, *aroG*), шикиматкиназы (*aroL*), аминотрансферазы (*tyrB*) и, таким образом, может положительно сказываться на продукции АА, если перечисленные гены находятся под регуляцией собственных промоторов.

Большинство генов общего ароматического пути в *E. coli* экспрессируется конститутивно. Регуляция, независимая от ароматических аминокислот, показана для гена *aroA*, кодирующего енолпирувилшикиматфосфат-синтазу. Этот ген располагается в одном опероне с геном *serC*, который находится под комплексной регуляцией Lrp и Ctr (*Pittard, Yang, 2008*).

Синтеза Фен из хоризмата в кишечной палочке контролируется на транскрипционном уровне. Экспрессия гена *pheA* регулируется с помощью аттенуации. Механизм аттенуации был впервые обнаружен у триптофанового оперона *E. coli* (*Yanofsky et al., 1981*). В настоящее время аттенуация, заключающаяся в преждевременной терминации транскрипции, классифицируется как разновидность РНК-зависимой регуляции у бактерий (*Naville, Gautheret, 2009*).

Таблица 1.3 - Гены *E. coli*, относящиеся к регулону TyrR, и их регуляция (Pittard *et al.*, 2005; Pittard, Yang, 2008)

Ген	Белок	Условия и уровень репрессии (—)/ активации (+)*	Изменение экспрессии в штамме $\Delta tyrR$
<i>aroF</i> , <i>tyrA</i>	ДАНР-синтаза, СМ/PDH	Без кофактора (—, 10x**); Тир (—, 10-20x)	↑
<i>aroG</i>	ДАНР-синтаза	Без кофактора (—), зависит от уровня TyrR в клетке	↑
<i>aroL</i>	Шикимат киназа	Без кофактора (—, 2x); Тир (—, 5x); Фен (—, 2x); Тир+Три (TrpR) (—↑)	↑ (x10)
<i>aroP</i>	Транспортёр АА	Тир (—); Фен (—); Три (—)	↑
<i>folA</i>	Дегидрофолат редуктаза	Тир (+, x2)	↓
<i>mtr</i>	Транспортёр Три	Фен (+); Тир (+)	↓
<i>tyrB</i>	Аминотрансфера за	МС (+); МС+Фен (—, 4x); МС+Тир (—, 3x)	↑
<i>tyrP</i>	Транспортёр Тир	Без кофактора (—, 3x); Тир (—, полная); Фен или Три без Тир (+)	↑ (без кофактора или без Тир)
<i>tyrR</i>	Регулятор транскрипции	Без кофактора (—), зависит от уровня TyrR в клетке	—

\* При росте штамма TyrR<sup>+</sup> на минимальной среде (МС).

\*\* Кратность изменения, где известно, указана в цифрах.

Аттенуаторами называют 5'-*cis* регуляторные элементы, образующие две альтернативные структуры РНК, одна из которых содержит Rho-независимый терминатор. Сенсорным элементом аттенуатора аминокислотного оперона является лидерный пептид, обогащённый кодонами соответствующей аминокислоты, в данном случае Фен.

На хромосоме *E. coli* фенилаланиновый оперон *pheL-pheA* граничит с транскрибирующимся ему навстречу тирозиновым опероном *aroF-tyrA* (Рисунок 1.6). Такое расположение оперонов, кодирующих ферменты, конкурирующие за предшественник метаболических путей, оказалось неслучайным. Эти опероны транскрибируются с возможностью подавления экспрессии друг друга посредством транскрипционной интерференции (Hudson, Davidson, 1984). Между генами *pheA* и *tyrA* располагается ПС из 42 нуклеотидов, функционирующая как двусторонний Rho-независимый терминатор, работающий с умеренной эффективностью. Таким образом, РНК-полимераза, прошедшая через терминатор, может препятствовать транскрипции противоположной нити.

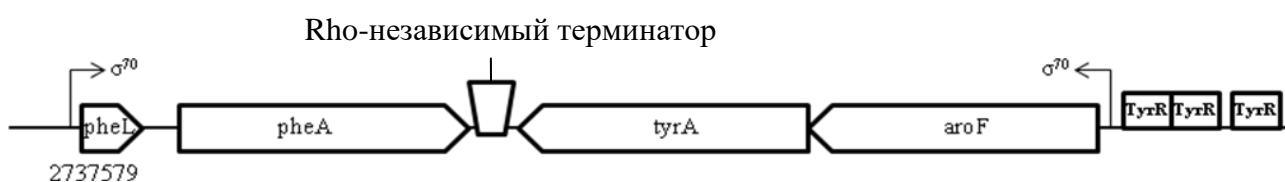


Рисунок 1.6 - Структура оперонов *pheL-pheA* и *aroF-tyrA* на хромосоме MG1655 (по (Keseler et al., 2017))



#### 1.2.4. Биосинтез эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата

Е4Р и РЕР, являющиеся предшественниками ароматических соединений, образуются при катаболизме сахаров в гликолизе, если под гликолизом понимать сумму всех биохимических реакций, в результате которых глюкоза превращается в пируват (Pyr) (*Stephanopoulos et al.*, 1998). Гликолиз в *E. coli* включает в себя: путь Эмдена-Мейергофа-Парнаса (EMP), пентозофосфатный путь (PPP) и Энтнера-Дудорова путь (EDP).

За образование Е4Р в *E. coli* отвечают ферменты PPP: транскетолаза и трансальдолаза (Рисунок 1.7). В растениях Е4Р, помимо PPP может образовываться в цикле Кальвина, но за его образование ответственны ферменты с похожими ферментативными активностями (*Maeda, Dudareva*, 2012). Интересно, что снижение транскетолазной активности в трансгенном табаке приводило к снижению синтеза АА и вторичных метаболитов из них (там же). Непосредственным источником РЕР является предпоследняя реакция пути EMP, катализируемая енолазой (Ено, см. рисунок 1.7). Помимо гликолиза РЕР входит в регуляторный узел: РЕР-пируват-оксалацетат, отвечающий за распределение потока углерода между катаболизмом, анаболизмом и энергоснабжением клетки (*Sauer, Eikmanns*, 2005). За образование РЕР в этом регуляторном блоке у *E. coli* отвечают РЕР-карбоксилаза (ген *pckA*) и РЕР-синтаза (ген *ppsA*), а за утилизацию РЕР – пируват киназы (гены *pykF*, *pykA*) и РЕР-карбоксилаза (Ppc, см. рисунок 1.7).

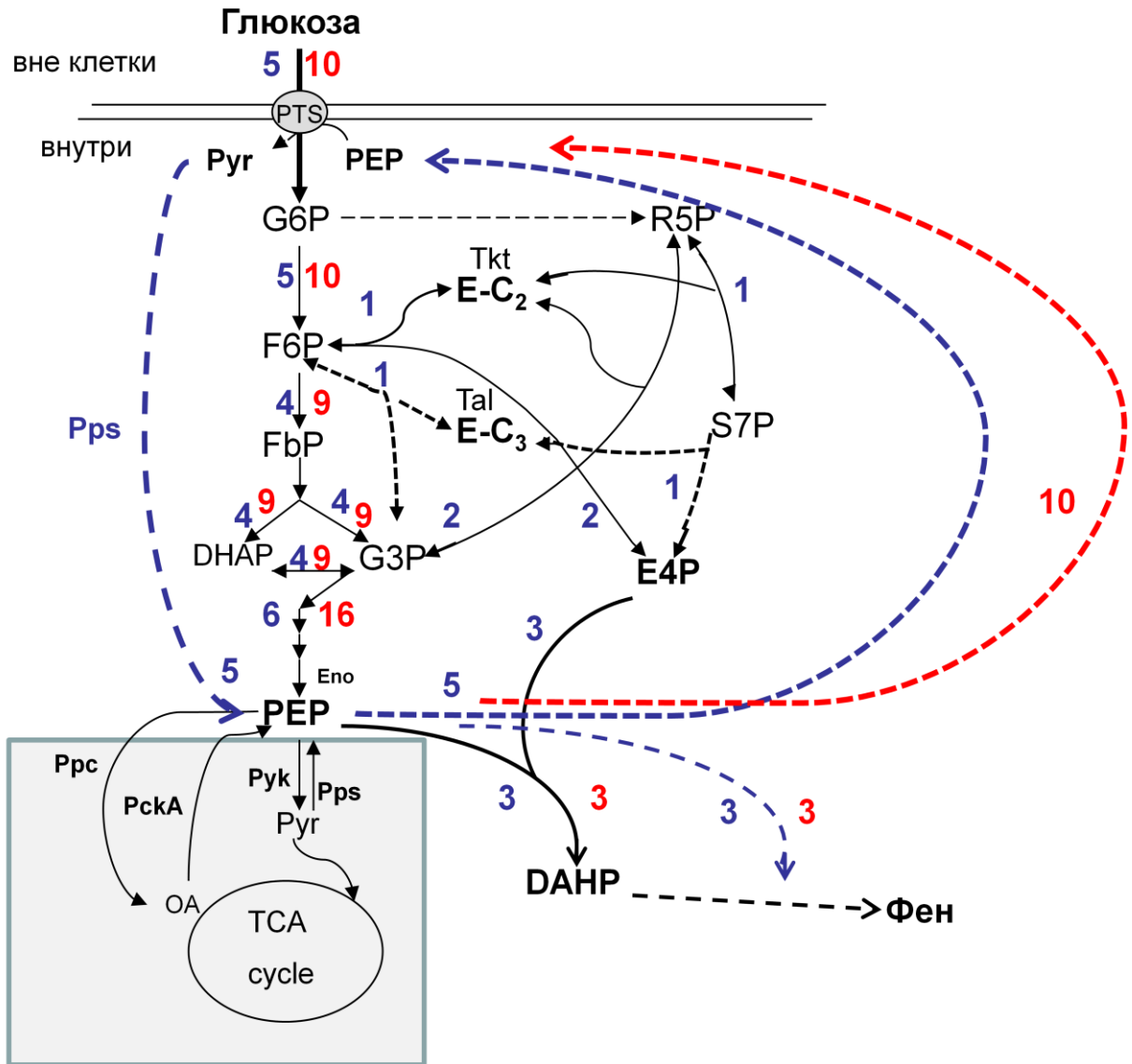


Рисунок 1.7 - Биосинтез E4P и PEP из глюкозы в *E. coli*.

Показаны реакционные пути для максимальной конверсии глюкозы в DAHP и Фен для штамма с активированной PEP-синтазой (Pps) и без неё (синим и красным цветом соответственно). Неоксидативная часть PPP показана в соответствии с установленным кинетическим механизмом типа пинг-понг для транскетотазы (Tkt) и трансальдозазы (Tal) (Kleijn *et al.*, 2005). DHAP – дигидроксиацетонофосфат; FbP – фруктозо-1,6-дифосфат; F6P – фруктозо-6-фосфат; G3P – глицеральдегид-3-фосфат; G6P – глюкозо-6-фосфат; OA – оксалоацетат; S7P – седоксигептулозо-7-фосфат; TCA cycle – цикл трикарбоновых кислот. Рибулоза-5-фосфат, рибоза-5-фосфат, ксилоза-5-фосфат

## 1.2.5. Метаболическая инженерия продуцента фенилаланина *E. coli*

### 1.2.5.1. Инженерия центрального метаболизма

Метаболическая инженерия оперирует понятиями метаболических путей и потоков метаболитов по этим путям (*Stephanopoulos et al.*, 1998). Метаболический путь образования Фен из Е4Р и РЕР образуется из реакций, представленных на рисунках 1.2 и 1.5, и стехиометрически представляется следующим образом:

$2 \text{PEP} + \text{E4P} + 2\text{NADPH} + \text{ATP} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{Phe} + \text{CO}_2 + 2\text{NADP} + \text{ADP} + 4 \text{Pi}$ , где учтена реакция образования глутаминовой кислоты из  $\alpha$ -глутаровой кислоты и аммония:  $\alpha\text{-кетоглутарат} + \text{NH}_3 + \text{NADPH} \rightarrow \text{глутамат} + \text{NADP}$ .

При стехиометрическом анализе синтеза РЕР и Е4Р и образовании ДАНР из глюкозы в клетках *E. coli* было сделано два основных вывода (*Patnaik, Liao*, 1994). Во-первых, максимальный теоретический выход ДАНР достигается при использовании неоксидативной части PPP для синтеза Е4Р, поскольку в оксидативной части PPP происходит потеря углерода в результате выделения  $\text{CO}_2$ . Во-вторых, расход РЕР, происходящий при транспорте глюкозы в клетки кишечной палочки с помощью PTS, существенно снижает выход ДАНР из глюкозы.

Одним из способов снижения затрат РЕР на транспорт глюкозы является переход на транспорт глюкозы, независимый от РЕР (*Chen et al.*, 1997). Другой способ – активация РЕР-синтазы, транскрипция гена которой репрессируется при росте на глюкозе. На Рисунке 1.7 представлен расчет выхода Фен из глюкозы с учетом и без РЕР-синтазы, которые составляют 0,3 и 0,6 моль/моль соответственно.

### 1.2.5.2. Основные подходы получения продуцента фенилаланина

Кишечная палочка была выбрана для производства фенилаланина, как с точки зрения быстрого роста на простых питательных средах, так и с точки зрения наиболее совершенных технологий изменения генетических свойств

(Backman *et al.*, 1990). Работы по получению продуцентов Фен были проанализированы в нашем обзоре (Дорошенко *и др.*, 2014). В итоге были определены основные стратегии конструирования продуцента Фен, которые суммированы в Таблице 1.4.

Таблица 1.4 - Основные стратегии получения продуцента L-Фен *E. coli*

	Стратегия	Ген. мод-ция/описание	Ссылка
Усиление пути биосинтеза	Инактивация конкур. пути биосинтеза	$\Delta tyrA$	<i>Sprenger, 2007.</i>
	Десенсбилизация биосинтеза Фен из хоризмовой кислоты	$pheA^{FBR}$ /мутации в АСТ-домене	<i>Nelms et al., 1992.</i>
	Инактивация транскрип. контроля	$\Delta tyrR$ /усиление экспрессии генов <i>aroF, aroG, aroL, tyrB</i>	<i>Choi, Tribe, 1982; Pittard, Yang, 2008.</i>
	Усиление потока углерода в аром. путь биосинтеза	<i>aroF</i> или $aroG^{FBR}$ / усиление ДАНР-синтазы, нечув. к Фен	<i>Ikeda, 2006; Sprenger, 2007.</i>
	Устранение лимитирующих стадий биосинтеза пути шикимата	<i>aroB, aroD, aroL, aroE, aroA, aroC</i> / усиление экспрессии	<i>Backman et al., 1990; Dell, Frost, 1993.</i>
Инженерия центрального метаболизма	Усиление синтеза Е4Р	<i>tktA</i> /усиление экспрессии	<i>Bongaerts et al. 2001; Ikeda, 2006; Sprenger, 2007.</i>
	Увеличение пула PEP	<i>ppsA</i> /активация PEP-синтазы  $\Delta ptsHIcrr, galP^+, glk^+$ использование независимого от PEP транспорта глюкозы (PTS <sup>-</sup> Glc <sup>+</sup> )	<i>Patnaik, Liao, 1994; Gosset, 2005.</i>

### **1.3. Признак утилизации сахарозы в энтеробактериях и его введение в штаммы *E. coli*, не растущие на сахарозе**

Сахароза, происходящая из отходов сахарного производства (меласса) или отходов сахарного тростника (багасса), является дешёвым сырьём для микробиологического производства. Кроме того, процесс получения сахарозы (из сахарного тростника) считается экологически более сбалансированным, чем получение глюкозы гидролизом кукурузного крахмала (*Renouf et al.*, 2008).

#### **1.3.1. Факультативность признака утилизации сахарозы**

Утилизация сахарозы относится к факультативным признакам у бактерий рода *Enterobacteriaceae*. Сахарозоположительными являются большинство штаммов *Klebsiella* spp. (90%), примерно половина природных изолятов *E. coli* и около 10% штаммов *Salmonella* (*Bergey, Holt*, 1994).

Сахароза, благодаря её обилию в тканях высших растений, является самым распространённым дисахаридом окружающей среды, вторичной среды обитания энтеробактерий. Во вторичную среду обитания они попадают с фекалиями из нижнего отдела желудочно-кишечного тракта теплокровных животных, являющегося их основной средой. Наличие признака  $Suc^+$  может давать преимущества энтеробактериям в окружающей среде (*Méric et al.*, 2013).

#### **1.3.2. Мобильность кластеров сахарозных генов *scr* и *csc***

Нестабильные генетические признаки бактерий часто кодируются генами, находящимися в составе перемещающихся элементов, к которым относятся плазмиды и транспозоны. На хромосоме факультативные признаки локализуются в участках, которые высоко вариабельны среди штаммов и видов. В энтеробактериях обнаружено два типа кластеров сахарозных генетических детерминантов, обозначенных как *scr* и *csc*.

Первый охарактеризованный кластер генов *scr* был обнаружен в составе конъюгативной плазмиды pUR400, выделенной из *Salmonella typhimurium*. Позже аналогичные гены нашли в составе плазмиды из *Salmonella thomson*

(*Cowan et al.*, 1991) и конъюгативного транспозона CTnscr94, также обнаруженного в сальмонеллах (*Hochhut et al.*, 1997). Эти мобильные генетические элементы  $Suc^+$  переносились и поддерживались в штаммах *E. coli* K-12, в клетках которых сахарозные генетические детерминанты исследовались. Кластер генов *scr* у другого представителя энтеробактерий *K. pneumoniae* присутствовал в хромосоме (*Titgemeyer et al.*, 1996). Их высокая степень идентичности (более 90%) с генами *scr* из плазмиды pUR400 позволяла предполагать происхождение последних из первых.

Кластер генов *csc* (сокращение от *chromosomally encoded sucrose catabolism*) был впервые обнаружен в штамме *E. coli* EC3132 (*Bockmann et al.*, 1992), позже - в *E. coli* W (*Archer et al.*, 2011; *Sabrl et al.*, 2013). Оба штамма были выделены из верхнего слоя почвы, т.е. из вторичной среды обитания кишечной палочки. Кластер *csc* был интегрирован в хромосому с образованием делеции части *dsd*-оперона. Это являлось причиной генотипического исключения генов утилизации сахарозы и D-серина в некоторых штаммах *E. coli*  $Suc^+$  дикого типа (*Alaeddinoglu, Charles*, 1979).

Механизмы перемещения генов утилизации сахарозы были достаточно разнообразные. Между бактериями гены *scr* могли распространяться с помощью конъюгации. Между репликонами гены *scr* могли мигрировать с помощью транспозиции. Из штамма *E. coli* дикого типа была выделена плазида, содержащая сахарозный транспозон Tn2555 (*Лившиц и др.*, 1982; *Дорошенко*, 1988).

Предположительно гены *csc* были встроены в хромосому с помощью сайт-специфического механизма, характерного для фагоподобных элементов (*Jahreis et al.*, 2002). Позже в энтеропатогенных штаммах *E. coli* были обнаружены гены *scr*, интегрированные в межгенную область *ugcE – ugcF*, содержащую *iap* последовательности или «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами» (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) (*Trevico-Quintanilla et al.*, 2007; *Díez-Villaseñor et al.*, 2010). Гены *scr* из CRISPR -локуса отличались от генов *scr* из плазмиды

pUR400 (гомология <90%) и являлись свидетельством участия CRISPR в процессах, не связанных с иммунитетом.

### 1.3.3. Утилизация сахарозы в энтеробактериях

Для утилизации сахарозы, состоящей из моносахаридов  $\alpha$ -глюкозы и  $\beta$ -фруктозы, необходимо транспортировать её внутрь клетки и обеспечить расщепление гликозидной связи, соединяющей моносахариды (Рисунок 1.8, А).

Кластер генов *scr* обеспечивает PTS-зависимый транспорт сахарозы, сопровождающийся её фосфорилированием, расщепление сахарозо-6-фосфата на глюкозо-6-фосфат и фруктозу, а также фосфорилирование последней (*Schmid et al.*, 1982, 1988). Этот кластер состоит из пяти генов *scrKYABR* (Рисунок 1.8, Б), кодирующих фруктокиназу, сахарозный порин, транспортный белок  $EP^{scr}$ , взаимодействующий с фосфотрансферазной системой хозяина, сахарозо-6-фосфат гидролазу и транскрипционный регулятор LacI-типа, соответственно. Гены *scrKYABR* находятся в составе трёх транскрипционных единиц: *scrK*, *scrYAB* и *scrR* (*Cowan et al.*, 1991; *Jahreis, Lengeler*, 1993). Репрессор ScrR, ген которого экспрессируется конститутивно, подавляет экспрессию двух других оперонов в отсутствие сахарозы. Однако, индуктором ScrR является не сахароза, а внутриклеточный продукт её расщепления D-фруктоза, а также D-фруктоза-1-фосфат (*Jahreis, Lengeler*, 1993).

Кластер генов *csc* обеспечивает PTS-независимый транспорт сахарозы, который происходит с помощью специфического протонного симпортёра CscB (*Bockmann et al.*, 1992). Попадающая в клетки сахароза расщепляется гликозилгидролазой CscA на глюкозу и фруктозу. Фосфорилирование последней обеспечивает фруктокиназа CscK.

Кластер генов *cscKBAR*, где *cscR* кодирует репрессор LacI-типа, включает четыре транскрипционные единицы *cscKB*, *cscA* и *cscR*, как показано на рисунке 1.8, Б. Индуктором CscR является сахароза (*Jahreis et al.*, 2002).

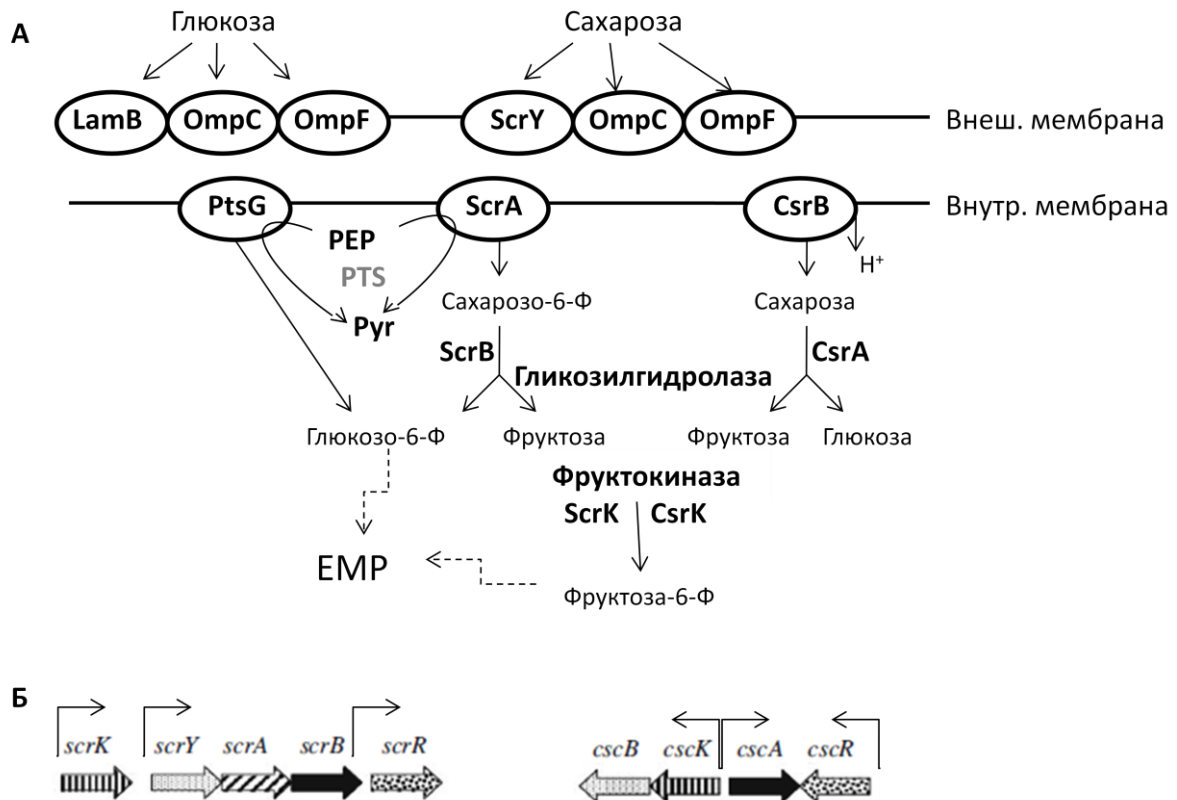


Рисунок 1.8 - Транспорт и катаболизм сахарозы в энтеробактериях (А) и кластеры генов, отвечающих за этот признак (Б)

(А) Показаны порины внешней мембраны, через которые проходит сахароза, а также специфические транспортёры внутренней мембраны. Для сравнения представлен транспорт глюкозы.

(Б) Гены *scrR* и *cscR* кодируют транскрипционные репрессоры LacI-типа. Функции ферментов, кодируемых другими генами *scr* и *csc*, показаны на рис. А. Кривыми стрелками обозначены промоторы.

В отличие от локуса *scr* детерминанты *csc* практически не поддерживали рост клеток на среде с сахарозой в качестве единственного источника углерода при концентрациях последней меньше 0,2 % (5 мМ). Причиной этого свойства являлась низкая активность пермеазы CscB и, соответственно, низкий базальный уровень этого фермента, который был недостаточен для индукции оперона. Такой вывод был сделан на основе анализа адаптационных мутантов, растущих при низкой концентрации сахарозы. Мутации, увеличивающие



транспортную активность пермеазы, были отобраны в гене *cscB*. Мутации в репрессоре CscR приводили к конститутивной экспрессии оперона *cscKBA*, а мутации в операторном участке промотора оперона делали его индуцированным при низких концентрациях сахарозы.

При концентрации сахарозы 20 г/л рост штамма *E. coli* W практически не отличался от роста этого штамма на среде с глюкозой (Arifin *et al.*, 2014).

Особенностью сахарозогликозилгидролазы CscA являлась её способность выходить в периплазму. Поэтому для придания штамму сахарозоположительного фенотипа достаточно было генов *cscBA* (Sabri *et al.*, 2013) или только *cscA* ((Lee *et al.*, 2010). В последнем случае, клетки росли на сахарозе после продолжительной лаг-фазы. Сахароза расщеплялась на глюкозу и фруктозу в периплазме. Оба сахара утилизировались посредством своих катаболических путей.

#### **1.3.4. Перенос генов утилизации сахарозы в штаммы *E. coli* Suc<sup>-</sup>**

Преимущества сахарозы, по сравнению с глюкозой, как сырья для получения аминокислот, помимо стоимости и доступности, заключались в дисахаридной структуре этого углевода. Предполагалось, что при утилизации сахарозы с помощью PTS-системы происходит экономия фосфоенолпирувата и может увеличиваться выход аминокислоты (Лившиц, 2006). Это могло быть особенно актуально, когда фосфоенолпируват использовался для образования углеродного скелета аминокислоты. Например, для ароматических аминокислот, синтезирующихся из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата, а также аминокислот, имеющих в качестве предшественника оксалацетат, образующийся из фосфоенолпирувата в результате карбоксилазной реакции. С этой точки зрения транспорт сахарозы, не зависящий от фосфоенолпирувата, должен был быть более благоприятен для продукции аминокислот, имеющих это соединение в качестве предшественника. Однако, продукция тирозина штаммом *E. coli* *csc* была ниже на среде, содержащей сахарозу в качестве источника углерода, чем на среде с глюкозой (Olson *et al.*, 2007). Факт

снижения продукции на сахарозе объяснялся низкоэффективной пермиазой CscB (там же).

Другая точка зрения на использование PTS-зависимого транспорта сахара была основана на расчетах изменений энергии Гиббса при фосфолировании глюкозы с помощью PTS или посредством гексокиназы (*Ould-Moulaye et al.*, 1999). Реакция с использованием PTS была термодинамически более выгодной. Поэтому для получения продукции на сахарозе предложили использовать сахарозогликозилгидролазу или  $\beta$ -фруктофуранозидазу, способную выходить в периплазму (*Lee et al.*, 2010). Авторы цитируемой работы установили, что фермент из *Mannheimia succiniciproducens* обладает более высокой активностью и способствует более быстрому росту на сахарозе штаммов *E. coli* K12, чем CscA из *E. coli* W.

Получение Suc<sup>+</sup>-продуцентов *E. coli*, сконструированных на основе лабораторных штаммов, не растущих на сахарозе, неоднократно рассматривалось в литературе (*Tsunekawa et al.*, 1992; *Olson et al.* 2007; *Lee et al.*, 2010; *Bruschi et al.*, 2012; *Mohamed et al.*, 2019). Во всех случаях использовался кластер генов *csc* и исследовалась возможность ускорения роста штаммов на среде с сахарозой. Кластер генов *csc* мог быть более привлекателен для использования в силу его хромосомной локализации, хотя перенести гены *csc* из хромосом штаммов *E. coli* дикого типа EC3132 или W было непросто. Эти штаммы были устойчивы к фагу P1, который обычно использовался для переноса хромосомных генов из одного штамма в другой с помощью общей трансдукции (*Bockmann et al.*, 1992). Первоначально гены *csc* из EC3132 переносили в *E. coli* K-12 с помощью конъюгации, либо после получения чувствительных к P1 мутантов.

Позже гены *cscAKB* из хромосомы *E. coli* W были клонированы на интеграционном векторе и интегрированы в хромосомы *E. coli* B, C, K-12 MG1655 вместо гена *lacZ* (*Bruschi et al.*, 2012). Для контроля такую же интеграцию осуществили в хромосому *E. coli* W  $\Delta cscRAKB$ . Штаммы *E. coli* W  $\Delta cscRAKB\Delta lacZ:: cscAKB$ , *E. coli* B $\Delta lacZ:: cscAKB$ ; *E. coli* C $\Delta lacZ:: cscAKB$  не

отличались по скорости роста на минимальных средах с глюкозой и сахарозой в качестве единственного источника углерода, тогда как MG1655 $\Delta$ lacZ::cscAKB рос на сахарозе медленнее, чем на глюкозе. Рост последнего штамма на глюкозе происходил также медленнее, чем *E. coli* В, С, W. Частичная ауксотрофия по пиримидинам, присущая MG1655 за счёт сниженной экспрессии гена *pyrE*, могла быть причиной более медленного роста этого штамма на минимальных средах с глюкозой или сахарозой в качестве единственного источника углерода (Бирюкова и др., 2010). Действительно, при проведении лабораторной эволюции штамма MG1655 cscAKB на среде с сахарозой были отобраны мутации, восстанавливающие экспрессию гена *pyrE* (Mohamed et al., 2019).

Различия в утилизации глюкозы и сахарозы в клетках *E. coli* W были выявлены в ходе сравнительного анализа потоков углерода (Arifin et al., 2014). В частности, было обнаружено снижение потока углерода через окислительную часть пентозофосфатного пути при росте на сахарозе по сравнению с глюкозой, что должно было приводить к снижению синтеза предшественника пиримидинов, фосфорибозилпирофосфата.

Исторически во ВНИИГенетика продуценты аминокислот получали на штаммах *E. coli* К-12, не растущих на сахарозе. Первым продуцентом аминокислот *E. coli*, утилизирующим сахарозу, был продуцент треонина (Лившиц и др., 1980). Источником признака Suc<sup>+</sup> являлся транспозон Tn2555. Tn2555 обеспечивал быстрый рост штаммов на сахарозе, не отличимый от роста на средах с глюкозой, поэтому мог быть использован в качестве генетической модификации. Первичная характеристика сахарозного транспозона Tn2555 была проведена (Дорошенко, 1988). В частности, было установлено, что транспозон обладает вариабельной структурой. Поэтому получение стабильных интеграций генов *scr* в хромосому оставалось насущной задачей.

## 1.4. Повышение устойчивости к синтезируемому продукту за счёт активации его экспорта из клетки

В настоящее время сформировалось устойчивое представление о том, что в продуценте любого соединения его активный экспорт из клетки является неотъемлемой частью искусственно создаваемого расширенного пути биосинтеза (Ливиниц, 2006; Jones et al., 2015). Отчасти это представление сложилось на основании опыта получения продуцентов аминокислот на основе *C. glutamicum* и *E. coli*.

### 1.4.1. Идентификация экспортёров аминокислот у бактерий

Несмотря на то, что экскреция аминокислот, в частности, глутаминовой кислоты, из клеток *C. glutamicum* была обнаружена на заре современной биотехнологии (Kinoshita et al., 1957), изучением её механизма не занимались достаточно долго, предполагая, что в штаммах-продуцентах эффлюкс аминокислот происходит самопроизвольно. Существование активного транспорта аминокислот из клеток *C. glutamicum* первоначально было показано биохимическими и биофизическими методами. Секреция лизина и изолейцина из клеток этой бактерии зависела от электрохимического потенциала, а глутаминовой кислоты нет. Эффлюкс последней провоцировался физическими изменениями мембраны (Krämer, 1994).

Идентификация первого экспортёра лизина (LysE) у *C. glutamicum* проводилась по следующей схеме (Vrljic et al., 1996). Был отобран мутант *lysE*<sup>-</sup>, неспособный экспортировать лизин. В клетках этого мутанта клонировали генетический локус, ответственный за экскрецию лизина.

Штамм *lysE*<sup>-</sup> не рос в присутствии 1 mM Lys-Ala. В дальнейшем, метод контр-селекции на средах с ди-пептидами, содержащими остатки треонина или изолейцина, использовался для поиска индуцированных транспозонным мутагенезом инсерций в гены экспортёров этих аминокислот (Eggeling, Sahm, 2003). Были идентифицированы переносчик треонина ThrE и двухкомпонентный переносчик разветвлённых аминокислот BrnFE.

Амплификация генов экспортёров *lysE*, *thrE*, *brnFE* на плаزمидах приводила к усиленной экскреции соответствующих аминокислот, а их инактивация – либо к полному прекращению экскреции (лизин, изолейцин), либо к её снижению (треонин) (Wachi, 2013).

Позже был идентифицирован механочувствительный канал NCgl1221, необходимый для экскреции глутаминовой кислоты у *C. glutamicum* (Nakamura et al., 2007; Wachi, 2013; Becker et al., 2013).

Одним из первооткрывателей экспортёров аминокислот *E. coli* был В.А. Лившиц. Мутация *rhtA23*, придающая клеткам *E. coli* устойчивость к предшественнику треонина гомосерину и треонину, была отобрана В.А. Лившицем в 70-ые годы прошлого столетия. *rhtA23* позволила достичь накопления треонина свыше 100 г/л (Debabov, 2003). Эта мутация, как оказалось впоследствии, активировала экспрессию экспортёра гомосерина и треонина RhtA (Livshits et al., 2003).

В.А. Лившиц совместно с В.В. Алёшиным и Н.П. Закатаевой разработали комплексный подход к идентификации экспортёров аминокислот *E. coli*. В экспериментах по клонированию *rhtA23* методом shortgun с селекцией на чашках с гомосерином, был отобран локус, кодирующий экспортёр гомосерина и треонина названный RhtB (Zakataeva et al., 1999). С помощью биоинформатических подходов было установлено, что RhtB является удалённым гомологом LysE из *C. glutamicum* (Aleshin et al., 1999). Родственные RhtB и LysE белки были идентифицированы в различных бактериях, что позволило выделить два семейства RhtB и LysE. Позже идентифицированный RhtA был отнесен к другому обширному семейству мембранных белков (Livshits et al., 2003). Поиск экспортёров аминокислот у кишечной палочки проводили среди идентифицированных паралогов RhtA и RhtB (Лившиц, 2006). Для этого соответствующие гены клонировали на плазмиде и плазмидные штаммы проверяли на устойчивости к аминокислотам и их аналогам. Среди паралогов RhtA были найдены возможные экспортёры AA YdeA и YddG, а среди паралогов RhtB - экспортёр лейцина YeaS (Kutukova et al., 2005a). При

проверке на устойчивости к аминокислотам и их аналогам было установлено, что экспортеры могут обладать широкой специфичностью, но иметь предпочтение к определенным метаболитам. Так, мутация *rhtA23* повышала устойчивость клеток *E. coli* к L-пролину (в пять раз), L-гистидину (в четыре раза), L-цистеину (в три раза). При этом устойчивость к гомосерину возрастала в 100 раз, а к треонину – более чем в три раза (*Livshits et al.*, 2003). Ген *rhtB*, клонированный на плазмиде, повышал устойчивость клеток к гомосерину (в восемь раз), гомосеринлактону (более чем в 10 раз), к L-треонину (в 1,5 раза).

Экспортёры цистеина YdeD и YfiK, являющиеся паралогами RhtA и RhtB соответственно, были идентифицированы по их положительному влиянию на продукцию цистеина в *E. coli* в независимых исследованиях (*Daßler et al.*, 2000; *Franke et al.* 2003).

Цистеин (а также глутатион) экспортирует гетеродимерный ABC-транспортёр CydDC, который необходим для поддержания окислительно-восстановительного баланса в клетках *E. coli* (*Holyoake et al.*, 2016).

Ямада с соав. (*Yamada et al.*, 2006) протестировали 33 экспортера лекарственной устойчивости *E. coli* на способность повышать устойчивость к экзогенному цистеину в штамме  $\Delta tnaA$  с инактивированной триптофаназой, которая деградирует L-цистеин. Восемь экспортеров были отобраны. Среди этих экспортеров Vcr, относящийся к MFS-семейству, характеризовался наивысшей скоростью экспорта L-цистеина.

Экспортёр аланина YgaW (AlaE) *E. coli* был отобран с помощью shotgun в специально полученном мутанте *E. coli*, гиперчувствительном к дипептиду Ala-Ala (*Hori et al.*, 2011).

Функционально охарактеризованные экспортеры аминокислот *E. coli* и *S. glutamicum* представлены в Таблице 1.5.

Сравнительно недавно круг промышленно значимых организмов дополнился *Pantoea ananatis* (*Hara et al.*, 2012). У этой бактерии был

идентифицирован экспортер цистеина, относящийся к LysE семейству (Takumi, Nonaka, 2016).

Таблица 1.5 - Некоторые экспортёры аминокислот *E. coli* и *C. glutamicum*

Семейство/ТС	Экспортёр	Субстраты	Хозяин	Ссылка
AlaE/ 2.A.104.1.1	AlaE (YgaW)	Ала	<i>E. coli</i>	Hori et al., 2011
LysE / 2.A.75.1.2	ArgO (YggA)	Арг, канаванин	<i>E. coli</i>	Nandineni, Gowrishankar, 2004
MFS/ 2.A.1.2.7	Bcr	Цис	<i>E. coli</i>	Yamada et al., 2006
LIV-E /2.A.78.1.2	BrnFE	Иле, Лей, Вал, Мет	<i>C. glutamicum</i>	Trötschel et al., 2005
ABC/ 3.A.1.129.1	CydDC	Цис, глутатион	<i>E. coli</i>	Pittman et al., 2002
RhtB/ 2.A.76.1.5	LeuE (YeaS)	Лей	<i>E. coli</i>	Kutukova et al., 2005
LysE /2.A.75.1.1	LysE	Лиз, Арг	<i>C. glutamicum</i>	Vrljic et al., 1996
DME/2.A.7.3.6	RhtA	Тре, гомосерин	<i>E. coli</i>	Livshits et al., 2003
RhtB/ 2.A.76.1.1	RhtB	гомосерин, гомосеринлактон	<i>E. coli</i>	Zakataeva et al., 1999
RhrB/ 2.A.76.1.2	RhtC	Тре	<i>E. coli</i>	Zakataeva et al., 1999
ThrE/ 2.A.79.1.1	ThrE	Тре, Сер	<i>C. glutamicum</i>	Eggeling, Sahm, 2003
DME/2.A.7.3.2	YdeD	О-ацетилсерин, Цис, Асп, Глн	<i>E. coli</i>	Dassler et al., 2000; Franke et al. 2003.
ArAA/P-E / 2.A.7.17.2	YddG	Фен, Тир, Три	<i>E. coli</i>	Данная работа
RhtB/ 2.A.76.1.4	YfiK	Цис	<i>E. coli</i>	Franke et al. 2003.
LIV-E/ 2.A.78.1.3	YgaZH	Вал, Иле	<i>E. coli</i>	Park, Lee, 2010
MscS/1.A.23.2.1	YggB (NCgl1221)	Глу	<i>C. glutamicum</i>	Becker et al., 2013

### 1.4.2. Общая характеристика экспортёров аминокислот

Экспортёры аминокислот бактерий относятся к интегральным мембранным белкам (ИМБ), которые в норме составляют 20-30% от всех белков организма (*Daley et al.*, 2005; *Facey, Kuhn*, 2010).

В общепринятой базе данных транспортных белков «Transporter Classification Database» (<http://www.tcdb.org>), созданной и редактируемой группой М. Сайера (*Saier et al.*, 2016), транспортные белки были классифицированы согласно механизму их функционирования (источнику энергии) на пять основных групп. Как видно из Таблицы 1.5, большинство известных экспортёров аминокислот зависят от электрохимического потенциала (группа 2). Исключение составляют CysDC и YggB. Первый использует энергию АТФ (группа 3). Вторым является каналом (группа 1), через который происходит диффузия глутаминовой кислоты. В этой базе мембранных белков LysE и RhtB-семейства были объединены в LysE-суперсемейство, а RhtA-подобные экспортёры были отнесены к DMT (drug/metabolite transporter)-суперсемейству.

Экспорт *L*-лизина посредством  $2H^+$ -антипорта, был показан для LysE из *C. glutamicum* (*Bröer, Krämer*, 1991a, 1991b). Для этого экспортёра по отношению к *L*-лизину были определены  $K_m \sim 20$  мМ и  $V_{max} \sim 12$  нмоль/мин х мг (сух. кл). Другие экспортёры аминокислот не исследовались так детально, отчасти из-за методологических аспектов, связанных с точностью определения внутриклеточной концентрации аминокислоты (*Krämer*, 1994).

Зависимость экспорта аминокислот от протонодвижущей силы была показана для экспортёров *C. glutamicum* ThrE (*Palmieri et al.*, 1996) и BrnFE (*Hermann, Krämer*, 1996), экспортёров *E. coli* RhtA (*Livshits et al.*, 2003), LeuE (*Kutukova et al.*, 2005a), AlaE (*Kim et al.*, 2015).

### 1.4.3. Регуляция экспортёров аминокислот и их физиологические функции

Аминокислоты являются ценными метаболитами, из которых, прежде всего, синтезируются белки. Поэтому экспорт аминокислот, зависимый в



большинстве случаев также и от метаболически получаемой энергии, должен служить определенным целям. Действительно, гены экспортеров аминокислот экспрессируются на очень низком уровне и тонко регулируются. Экспрессия генов некоторых экспортеров *E. coli*: *leuE* (Kutukova et al., 2005a), *argO* (Peeters et al., 2009), *rhtB*, *rhtC* (Kutukova et al., 2005b), *ygaZH* (Park et al., 2007) и *alaE* (Ihara et al., 2017) регулируется глобальным регулятором Lrp. Известно, что Lrp является глобальным регулятором метаболизма и его эффекторами являются L-лейцин и L-аланин (Berthiaume et al., 2004). Однако, круг эффекторов Lrp может быть шире. Недавно появились данные, что Lrp «чувствует» избыток цистеина и активирует экспрессию *alaE* (Korshunov et al., 2020).

*argO* в *E. coli*, помимо Lrp, активируется своим регулятором ArgP (Peeters et al., 2009), также как *lysE* в *C. glutamicum* - LysG в присутствии L-аргинина и L-лизина соответственно (Bellmann et al., 2001). ArgO экспортирует L-лизин, если ген *argO* экспрессируется конститутивно (Pathania, Sardesai, 2015).

Еще в самом начале исследований активного транспорта аминокислот из клеток *C. glutamicum*, было сделано предположение, что специализированные экспортеры аминокислот являются предохранительными клапанами, которые открываются, чтобы избежать накопления метаболитов до токсичных уровней (Krämer, 1994). Аминокислоты могут накапливаться в бактериальных клетках, растущих на средах, богатых дипептидами, что использовалось, как при изучении экспортеров аминокислот в коринобактериях, так и в *E. coli*, например, при характеристике AlaE (Hori et al., 2011).

Метаболиты могут начинать накапливаться в клетке, попадающей в неблагоприятные условия. Кратковременные накопления Глу и Асп, Ала фиксировались при росте кишечной палочки на минимальной среде M9 с глицерином перед переходом в стационарную фазу (Park et al., 2003).

В биоплёнках патогенной *E. coli* было зафиксировано кратковременное накопление валина, которое объяснили адаптацией к условиям пониженного

кислорода при избытке глюкозы (*Valle et al.*, 2008). На среде с глицерином в качестве источника углерода или в условиях лимитации по глюкозе валин не накапливался.

Экспортеры цистеина *E. coli* YfiK и YdeD, относящиеся к разным семействам (табл. 2.4.1), имеют различное сродство к цистеину. YfiK, в отличие от YdeA, экспортирует *L*-цистеин и *O*-ацетил-серин только из клеток, накапливающих эти соединения и, вероятно, является метаболическим клапаном, предохраняющим клетку от токсичных концентраций *L*-цистеина и метаболитов его пути биосинтеза (*Franke et al.*, 2003).

YdeD активируется в ответ на добавление перекиси и, вероятно, необходим для поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки (*Ohtsu et al.*, 2010). *E. coli* экспортирует *L*-цистеин в периплазму в ответ на оксидативный стресс и затем импортирует его окисленный продукт *L*-цистин, с которым в периплазме связывается белок FliY. Гипотеза по поводу функционирования YdeD при окислительном стрессе близка к функции другого экспортёра цистеина/глутатиона *E. coli* CydDC, упоминавшегося выше.

Экскреция глутаминовой кислоты из клеток *C. glutamicum* происходит через механочувствительный канал типа MscS (*Becker et al.*, 2013). Механочувствительные каналы MscS *E. coli* и *C. glutamicum* функционируют в аварийной ситуации гипоосмотического стресса для поддержания гомеостаза.

Предположение о том, что экспортеры метаболитов могут быть задействованы в социальном поведении бактерий, было высказано в связи с обнаружением устойчивости к гомосеринлактону у клеток *E. coli*, содержащей плазмиду с геном *rhtB* (*Aleshin et al.*, 1999; *Zakataeva et al.*, 1999). В другой работе на основании экспериментальных данных предположили участие глицина в качестве сигнальной молекулой при образовании скоплений клеток кишечной палочки в искусственно созданных углублениях поверхности (*Park et al.*, 2003).

#### 1.4.4. Структурно-функциональный анализ экспортеров аминокислот

Все вышеописанные экспортеры аминокислот являются политопическими, т.е. содержат несколько трансмембранных сегментов (ТМС) (Blobel, 1980). ТМС предсказывают на основании графика гидрофобности по Кайт и Дулиттлу (Kyte, Doolittle, 1982). ТМС белков цитоплазматической мембраны (20-40 аминокислот) имеют структуру  $\alpha$ -спирали. Из-за гидрофобности и амфифильности ИМБ их наработка, очистка, биохимический анализ и получение структур были затруднены. Для таких белков практиковали определение топологии в мембране с помощью конструирования гибридных белков, т.е. исследуемого белка с белками, активности которых тестировались либо в периплазме, либо в цитоплазме. С помощью гибридных белков CydD-PhoA, CydC-PhoA и CydD-LacZ, CydC-LacZ была, например, определена топология субъединиц экспортёра CydCD (Cruz-Ramos et al., 2004), которая совпала с предсказанной *in silico* (Krogh et al., 2001). Для ArgO из *E. coli* экспериментальное картирование ТМС позволило уточнить топологию этого белка в мембране и сделать вывод о наличии 5 ТМС вместо шести предсказанных (Pathania et al., 2016). С помощью мутационного анализа белков AroO и AlaE было установлено, что в экспорте целевых аминокислот задействованы консервативные заряженные а.о., располагающиеся внутри ТМ сегментов (Pathania et al., 2016; Kim et al., 2017).

Для экспортеров LysE (~ 200 а.о.) и DMT-суперсемейств (~ 300 а.о.) характерно наличие 5 – 6 и 10 ТМ сегментов соответственно (Jack et al., 2001; Tsu, Saier, 2015). Предполагается, что белки DMT-суперсемейства могли образоваться в результате дупликации генов, кодирующих белки, имеющих пять ТМ сегментов (Jack et al., 2001). DMT-суперсемейство представляет собой обширную группу транспортных белков, включающую более 30 семейств с представительством в эукариотах, бактериях и археях. Эти белки выполняют различные функции, например, экспортируют конъюгаты нуклеотид-сахар к

аппарату Гольджи и эндоплазматическому ретикулуму эукариотических клеток (*Ishida, Kawakita, 2004*).

На сегодняшний день экспортёр YddG, относящийся к DMT-суперсемейству и первоначально исследованный нашей группой, является одним из самых структурно-исследованных белков этого семейства (*Stansfeld, 2017*). Получена трёхмерная модель YddG, основанная на кристаллической структуре его гомолога (*Tsuchiya et al., 2016*). Использовался, так называемый, коэволюционный подход (*Stansfeld, 2017*). А именно, с помощью флюоресцентной гель-фильтрации (*Kawate, Gouaux, 2006*) был подобран отдалённый гомолог YddG (28% идент. а.о.) из *Starkeya novella*, пригодный для получения кристаллической структуры. Кристаллическая структура переносчика, открытого со стороны периплазмы была разрешена и использована для моделирования его полной структуры и механизма функционирования YddG (Рисунок 1.9).

Структура YddG имела форму корзины, состоящей из 10 ТМ сегментов внутри которой находилась большая полость для субстрата, сформированная из шести ТМ сегментов. Внутри этих ТМ сегментов было идентифицировано более 10 консервативных гидрофобных и гидрофильных а.о., которые могли обеспечивать гидрофобное и гидрофильное окружение для связывания субстратов.

С помощью протеолипосом было показано, что YddG, как из *S. Novella*, так и из *E. coli* обладал широкой субстратспецифичностью (*Tsuchiya et al., 2016*). Он транспортировал Тре, Мет, Лиз, Глу. Однако, АА не подходили для таких экспериментов из-за их относительно низкой растворимости.

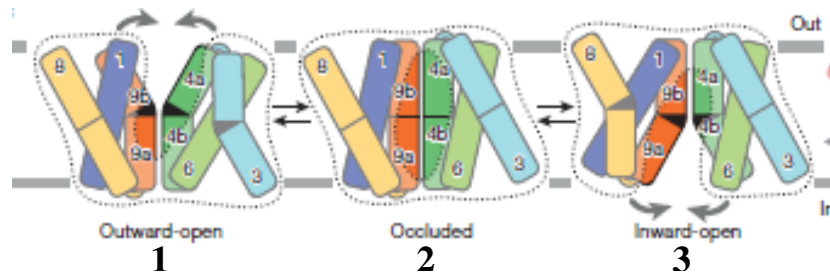


Рисунок 1.9 - Схема движения ТМ сегментов (пронумерованы) YddG из *S. novella* во время транспорта субстрата (по (Tsuchiya et al., 2016))

1- переносчик открыт в периплазму; 2 – переносчик закрыт; 3 – переносчик открыт в цитоплазму.

## 1.5. Характеристика регуляторных систем *E. coli*, элементы которых использовались в работе

Конструирование продуцентов осуществляется на основе предварительно выбранной или разработанной модели синтеза продукта (*Tyo et al.*, 2010). Эта модель включает биосинтетический путь, который необходимо оптимально активировать (или создать), и конкурирующие пути, которые необходимо инактивировать или ослабить.

Разработка методов регуляции экспрессии целевых генов началась одновременно с появлением технологии рекомбинантной ДНК (*Backman, Ptashne*, 1978). Эти методы были основаны, прежде всего, на исследованиях процессов транскрипции и трансляции в *E. coli*. Разрабатываемые способы конститутивной сверхэкспрессии целевых генов часто приводили к метаболическому дисбалансу и снижению продуктивности (*Sugimoto et al.*, 1987). После чего стали искать пути оптимизации экспрессии целевых генов. В частности, стали получать линейки конститутивных промоторов разной силы. Появились библиотеки охарактеризованных элементов транскрипции (*Biobricks*, например), с помощью которых стало возможным варьировать экспрессию отдельных генов биосинтетического пути, создавая искусственные экспрессионные единицы на плаزمиде в *E. coli* (*Shetty et al.*, 2008; *Tyo et al.*, 2010). Разные уровни конститутивной экспрессии получали, в том числе, и посредством мутагенеза существующих промоторов с последующей характеристикой полученной библиотеки промоторов (*Alper et al.*, 2005).

В дополнение к конститутивным промоторам разрабатывались системы регулируемой экспрессии. Подобно диверсификации на основе мутаций, используемой для создания конститутивных промоторов, в *E. coli* были созданы библиотеки промоторов, чувствительных к тетрациклину и лактозе с измененными характеристиками ответа на их индукторы (*Ellis et al.*, 2009).

Фармер и Ляо (*Farmer, Liao*, 2000) впервые продемонстрировали использование метаболической регуляции для экспрессии ферментов во время

ферментации. На основе глобальной регуляторной системы Ntr *E. coli* был сконструирован искусственный регуляторный цикл. Продукция лейкопина стимулировалась с помощью естественного метаболита, ацетилфосфата, образующегося в результате избыточного потока углерода через гликолиз.

Для метаболической регуляции биосинтеза фенилаланина могла представлять интерес система клеточного ответа на лимитацию по неорганическому фосфату. Например, для продуцента фенилаланина, культивируемого в хеостате, лимитация по  $P_i$  оказалась наиболее продуктивной, по сравнению с исследованными лимитациями по калию, магнию, сере (Park, Rogers, 1986). Было показано, что синтез фенилаланина при ограничении роста биомассы по  $P_i$  в хеостате мог продолжаться в течение 14 дней.

### **1.5.1. Индукция клеточного ответа на лимитацию по неорганическому фосфору**

#### **1.5.1.1. Гомеостаз $P_i$**

Неорганический фосфат ( $PO_4^{-3}$ ) абсолютно необходим для жизнедеятельности любого организма. Он присутствует в гидрофильных окончаниях амфипатических липидов, входящих в состав клеточных мембран.  $P_i$  является частью структурной основы ДНК и РНК. Фосфоангидридные связи между фосфатами АТФ или других нуклеотидов являются энергетической валютой клетки. Биохимические активности многих белков регулируются с помощью фосфорилирования специфических аминокислот – гистидина и аспарагиновой кислоты в бактериях, а также серина, треонина, тирозина.

Избыточный  $P_i$  токсичен для клетки, поэтому внутриклеточный пул  $P_i$  поддерживается на оптимальном уровне, и для кишечной палочки он составляет 1 – 10 мМ (McCleary, 2016).

$P_i$  ассимилируется в биологические молекулы посредством синтеза АТФ из ADP и  $P_i$ . Согласно современной модели гомеостаза  $P_i$  в *E. coli* (Рисунок 1.10) внутриклеточные концентрации  $P_i$  регулируются системами импорта/экспорта,

более тонко доводятся с помощью образования/деградации полифосфата, являющегося хранилищем избыточного Pi в клетке. Кроме того, клетки *E. coli* используют систему сенсорной трансдукции PhoBR, которая отслеживает уровни внеклеточного Pi (< 4 мкМ), чтобы контролировать экспрессию генов для «добычи» Pi в условиях его лимитации (Wanner, 1996).

Сенсорная система, реагирующая на снижение Pi в среде, относится к двухкомпонентным системам сигнальной трансдукции, распространённым в бактериях (Capra, Laub, 2012; Gao et al., 2019). Как и другие системы такого типа, она состоит из рецептора на клеточной мембране, компонентов, участвующих в передаче сигнала, и мишеней-генов, относящихся к Pho-регулону. Хотя известно, что около 10% протеома *E. coli* реагирует на изменения Pi в среде (Hsieh, Wanner, 2010), к Pho-регулону в настоящее время относят около 30 транскрипционных единиц (Keseler et al., 2017). Основные транскрипционные единицы Pho-регулона *E. coli* кодируют периплазматическую щелочную фосфатазу (ген *phoA*), регуляторные белки (*phoBR*, *phoU*), высокоафинный транспортёр Pi (*pstSCAB*), а также компоненты систем, утилизирующих альтернативные источники фосфора (*ugpBAECQ*, *phnCDEFGHIJKLMNOP*), и специализированный для Pi порин внешней мембраны (*phoE*). Щелочная фосфатаза, активность которой начинает тестироваться только в условиях лимитации по Pi и возрастает в десятки раз в течение ограниченного времени, используется в качестве репортёра Pho-регулона (Wanner, 1996). Этот фермент увеличивает количество Pi в периплазме, удаляя фосфорильные группы из молекул органофосфата.

В *E. coli* регуляция генов в ответ на лимитирующие концентрации Pi зависит от функции семи белков: двухкомпонентных регуляторных белков PhoR и PhoB, транспортёра PstSCAB, относящегося к ABC-суперсемейству (Saier et al., 2016) и вспомогательного регуляторного белка PhoU (Hsieh, Wanner, 2010; McCleary, 2016).



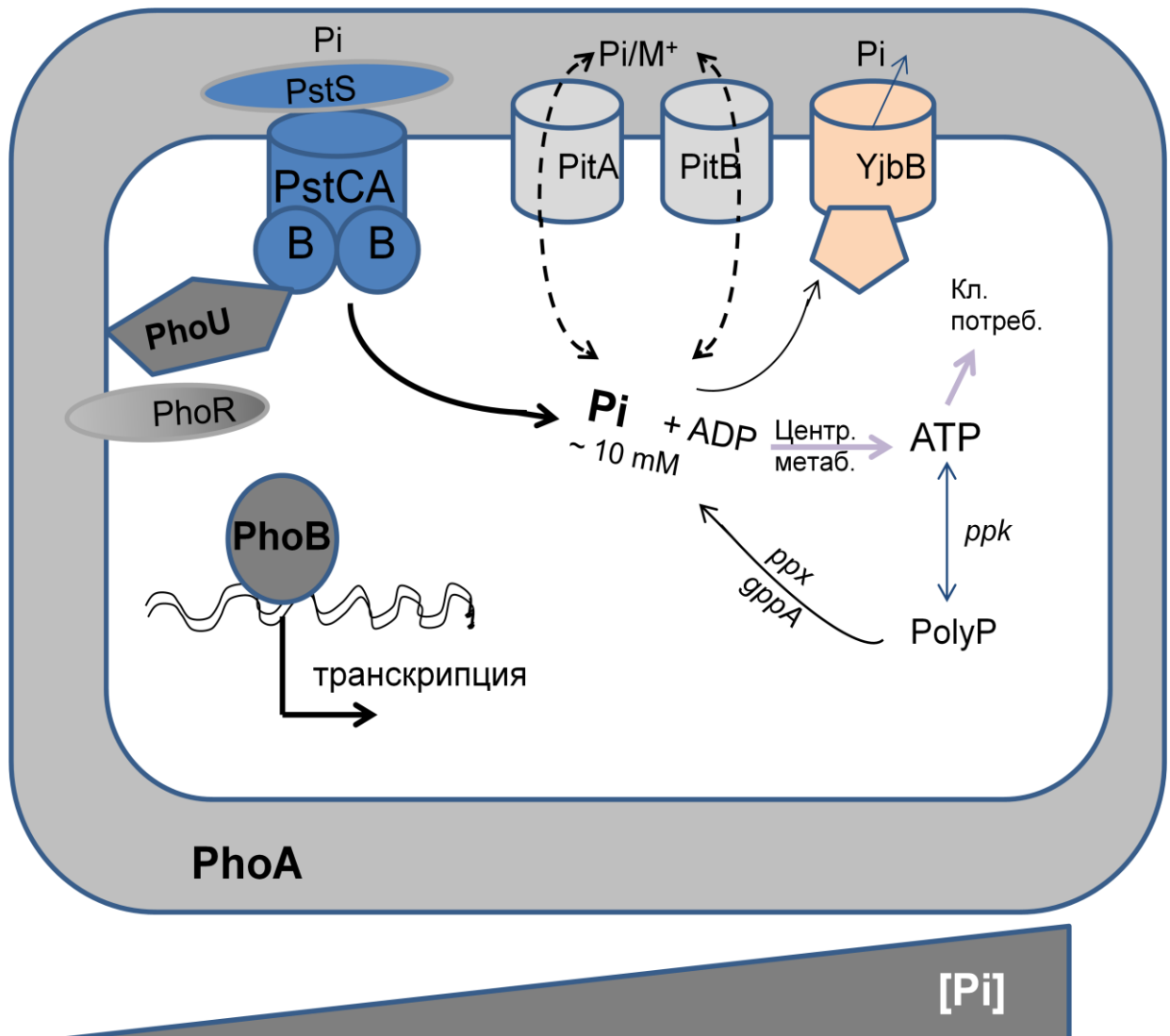


Рисунок 1.10 - Модель гомеостаза  $Pi$  в *E. coli* (по (McCleary, 2016))

Основными импортерами  $Pi$  в *E. coli* являются низкоаффинные PitA, PitB ( $K_m \sim 2 - 6$  мкМ;  $V_{max} \sim 60-70$  нмоль  $Pi$ /мг (сух.вес) мин) и высокоаффинный PstSCAB ( $K_m - 0,4$  мкМ;  $V_{max} - 16$  нмоль  $Pi$ / мг (сух. вес) мин), каждый из которых индивидуально способен поддерживать рост клеток с  $Pi$ , в качестве единственного источника фосфора (Harris et al., 2001). Зависимые от электрохимического потенциала транспортёры PitA и PitB переносят в клетку и из клетки нейтральные комплексы  $Pi$  с металлом ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , and  $Co^{2+}$ ). В последнем случае происходит генерация протон-движущей силы. В экспорте  $Pi$  может также участвовать YjbB (Motomura et al., 2011). Сенсорная система  $Pi$ : PstSCAB- рецептор, PhoU-PhoR - PhoB – передатчики сигнала на мишени, pho-боксы промоторов.

Интегральный мембранный белок PhoR, является бифункциональным белком. При ограничении  $P_i$  в среде PhoR, в качестве гистидиновой аутокиназы, фосфорилирует собственный остаток гистидина и передаёт эту фосфорильную группу PhoV (PhoV~P). Когда  $P_i$  в избытке, PhoR проявляет фосфатазную активность и удаляет фосфорильную группу из PhoV~P. Регулятор ответа PhoV имеет N-концевой приёмный домен и C-концевой, ДНК-связывающий домен. N-концевой домен содержит сайт фосфорилирования, Asp53 в *E.coli* (Sola et al., 1999). Фосфорилированный PhoV образует димер, который связывается с rho-боксами, короткими последовательностями ДНК, локализуемыми в промоторах генов Pho-регулона (Blanco et al., 2012). После чего PhoV~P рекрутирует РНК-полимеразу и инициирует транскрипцию путем ремоделирования комплекса голофермента РНК-полимеразы с ДНК. Поскольку PhoR не имел периплазматического домена, то предполагалось, что сенсором  $P_i$  в периплазме является транспортёр Pst (Hsieh, Wanner, 2010), компонентами которого были: периплазматический белок PstS, интегральные мембранные белки PstA и PstC, цитоплазматический белок PstB (Рисунок 1.11).

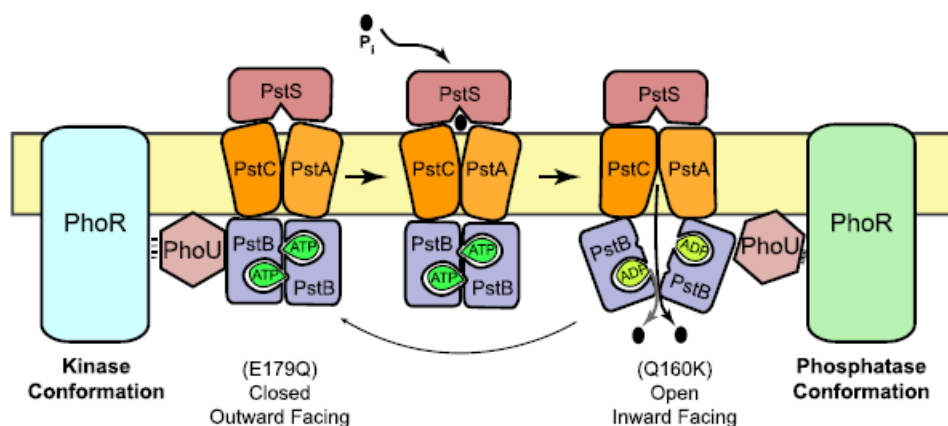


Рисунок 1.11 - Конформационная модель сигнализации для управления Pho-регулоном (воспроизведено по (Vuppada et al., 2018))

Каким образом идёт передача сигнала от Pst к PhoR, долгое время было непонятно. Позже было продемонстрировано, что PhoU взаимодействует как с

PhoR, так и с PstB (*Gardner et al.*, 2014), а в недавней работе было показано, что PhoR через PhoU реагирует на изменения конформации Pst (*Vuppada et al.*, 2018). Для подтверждения этой гипотезы в PstB были введены мутации E179Q и Q160K, которые стабилизируют внешнюю или внутреннюю конформации транспортёра. Эти мутации были предсказаны на основании сравнения с исследованным транспортёром ABC-типа MalK, для которого подобные мутации уже были охарактеризованы (*Daus et al.*, 2007). Открытый наружу транспортёр соответствовал дефициту Pi, а открытый внутрь – избытку Pi. В зависимости от конформации транспортера PstSCAB, PhoR проявлял функцию киназы или фосфатазы (Рисунок 1.11).

В определённых условиях PhoB может фосфорилироваться не только PhoR, но и другими гистидин-киназами (*Wanner et al.*, 1988; *Haldimann et al.*, 1996), а также с помощью ацетилфосфата (*Wolfe*, 2010). Сравнительно недавно было показано, что в условиях избытка Pi в стационарной фазе образующийся полифосфат в клетках кишечной палочки может активировать PhoB при участии ацетилфосфата (*Grillo-Puertas et al.*, 2016).

Избыточный Pi во время несбалансированного роста запасается клеткой в виде полифосфата, который помимо хранилища Pi выполняет и другие функции (*Albi, Serrano*, 2016). Он участвует в детоксикации металлов и может функционировать в качестве примитивного шаперона для защиты от повреждений, вызванных окислительным стрессом.

Хорошо известна основополагающая работа А. Корнберга, касающаяся метаболизма полифосфата в бактериях (*Kornberg*, 1995). Один из важных выводов, сделанный в его работах, касался роли полифосфата в так называемом «строгом ответе», ответственном за выживанием бактерий в стрессовых условиях. Этот ответ на стресс включает репрограммирование транскрипции посредством ответственного за стресс фактора RpoS и алармонов, гуанозин-5', 3'-тетрафосфата (ppGpp) и гуанозин-5', 3'-пентафосфата (pppGpp) (*Battesti et al.*, 2011). Эти молекулы, обозначаемые в общем случае, как (p)ppGpp, синтезируются с помощью RelA или SpoT и работают в качестве

аллостерических модуляторов РНК-полимеразы. В *E. coli* уровень полифосфата резко возрастает во время стресса, вызванного недостатком питательных веществ (Kuroda *et al.*, 1997). Одна из функций полифосфатов во время таких стрессов заключается в том, что они связываются с высокой аффинностью с АТР-зависимой протеазой Lon и стимулируют её активность по отношению к рибосомным белкам, тем самым замедляя трансляцию и клеточный рост (Kuroda *et al.*, 2001). В бактериях уровень полифосфата поддерживается двумя ферментами. Полифосфаткиназа РРК синтезирует polyP из АТР, то время как, экзополифосфатаза РРХ гидролизует фосфоангидридные связи в polyP, образуя свободный ортофосфат. До недавнего времени считалось, что основным механизмом, провоцирующим накопление polyP при строгом ответе, является ингибирование РРХ посредством (p)ppGpp (Kuroda *et al.*, 1997). Недавно была опубликована работа, в которой Майкл Дж. Грей показал, что (p)ppGpp не регулирует накопление полифосфатов во время голодания по аминокислотам (Gray, 2019). Предыдущий вывод был сделан ошибочно, поскольку в штамме *E. coli* SpoTRelA<sup>-</sup>, неспособном к синтезу (p)ppGpp, с высокой частотой возникают супрессорные мутации в РНК-полимеразе, предотвращающие синтез полифосфата. Накопление polyP контролируют тонкие механизмы, управляющие активностью РНК-полимеразы. В частности, нулевые мутации фактора транскрипции DksA, который ассоциирован со строгим ответом, ингибировали накопление polyP, а делеция фактора элонгации транскрипции GreA восстанавливала его в штамме *dksA*<sup>-</sup>.

Метаболизм полифосфатов имеет собственный прикладной аспект, связанный с удалением Pi из сточных вод с помощью бактерий, синтезирующих полифосфаты (McCleary, 2017).

### 1.5.1.2. Промоторы Pho-регулона и их использование

Система клеточного ответа на падение концентрации Pi в среде представляла интерес для практического использования в силу дешёвого и эффективного способа индукции необходимых генов. Промотор гена *phoA*,

кодирующего щелочную фосфатазу, начал исследоваться для сверхэкспрессии гетерологичных генов достаточно давно (*Oka et al.*, 1985; *Shin, Seo*, 1990). Индукция активностей ферментов или получение белков, гены которых находились под контролем этого промотора, была более эффективной в случае хромосомной копии гена, чем плазмидной.

Было показано, что  $P_i$ , образующийся из полифосфата и экскретирующийся наружу, может снижать активацию Pho-регулона в условиях голодания по  $P_i$  (*Van Dien et al.*, 1997). Для изучения индукции гена *phoA* посредством лимитации по  $P_i$  была разработана математическая модель Pho-регулона *E. coli*, которая была модернизирована с учётом влияния синтеза и деградации  $polyP$  на индукцию Pho-ответа (*Van Dien, Keasling*, 1998; 1999))

Промотор гена *phoA* использовался для синтеза гетерологичных эукариотических белков (*Carter et al.*, 1992; *Oka et al.*, 1985; *Su et al.*, 1990) и гетерологичных бактериальных ферментов (*Imaizumi et al.*, 2006) в кишечной палочке.

Помимо промотора гена *phoA* были картированы промоторы других генов Pho-регулона: *phoB*, *phoE*, *phoH*, *phnC*, *psiE*, *pstS*, *ugpB* (*Taschner et al.*, 2004). Все они вместо последовательности «-35» содержали один или два *pho*-боксов, два тандемных повтора из 11 п.о., с которыми связывался димер PhoB~P, стимулирующий транскрипцию. Промотор гена *pstS*, кодирующего переплазматический белок, связывающий фосфат, в отличие от остальных перечисленных промоторов Pho-регулона, узнавался не только РНК-полимеразой в комплексе с  $\sigma^{70}$ , но с  $\sigma^S$ . Для такого узнавания был необходим остаток цитозина в положении «-13» относительно старта транскрипции (Рисунок 1.12).

Промотор перед геном *pstS* ( $P_{pstS}$ ), который регулировался PhoB~P, был также промотором оперона *pstSCAB-phoU*, гены которого кодировали, помимо компонентов высокоаффинного транспортёра Pst, регулятор PhoU. Однако во время Pho-ответа транскрипция *pstS* возрастала намного значительно



PhoB~P с их промоторами. Гены (*pstS*, *phoE*), продукты которых вовлечены в прямое поглощение  $P_i$ , содержат *pho*-боксы с высоким сродством к PhoB~P и транскрибируются раньше, чем гены (*ugpB*, *phoA*, *phnC*), продукты которых вовлечены в удаление фосфора из биомолекул. К ранним генам относится и *phoB*.

В экспериментальных условиях, описанных в работе Гао и Сток, экспрессия генов *phoB*, *ugpB*, *phnC* после индукции  $P_i$ -лимитации возрастала в 10 раз, экспрессия *phoA* – в 20, а *phoE* – в 25 раз (Gao, Stock, 2015). Уровни экспрессии этих генов определялись не только последовательностями «-10», но и архитектурой промотора, т.е. количеством, расположением и ориентацией сайтов связывания PhoB. Уровни экспрессии Pho-генов по-разному зависели от количества PhoB~P. Экспрессия генов *phoB* и *ugpB* после индукции Pho-ответа росла и начинала падать при концентрациях PhoB~P более 2 и 7 мкМ, соответственно. А уровни экспрессии *phoE*, *phoA*, *phnC* после монотонного увеличения выходили на плато. При повторной  $P_i$ -лимитации, индуцируемой в течение трёх часов после окончания предыдущей, клетки сохраняли память о Pho-ответе (Gao et al., 2017). Начальный уровень экспрессии промотора *phoA* был выше, но кривая роста экспрессии сходилась с кривой роста экспрессии без предварительной индукции после двух часов инкубации клеток. Эта сходимость нарушалась в штамме *rpoS*<sup>-</sup>. В этом штамме отсутствовала конкуренция  $\sigma^{70}$  с  $\sigma^S$  за РНК-полимеразу и, таким образом, увеличивалось количество функционального комплекса RNAP- $\sigma^{70}$ , который узнавал промотор *phoA*.

Современные исследования тонкой регуляции промоторов генов Pho-регулона позволили совершенствовать математические модели Pho-регуляции, которые предполагается использовать для создания биосенсоров и регуляторов в биотехнологии (Gao et al., 2017; Uluşeker et al., 2019).

### 1.5.3. Контроль уровня клеточных белков с помощью протеолиза и генетически кодируемая целевая деградация белка

Все организмы контролируют функциональный уровень своих белков с помощью АТФ-зависимого протеолиза. *E. coli* имеет пять АТФ-зависимых протеаз: ClpAP, ClpXP, Lon, HslUV и FtsH, каждая из которых распознает различные химические или структурные особенности белков и, таким образом, нацеливается на специфические белки для деградации (Gottesman *et al.*, 1997; Dougan *et al.*, 2002a). Эти аденозинтрифосфатазы, связанные с клеточной активностью (ATPases Associated with cellular Activities), сокращённо называют ААА<sup>+</sup> - протеазами (Olivares *et al.*, 2016).

Для практического использования представляет интерес протеолиз, который можно программировать, присоединяя к целевому белку специфические С или N-концы (Sekar *et al.*, 2016). Деградацию, таким образом, меченых белков осуществляют, в основном, цитоплазматические протеазы Clp. Эти протеазы состоят из двух сложенных гептамерных колец ClpP с активными сайтами, ориентированными в канал, расположенный внутри колец (Wang *et al.*, 1997). Чтобы стать полностью функциональной, протеаза ClpP должна образовать комплекс с одной из двух АТФ-зависимых анфолдаз (unfoldases) ClpA или ClpX. Последние связывают белковые субстраты, разворачивают их и перемещают развернутый субстрат через кольцо АТФазы в ClpP (Aubin-Tam *et al.*, 2011). ClpA и ClpX имеют N-концевой домен, ответственный за связывание, как с мотивом короткой ПС белка-субстрата, так и с адапторными белками (Dougan *et al.*, 2002a; Flynn *et al.*, 2003). Последние взаимодействуют либо с ClpA, либо с ClpX и повышают их сродство к различным субстратам. N-концевые субстраты узнаются адаптором ClpS, который направляет их к ClpAP (Erbse *et al.*, 2006).

Способ получения белка-мишени для протеолитической деградации, содержащей С-концевую метку, был открыт при изучении *транс*-трансляции. *Транс*-трансляция является уникальным механизмом переключения синтеза



полипептидной цепи с мРНК на матричную область тмРНК, молекулы, соединяющей в себе черты матричной РНК и транспортной РНК (*Komine et al.*, 1994; *Keiler et al.*, 1996). Транс-трансляция позволяет, с одной стороны, освободить для новых раундов трансляции рибосомы, заблокированные при трансляции мРНК без стоп-кодона, а с другой, направить на деградацию проблемную мРНК и синтезированный с неё полипептид (*Withey, Friedman*, 2003; *Yamamoto et al.*, 2003). Транспортно-матричная РНК (тмРНК, синонимы: РНК SsrA, 10Sa RNA) содержит тРНК-подобную структурную область, которая процессируется РНКазой Р и аминоацилируется аланил-тРНКсинтетазой. РНК SsrA также содержит область, функционирующую в качестве матричной РНК. Последняя кодирует транслируемый «хвост», который добавляется к образующемуся белку, в результате чего белок становится мишенью для протеолитической деградации (*Tu et al.*, 1995; *Keiler et al.*, 1996). В *E. coli* «ssrA-хвост» состоит из 11 аминокислот: AANDENYALAA.

Активность тмРНК необходима для нормального роста *E. coli* (*Oh, Apirion*, 1991; *Komine et al.*, 1994). Гены тм-РНК повсеместны и используются в качестве зондов при идентификации бактериальных видов (*Schönhuber et al.*, 2001).

Первоначально для искусственной протеолитической деградации был помечен репрессор фага  $\lambda$ . Рамка считывания этого белка удлинители с С-конца ПС нуклеотидов, кодирующей ssrA-хвост или его модификацией для ослабления деградации (*Gottesman et al.*, 1998). Опосредованная протеазами ClpXP, ClpAP деградация исследовалась с помощью зеленого флюоресцентного белка (GFP) с ssrA-хвостом, в качестве репортера (*Farrell et al.*, 2005). Обе протеазы ClpAP и ClpXP инактивировали GFP-ssrA. Деградация усиливалась при вхождении клеток в стационарную фазу. Адаптер SspB, связывающийся с ssrA-мечеными белками и с ClpX, существенно повышал сродство таких белков к ClpXP (*Levchenko et al.*, 2000). Детерминанты, которые узнавали ClpX, ClpA и SspB в ssrA-хвосте, были идентифицированы (*Flynn et al.*, 2001). Узнаваемые

мотивы частично перекрывались для ClpA и SspB, но не для ClpX и SspB (Рисунок 1.13). Таким образом, SspB должен был ингибировать узнавание *ssrA*-субстратов с помощью ClpA. В то же время, SspB узнавал субстраты независимо от ClpX, но согласованно с ним.



Рисунок 1.13 - Детерминанты (включая  $\alpha$ -карбоксильную группу), узнаваемые ClpX, ClpA и SspB в «*ssrA*-хвосте»: (А) – смежные для ClpX и SspB и (Б) – перекрывающиеся для ClpA и SspB.

(воспроизведено по (Flynn *et al.*, 2001))

Используя схему привязывания *ssrA*-меченого субстрата к протеазному комплексу ClpXP с помощью SspB (Рисунок 1.14), была разработана система контролируемой деградации (McGinness *et al.*, 2006). Была сконструирована серия модифицированных *ssrA*-хвостов (DAS-хвосты), которая узнавалась преимущественно SspB. Субстраты, имеющие такие хвосты, были стабильны в отсутствие SspB, но быстро деградировали после его появления. Сам по себе белок SspB является несущественным, поэтому его инактивация не сказывалась на жизнеспособности. Таким образом, было продемонстрировано, что деградация белка со специализированным DAS-хвостом контролировалась посредством индукции гена *sspB*.

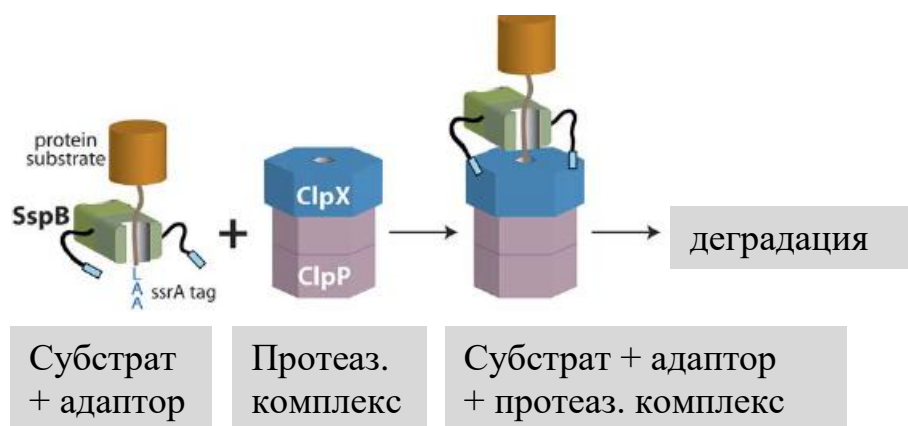


Рисунок 1.14 - Схема соединения *ssrA*-субстрата с протеазным комплексом ClpXP с помощью SspB (воспроизведено по (McGinness *et al.*, 2006))

Следующим шагом в исследованиях роли адаптора SspB, а также в усовершенствовании контролируемой деградации, явилось конструирование полностью искусственной системы контролируемой деградации (Davis *et al.*, 2009). Используя варианты субстратов, адапторов и фермента ClpX были исследованы минимальные биохимические функции, необходимые для функции адаптера.

В результате получили искусственный адаптор, который соединял DAS-хвост целевого белка с субъединицами ClpX<sup>ΔN</sup> (Рисунок 1.15). В качестве белкового мостика использовали фрагменты белков млекопитающих: FRBP, соединённый с ClpX<sup>ΔN</sup>, и FRB, соединённый с ядром SspB (SspB<sup>core</sup>). FRBP и FRB соединялись после добавления рапамицина. После чего начиналась деградация субстрата, как показано на Рисунке 1.14.

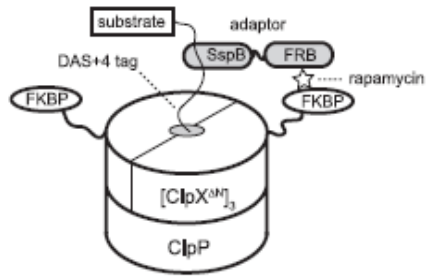


Рисунок 1.15 - Схема соединения DAS-меченного субстрата с протеазным комплексом FKBPlinker-ClpX<sup>ΔN</sup>P с помощью SspB<sup>core</sup>-FRB и рапамицина (воспроизведено по (Davis et al., 2009)).

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1. Химические вещества и ферменты**

Химические вещества, если не указано иное, были поставлены «Химмед» (РФ), «Диа-М» (РФ), «Реахим» (РФ).

Основными поставщиками ферментов, а также готовых комплектов для молекулярно биологических манипуляций являлись Fermentas (Литва), впоследствии ставшей частью Thermo Scientific (США), а также «Евроген» (Москва), Sigma-Aldrich (США), Qiagen (Германия).

Двумерный электрофорез белков проводили с использованием реактивов и оборудования, приобретённых у компании Amersham Pharmacia (Великобритания), впоследствии ставшей частью компании GE Healthcare (США).

### **2.2. Бактериальные штаммы и плазмиды**

Штаммы, происходящие из других источников и основные из полученных в работе, представлены в Таблицах 2.1 и 2.2 соответственно. Использованные плазмиды перечислены в Таблице 2.3.

### **2.3. Олигонуклеотиды**

Химический синтез олигонуклеотидов на начальных этапах работы осуществлялся в ГосНИИГенетика (Москва), затем в ЗАО «Синтол» (Москва). Олигонуклеотиды, необходимые для воспроизведения результатов работы, представлены в Таблице 2.4.

Таблица 2.1 - Штаммы *E. coli*, происходящие из других источников

Название	Характеристика	Источник/ссылка
BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon</i> <i>hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 (lacI</i> <i>lacUV5-T7p07 ind1 sam7</i> <i>nin5)) (malB<sup>+</sup>)<sub>K-12</sub>(λ<sup>S</sup>)</i>	Коллекция ОА «АГРИ»
BW25113	<i>lacI<sup>q</sup> rrnBT14 ΔlacZ</i> WJ16 <i>hsdR514 ΔaraBADAH33</i> <i>ΔrhaBADLD78</i>	<i>Datsenko, Wanner, 2000</i>
BW25113P <sub>tac-900-pgl</sub>	BW25113P <sub>tac-900-pgl</sub>	Д. Зименков (АО «АГРИ»)
BW25113P <sub>tac-3900-pgl</sub>	BW25113P <sub>tac-3900-pgl</sub>	тот же
CC118	<i>Δ(ara, leu)<sub>7697</sub></i> <i>araD139ΔlacX74 galE galK</i> <i>phoA20 thi-1 rpsE rpoB(Rf<sup>r</sup>)</i> <i>argE(am) recA1 λpir<sup>+</sup></i>	<i>Herrero et al., 1990</i>
HB101	<i>F<sup>-</sup> leuB6 proAB recA14 thi1</i> <i>ara14 lacY1 galK2 xyl5 mtl1</i> <i>rpsL20 (Str<sup>r</sup>) supE44 hsdS20</i>	АТСС 33694; Г.Б.Смирнов (НИИ им. Гамалеи, Москва)
LJ200	W3110 <i>Fnr<sup>+</sup> csc cscB1</i>	<i>Jahreis et. al., 2002</i>
MG1655	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> ilvG rfb-50 rph-1</i>	VKPM B6195
MG1655 <sup>+</sup>	MG1655 <i>rph<sup>+</sup>ilvG15</i>	<i>Бирюкова и др., 2010</i>
SV164(pGH5)	продуцент L-Три, Tc <sup>r</sup>	Патент США № 6180373
TG1	<i>F<sup>-</sup> Δ(lac-pro) supE thi hsdΔ5</i> <i>(F' traΔ36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup></i> <i>lacZΔM15)</i>	VKPM IMG-341
W3350	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> galK2(Oc) galT22</i> <i>IN(rrnD-rrnE)1</i>	CGSC 5976

Таблица 2.2 - Основные штаммы, полученные в работе

Название	Генотип	Продукент
DV033	MG1655 <i>htrE</i> ::P <sub>φ10</sub> - <i>yddG</i>	–
DV036	MG1655 <i>htrE</i> ::P <sub>L</sub> - <i>yddG</i>	–
DV064	MG1655Δ <i>yddG</i>	–
DV157	MG1655Δ <i>tyrA</i>	L-Фен
DV158	DV157 <i>htrE</i> ::P <sub>φ10</sub> - <i>yddG</i>	"
DV269	DV666 <i>hsdR</i> ::( <i>aroG4pheA</i> <sup>fb</sup> <i>aroL</i> ) <sub>miniMu</sub>	"
DV368	DV269(P <sub><i>pstS</i></sub> - <i>aroG4</i> ) <sub><i>hsdR</i>::miniMu_GAL</sub>	"
DV371	DV269(P <sub><i>phoA</i></sub> - <i>aroG4</i> ) <sub><i>hsdR</i>::miniMu_GAL</sub>	"
DV654	DV157Δ <i>yddG</i>	"
DV666	DV157 <i>htrE</i> ::P <sub>L</sub> - <i>yddG</i>	"
DV683	MG1655Δ <i>pheA</i>	L-Тир
DV686	DV683 <i>htrE</i> ::P <sub>L</sub> - <i>yddG</i>	"
DV688	DV683 <i>htrE</i> ::P <sub>φ10</sub> - <i>yddG</i>	"
DV1060	MG1655Δ <i>tyrA-pheA</i> Δ <i>trpR</i> Δ <i>tnaA</i>	L-Три
DV1061	DV1060 <i>htrE</i> ::P <sub>L</sub> - <i>yddG</i>	"
DV1062	DV1060 <i>htrE</i> ::P <sub>φ10</sub> - <i>yddG</i>	"
DV1063	DV1060Δ <i>yddG</i>	"
DV1071	DV269ТyrA-LAA	L-Фен
KF37	MG1655 <sup>+</sup> <i>hisG</i> <sup>f</sup> <i>hisL</i> '-Δ Δ <i>purR</i>	L-Гис
SV164 <i>scr</i> (pGH5)	SV164 <i>ebgA</i> :: <i>scrKYABR</i> (pGH5)	L-Три
SV164 <i>csc</i> (pGH5)	SV164 <i>dsd</i> :: <i>cscBIKAR</i> (pGH5)	L-Три
A308	DV1071Δ <i>aroCycil</i> ::P <sub>tac</sub> - <i>aroC</i>	L-Фен
A312	DV1071Δ <i>aroCycil</i> ::P <sub>tac</sub> - <i>ARO2</i>	L-Фен

Таблица 2.3 - Плазмиды *E. coli*, использованные в работе

Название	Описание	Источник/ссылка
pAH123	Ap <sup>r</sup> ; oriR101; repA101(ts); λcI857(ts); φ80Int	<i>Haldimann, Wanner,</i> 2001
pAH162-λatt-Km <sup>r</sup>	Km <sup>r</sup> ; oriRγ (pAH162ΔTc <sup>r</sup> -λattL-Km <sup>r</sup> -λattR)	Минаева Н. И. (АО «АГРИ»)
pAУСТЕРydeA		<i>Лившиц,</i> 2006
pAУСТЕРyddG		тот же
pBRS5.2	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Suc <sup>+</sup> ; pMB1ori (pBR325::Tn2555.3)	<i>Дорошенко,</i> 1988
pBRyddG-ZsGreen	Tc <sup>r</sup> ; pMB1ori; P <sub>lac</sub> -yddG-ZsGreen	<i>Цыренжапова,</i> 2010
pET-22b(+)	Ap <sup>r</sup> ; pMB1ori; flori;T7 promoter	Novagen (США)
pKD46	Ap <sup>r</sup> ; oriR101; repA101(ts) P <sub>araB</sub> -gam-bet-exo	<i>Datsenko, Wanner,</i> 2000
pM1	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ; pMB1MuL-aph-MuR (pMu4041ΔtraABner Δcts62)	Ахвердян В.З. (ОА «АГРИ»)
pMDV3-Cm <sup>r</sup>	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> ; pUC9MuL-λattL-cat-λattR-MuR	Скороходова А.Ю. (ОА «АГРИ»)
pMDV3-P <sub>φ10</sub> -yddG	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> ; pMDV3-Cm <sup>r</sup> -P <sub>φ10</sub> -yddG	Данная работа
pMH10	Km <sup>r</sup> ; p15A; traAB ner cIts857	Ахвердян В.З. (ОА «АГРИ»)
pMS1	pM1Km <sup>s</sup> ; MuL-scrKYABR-MuR	Данная работа
pMWts-λInt/Xis	Ap <sup>r</sup> ; repA101(ts) int xis(λ) cIts857	Каташкина Ж.И. (ОА «АГРИ»)
pMW118-Cm <sup>r</sup>	Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> ; repA101; λattL-cat-λattR	тот же
pRSFPlacsacB	Cm <sup>r</sup> ; P <sub>lacUV5</sub> -sacB-cat	<i>Katashkina et al.,</i> 2009
RP4	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> ; Tra <sup>+</sup> IncP	<i>Pansegrau et al.,</i> 1994



Таблица 2.4 - Олигонуклеотиды, использованные в работе

Праймер	Нуклеотидная ПС (5'→3'); рестрик. сайт подчёркнут.
A1	ataac <u>ctgcagt</u> gatggctggaaacacaattgga
A2	tattga <u>attctt</u> accagcgtggaatatcag
A3	agtccaagcttgcatgctgcaggtcgactctagacgctcaagttagtataaaaaagctgaacgagaaacg
A4	atgtatatctccttcttaaagttaatcctgtgtgaaattgttatccgct
A5	ggtggtgacgcggaacagtttgccaacgttgacatatgtatatctccttcttaaagttaat
A6	tacgcgaaagagttgtccaattgtgtttccagccatatgtatatctccttcttaaagttaat
D1	tatggttgctgaattgaccgcattacgcgatcaaatcgctcaagttagtataaaaaagctgaacgagaaacg
D2	ggcaacactatgacatcggaaaacccgttactggcgtgaagcctgctttttataactaagttggcattataa
D3	ttacagcttagcgccttctacagcttcacgcgccagtgaaagcctgctttttataactaagttggcattataa
D4	tatgaatccacaattgttacgcgtaacaaatcgaatcgctcaagttagtataaaaaagctgaacgagaaacg
D5	catggcggtaacgcaaacagcccaggcctgtgacctcgctcaagttagtataaaaaagctgaacgagaaacg
P1	attcacagagacttttatgacacgcggtcaatttaacgctcaagttagtataaaaaagctga
P2	gtctgtcatcagaaatctcctgtgaagcctgctttttataactaagttg
P3	ctgcatagctatgcgtaaacgagtggtgtctgtcatcagaaagtctcctg
P4	cgcttcgcaaattgacctacctcaatagcggtagacgctcaagttagtataaaaaagctgaacgagaaacg
P5	ctagta <u>agatctt</u> gaagcctgctttttataactaagttgg
P6	tttac <u>agatctt</u> cacctaccaacaatgccc
P7	tttac <u>agatctt</u> tatctctggcgggtgtgaca
P8	tatcagccctatgagcgttgctttttgtcgtgtcatagctgttccctctagacggccaatgcttcgt
P9	ccaaaa <u>agatctc</u> gatccccgcaaat
P10	gcgttgctttttgtcgtgtcatatgtatatctccttcta
P11	taagaaggagatatacatatgacacgacaaaaagcaacgc
P12	ccaaggtac <u>ctt</u> aaccacgacgtgtcg
P13	acggatggcctttttgcgtttctacaaactcttttcgctcaagttagtataaaaaagctgaacgagaaacg
P14	gggcagacatggcctgcccggttattattttttgtgaagcctgctttttataactaagttgg
P15	agctatgacctgattacggattcactggccgctcgtcgtcaagttagtataaaaaagctgaa

## Продолжение Таблицы 2.4

<b>Праймер</b>	<b>Нуклеотидная ПС (5'→3'); рестрик. сайт подчёркнут.</b>
P16	acgtaatccagcaaacccggcccccttcgggacacagcgcgggcagtgagcgc
P18	acgtaatccagcaaacccggcccccttcgggacacagcgcgggcagtgagcgc
P19	cagtgaatccgtaatcatggtttttgcgtgtcatcgccccgccctgcca
P20	acgtaatccagcaaacccggcccccttcgggacacagcgcaccacggcttacg
P21	cagtgaatccgtaatcatggtttttgcgtgtcatgctcgctgtttgtct
P22	ggatggcatgatagcggcccggaagagagtcaattccgctcaagttagtataaaaaagctgaa
P23	ccagtgaatccgtaatcatggatcatagctgtttccttgaagcctgctttttataactaagttg
P24	ttaaccacgacgtgtcgcca
P25	atgacacgacaaaaagcaacg
P26	cctcactgacaccggaatc
P27	agccataaccgcccgcgcaga
P28	atgacatcggaaaaccggttactggcgctgcgagagtgaagcctgctttttataactaag
P29	gcaaacgacgaaaactacgcttttagcagcttaacgctcaagttagtataaaaaagctgaa
P30	gcagtgttattgcgtcaggcgaatgacaatcgccaggcaaacgacgaaaactac
P31	atgacatcggaaaaccggtta
P32	caggcaaacgacgaaaactacgcttttagcagcttaacaggttgatcaacaggc
P33	caggcaaacgacgaaaactacgcttttagcagcttaagtcaggatggccttctgct
P34	caggcaaacgacgaaaactacgcttttagacgattaagtcaggatggccttctgct
P35	caggcaaacgacgaaaactacgctgcagcagtttaagtcaggatggccttctgct
P36	cgcggttattgcgtcaggcgaatgacaatcgccaggcaaacgacgaaaactacgct
P37	cgcggttattgcgtcaggcgaatgacaatcgccaggcggcaaacgacgaaaactacgct
P38	ccgatgttgggacagcgtgcttcgctttgtgctcgetcaagttagtataaaaaagctgaacgagaaaacg
P39	tactgagatcttgaagcctgctttttataactaagttggcattataa
P40	ctcaagatctcagtaaaaagttaatctttcaacag
P41	ttctttgatgcgtaaatcgtcgttctgataatcattttattttctccatgtacaatac
P42	ctcaagatctctgaagactttatctctctgtca

## Продолжение Таблицы 2.4

Праймер	Нуклеотидная ПС (5'→3')
P43	ttctttgatgcgtaaatacgtcgttctgataattcataatgtctcctgggaggat
Z1	tttcgtacttcaagtgaatcaataca
Z2	ggaggacattggattattcgg
Z3	ttcgcatttatcgtgaaacgcttctgc
Z4	tactgctttttattcattacatgggga
Z5	ttagtgtgcgtaaccaccacc
Z6*	aggcttcaagatctccctgТТСА
Z7	aggcttcaagatctccctgТТТG
Z8	tgcagcgcgtgaatgtgtta
Z9	ctcaagacaaagctgatagcc

\* Часть ПС «-35» обозначена заглавными буквами.

## 2.4. Среды и культивирование штаммов

### 2.4.1. Культивирование на лабораторных средах

Штаммы выращивали на средах известного состава (*Sambrook, Russell, 2001*): LB, SOB (при подготовки клеток к электропорации фрагментом ДНК), минимальной среде M9 с глюкозой (0,4%) или сахарозой (0,4%) в качестве источников углерода. В минимальную среду M9 (где указано) добавляли аминокислоты, 50 мг/л, аденозин, 100 мг/л. Агаризованные среды содержали 20% агара. Антибиотики добавляли в концентрациях (мкг/л): ампициллин (Ap) – 200, канамицин (Km) – 40, стрептомицин (Str) – 100; тетрациклин (Tc) – 12,5; хлорамфеникол (Cm) – 20. Изопропил  $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) использовали в конечной концентрации 1 мМ.

Штаммы *E. coli*, если не указано иное, культивировали на чашках при 37°C. Культивирование в жидкой среде, включая ферментации в пробирках, проводили с перемешиванием 240 об/мин. Использовались пробирки 13x150 мм (не более 3 мл среды) или 20 x 200 мм (не более 10 мл среды).

Для определения скорости роста клеток ( $\mu$ ) величину оптической плотности (ОП) измеряли в автоматическом режиме с помощью биофоторекодера TVS062CA (Advantec Toyo Co. Ltd., Япония) на качалке при частоте вращения 70 об/мин.

### 2.4.2. Проведение ферментаций

Ферментации проводили в пробирках 20 x 200 мм, которые содержали 2 мл (продуценты на основе MG1655) или 3 мл (SV164(pGH5)) ферментационной среды и добавленной посевной культуры в количестве 1/10 от объёма среды. Для получения посевных культур клетки штаммов, взятых со свежих чашек LB (петля – 0,3 мм), выращивали в течение ночи (SV164(pGH5)) или 3 - 4 ч (штаммы на основе MG1655) в пробирках 13x150 мм, содержащих 3 мл среды LB. Пробирки с посевной культурой культивировали при той же температуре, что и последующую ферментацию (см. ниже).

Для ферментации продуцента триптофана SV164(pGH5) и его производных использовали среду следующего состава (г/л): глюкоза или сахароза – 40; Фен – 0,1; Тир – 0,1;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 15;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{NaCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,015;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,075;  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  – 1;  $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,00015;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,0025;  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,007;  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,00025;  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,0016;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0003; тиамин HCl – 0,005; пиридоксин – 0,03; кукурузный экстракт (AJINOMOTO) – 2;  $\text{CaCO}_3$  – 30. Ферментацию проводили при 30<sup>0</sup>С в течение 40 ч.

Ферментацию в пробирках продуцентов ароматических аминокислот, производных MG1655, проводили на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 40; дрожжевой экстракт – 2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 16;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1 или 0,6;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{CaCO}_3$  – 30. Необходимые ароматические аминокислоты добавляли до концентрации 0,125 г/л. Инкубирование проводили при 34<sup>0</sup>С в течение 30 ч для продуцентов фенилаланина и тирозина и при 30<sup>0</sup>С в течение 42 ч для продуцентов триптофана.

Оценку способности продуцировать гистидин проводили на ферментационной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 40;  $\text{CaCO}_3$  – 30; дрожжевой экстракт – 2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 16;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,6;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,005;  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,005. Культивирование проводили при 30<sup>0</sup>С 30-36 ч. Оптическую плотность переводили в сухой клеточный вес (скв) с помощью стандартной кривой ( $1.0 \text{ ОП}_{600} = 0.45 \text{ г скв/л}$ ).

Среда для культивирования модельных продуцентов фенилаланина в ферментёрах была следующего состава (г/л): глюкоза или сахароза – 50;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,01; дрожжевой экстракт – 2. Ферментацию проводили в аппаратах Biostat Q (BBI, Germany) с общим и рабочим объёмами 1 л и 0,3 л соответственно. Культуры, выросшие на чашках, инокулировали в колбы (0,75 л) со средой LB (0,03 л). Подращивали на качалке при 240 об/мин и 37<sup>0</sup>С в течение 3 ч.

Затем переносили в аппараты, содержащие ферментационную среду. Клетки культивировали в аэробных условиях при 37°C, pH 6,7 поддерживали с помощью NH<sub>4</sub>OH.

### **2.4.3. Культивирование штаммов для анализа потоков**

Штаммы культивировали в аппаратах Biostat Q (BBI, Germany). В качестве ферментационной среды использовали M9 с добавленными микроэлементами (мг/л): ZnSO<sub>4</sub> – 0,3; CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O – 0,7; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> – 0,86; CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O – 0,25. В качестве источника углерода использовали глюкозу (1%), десятая часть которой составляла однородно меченная (U-13C) глюкоза (Sigma-Aldrich, США). Культивирование проводили при 37°C при pH 6,6 (2,5 M NH<sub>4</sub>OH) и при концентрации растворённого O<sub>2</sub> не ниже 25% от содержания O<sub>2</sub> в воздухе. Культивирование штаммов останавливали после полного потребления глюкозы.

### **2.4.4. Определение выживаемости и минимальных ингибирующих концентраций**

Для определения выживаемости в присутствии Фен и метилвиологена (MV) (Sigma-Aldrich, США) клетки тестируемых штаммов выращивали в среде M9 с глюкозой до середины логарифмической фазы ( $3 \times 10^8$  кл/мл). Клетки отмывали свежей средой и высевали в разведениях на агаризованную среду M9, содержащую различные количества проверяемого вещества. Выживаемость определялась как отношение числа колоний, выросших на чашках с тестируемым веществом, к числу колоний, выросших без него.

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) использовали чашки с агаризованной средой M9 и последовательными концентрациями проверяемого вещества. Клетки тестируемых штаммов предварительно наращивали в среде M9 до титра  $\sim 10^8$ - $10^9$  жизнеспособных кл/мл. Клетки разводили средой M9 (без глюкозы, тиамина и аминокислот) до  $\sim$

$10^4$  кл/мл и наносили по пять мкл на чашки, которые инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  около 40 ч.

## **2.5. Конструирование штаммов и плазмид методами молекулярной генетики**

### **2.5.1. Отбор транспозиций Tn2555.3 из pBRS5.2 в RP4**

Транспозиции Tn2555.3 из плазмиды pBRS5.2 в конъюгативную плазмиду RP4 (Рисунок 2.1) отбирали с помощью проведения конъюгационных скрещиваний донорного штамма ResA<sup>-</sup> HB101(RP4,pBRS5.2) с реципиентным штаммом W3350. Для этого ночные культуры обоих штаммов смешивали и засеивали на чашку с LB-агаром. Для получения независимых трансконъюгантов скрещивания проводили на разных чашках. Клетки, выросшие на таких чашках в течение ночи, ресуспендировали в стерильной воде и высевали в разведениях на среду M9 с глюкозой и канамицином или хлорамфениколом; на среду M9 с сахарозой, т.к. штамм W3350 был прототрофом, в отличие от ауксотрофа HB101.

### **2.5.2. Перенос генетических признаков с помощью трансдукции**

Для переноса маркированных генетических признаков из одного штамма в другой использовалась трансдукция фагами P1-vir (Miller, 1972) или T4GT7 (Wilson et al., 1979). Для этого свежевыросшие клетки реципиентного штамма ресуспендировали в буфере для P1-vir (0,01M CaCl<sub>2</sub>; 0,1M MgSO<sub>4</sub>) или для T4GT7 (M9 без глюкозы, но с добавлением триптофана, 20 мкг/мл), до титра  $10^9$  -  $10^{10}$  кл/мл. Инфицировали фаголизатом, приготовленным на донорном штамме, с множественностью заражения 0,05 – 0,25 бляшкообразующих ед. на клетку. Выдерживали суспензии клеток с фаголизатом 1-15 мин при  $37^\circ\text{C}$  (P1-vir) и при комнатной температуре (T4GT7). Далее клетки осаждали центрифугированием, отмывали средой M9 без добавок и высевали на селективные среды. Фаголизаты на донорных штаммах получали с

использованием верхнего агара (0,7%) как описано в руководстве (Miller, 1972).

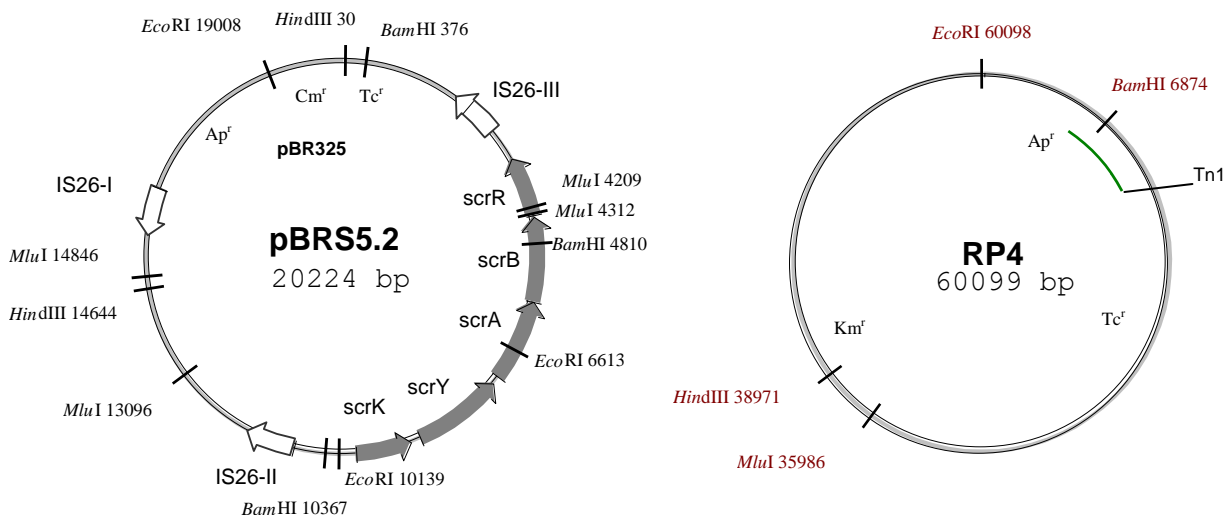


Рисунок 2.1 - Физические карты плазмид pBRS5.2 и RP4

Показаны сайты расщепления рестрикционных эндонуклеаз, которые использовались для анализа плазмид из клеток трансконъюгантов Cm<sup>r</sup>Suc<sup>+</sup>. Отмечена область транспозона Tn1 плазмиды RP4, в которую преимущественно интегрировались варианты Tn2555, содержащие гены *scr*.

### 2.5.3. Му-опосредованная интеграция генов в хромосому *E. coli*

Для интеграции генов утилизации сахарозы *scrKYABR* в хромосому их клонировали в Му-интегративном векторе pM1 и полученную плазмиду pMS1 использовали для интеграции. pMS1 вводили в штамм MG1655(pMH10) с помощью трансформации (обработка клеток CaCl<sub>2</sub>), сразу после которой проводили инкубацию при 42<sup>0</sup>C в течении 15 мин для индукции транспозазы. Суспензию клеток разводили в 10 – 20 раз бульоном LB и инкубировали с аэрацией в течение 24 ч. Затем клетки отмывали стерильной H<sub>2</sub>O от богатой



среды и высевали в разведениях на чашки со средой M9, содержащей сахарозу в качестве единственного источника углерод. Для дальнейшего анализа среди выросших колоний отбирали колонии  $Ar^S Km^r$  с хорошим ростом на среде с сахарозой.

Интеграцию miniMu- $P_{\phi 10}$ -*uddG* с использованием полученной для этого плазмиды pMDV3- $P_{\phi 10}$ -*uddG* проводили в штамм MG1655(pMH10) аналогичным образом.

## 2.6. Манипуляции с ДНК

### 2.6.1. Методики работы с ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовали щелочной метод (*Birnboim, Doly*, 1979). Определение концентрации ДНК и её анализ с помощью электрофореза в агарозном геле проводили согласно руководству (*Маниатис и др.*, 1984). Хромосомную ДНК выделяли по протоколам этого же руководства.

Для выделения хромосомной и плазмидной ДНК также использовались коммерческие наборы GenElute genomic DNA Extraction Kit (Sigma-Aldrich, США) и Qiagen Miniprep kit (Qiagen, Германия).

Обработку ДНК рестриктазами, лигирование проводили с помощью ферментов, полученных от Fermentas/Thermo Scientific (Литва/США), в условиях, рекомендованных производителем.

Плазмидную ДНК вводили в клетки *E. coli* с помощью  $Ca^{2+}$ -зависимой трансформации (*Маниатис и др.*, 1984) либо электропорацией. Последнюю использовали также для введения в клетки фрагментов ДНК при рекомбинационной инженерии хромосомы.

Для проведения электропорации фрагментом ДНК электрокомпетентные клетки получали следующим образом. Ночную культуру штамма *E. coli* с плазмидой rKD46, выращенной при 30 °C в среде LB с Ar, разводили в 50-100 раз средой SOB (6 мл), содержащей Ar и L-арабинозу (10 мМ). Культуру

растили с перемешиванием при 30 °С до достижения  $OD_{600} \approx 0.6$ , после чего делали клетки электрокомпетентными путем трехкратного отмывания ледяной деионизированной  $H_2O$  и концентрирования в 80-90 раз. Электропорацию проводили с использованием 70 мкл клеток и  $\approx 100$  нг ПЦР-продукта на аппарате MicroPulser (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя. После электропорации клетки инкубировали в 1 мл среды SOC при 37 °С в течение 2-2,5 часов, после чего высевали на селективные чашки, которые инкубировали при 37 °С. Наличие введённой модификации проверяли с помощью ПЦР. Для удаления плазмиды rKD46 проводили рассевы клеток из отобранных колоний на L-агаре при 37 °С, и полученные колонии проверяли на чувствительность к ампициллину.

Сиквенирование ДНК во всех случаях проводили методом терминации дидезокси-цепи по Сэнгеру (*Sanger et al.*, 1977). Определение нуклеотидной ПС сахарозного транспозона Tn2555.3 осуществлялось вручную после субклонирования его фрагментов на векторах pUC18/19. Использовалась T4 ДНК-полимераза (Pharmacia, США).

Секвенирование при определении точек интеграции в хромосому mini-Mu кассет, а также направленных хромосомных модификаций осуществлялось с помощью набора «BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» на приборе «GeneAmp PCR System 2700» (Applied Biosystems, США). Реакции, праймированные флюоресцентными олигонуклеотидами, анализировали на автоматическом секвинаторе (ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Определённые ПС анализировали с помощью программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **2.6.2. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции**

Фрагменты ДНК для анализа полученных конструкций в хромосоме, а также для препаративных целей получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (*Mullis, Faloona, 1987*).

ПЦР проводили на приборах Thermo Hybaid PCR Sprint Temperature Cycling System (Thermo Hybaid, UK) и GeneAmp PCR System 9700 (Applied biosystems, USA) с использованием Taq ДНК-полимеразы (Силекс-М, Москва), *Pfu* ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва) в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя. Режим амплификации подбирали с учетом длины амплифицированного фрагмента и температуры отжига праймеров.

Для определения температуры отжига олигонуклеотида пользовались программами, доступными в Интернете (например, <http://micro.nwfsc.noaa.gov/protocols/oligoTmcalc.html>).

Получение ПЦР-продуктов для препаративных целей проводили в объемах 50 или 100 мкл реакционной смеси. Выделение и очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием набора QIAquick gel extraction kit (QIAGEN).

### **2.6.3. Картирование точек интеграции *Mu*-кассет в хромосоме *E. coli***

Фрагменты ДНК хромосомы, примыкающие к концам miniMu, амплифицировали для секвенирования с помощью так называемой «обратной ПЦР» (*Ochman et al., 1988*), т.е. использовались праймеры с противоположной ориентацией друг относительно друга. Чтобы получить матрицу для такой реакции хромосомная ДНК с интегрированной miniMu-кассетой обрабатывалась рестриктазой, имеющей сайт узнавания внутри этой кассеты. Рестрицированную хромосомную ДНК разводили до 0,5 мкг/мл и лигировали. Лигированную смесь переосаждали этанолом, растворяли в H<sub>2</sub>O и использовали в качестве матрицы в ПЦР. Для картирования по левому (Z1, Z2) или правому (Z3, Z4) концам Mu использовались пары праймеров, которые были

противоположно ориентированны относительно друг друга и имели гомологию внутри соответствующих *Mu*-концов. Амплифицированный фрагмент сиквенировали. В этом методе критичным являлся выбор рестриктазы. Рестриктазу подбирали таким образом, чтобы сайт её узнавания был не ближе к *Mu*-L или *Mu*-R-концам, чем ориентированные внутрь кассеты праймеры Z2 или Z4 соответственно. Так, при картировании по L-концу *Mu* использовалась рестриктаза *Bsp143I*, имеющая сайт узнавания внутри L-конца и рядом с ПС, гомологичной олигонуклеотиду Z2. Если реакция не проходила, пробовали другую рестриктазу.

#### 2.6.4. Конструирование плазмид *pMS1* и *pMDV3-P<sub>φ10</sub>-yddG*

Для получения интегративного вектора *pMS1* кластер генов *scr* из *pBRS5.2* клонировали в векторе *pM1* между концевыми ПС *Mu* в два этапа (Рисунок 2.2.). Сначала клонировали *SspI*-фрагмент ДНК, содержащий гены *scrYABR*, из плазмиды *pBRS5.2* с удалением фрагмента ДНК, содержащего ген *Km<sup>r</sup>*. Затем *BamHI*-фрагмент полученной плазмиды замещали *BamHI*-фрагментом, содержащим полноценный ген *scrK*, из *pBRS5.2*.

Для конструирования интегративного вектора *pMDV3-P<sub>φ10</sub>-yddG* фрагмент ДНК, содержащий *P<sub>φ10</sub>-yddG*, получали с помощью перекрывающейся ПЦР двух фрагментов ДНК. Первый фрагмент, содержащий *P<sub>φ10</sub>*, амплифицировали с ДНК плазмиды *pET-22b* с помощью праймеров P9 и P10. Второй фрагмент, содержащий кодирующую рамку *yddG*, получали с помощью праймеров P11 и P12, используя хромосомную ДНК штамма MG1655

в качестве матрицы. В перекрывающейся ПЦР использовали праймеры P9 и P12. Фрагмент ДНК, содержащий  $P_{\phi 10}$ -*uddG*, обрабатывали рестриктазами *Bgl*II и *Kpn*I и встраивали в вектор pMDV3-*Cm*<sup>r</sup> между концевыми ПС Му с помощью лигирования.

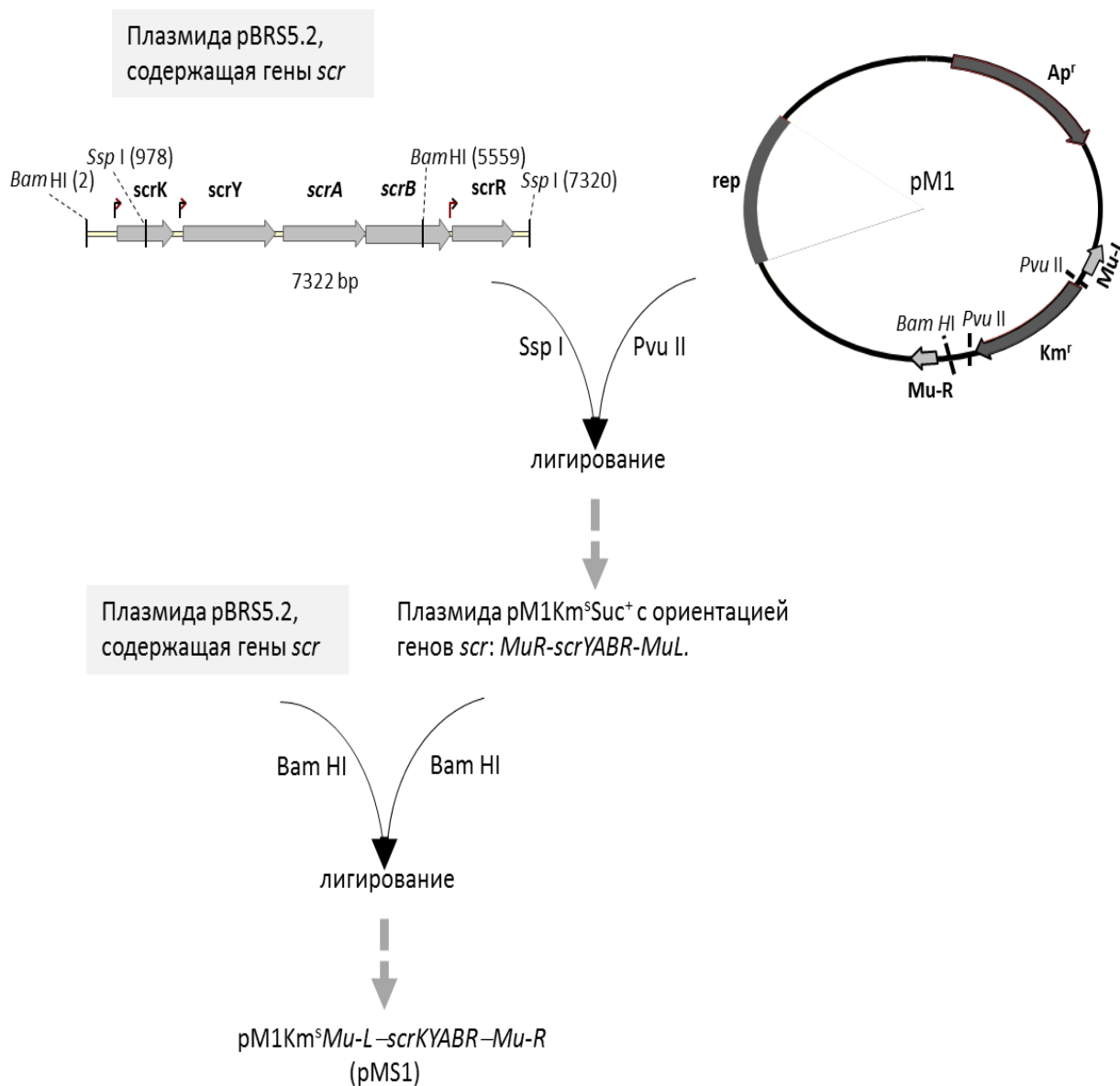


Рисунок 2.2 - Схема получения вектора pMS1, который использовался для интеграции генов *scr* в хромосому MG1655

### 2.6.5. Получение плазмид для экспрессии гена *ARO2* из *Saccharomyces cerevisiae* в *E. coli*

Для оптимизации экспрессии гена *ARO2* (Jones et al., 1991) в клетках *E. coli* его структурная часть (GeneBank:X60190) была химически синтезирована (Sloning BioTechnology GmbH, Германия) с заменой 42 редких для *E. coli* кодонов (Рисунок 2.3), наличие которых могло влиять на образование полноразмерного пептида (Гурский и др., 1992). Химически синтезированный ген был получен в составе плазмиды pSlo1.1.ARO2. Для проверки экспрессии гена *ARO2* в *E. coli* он был переклонирован в плазмиду pET-22b(+) по рестрикционным сайтам *Hind*III и *Nde*I.

Для интеграции оптимизированного гена *ARO2* в хромосому (раздел 2.7.8) получили плазмиду pAH162- $\lambda$ att-Km<sup>r</sup>-ARO2. Для этого структурная часть гена *ARO2* была переклонирована из плазмиды pSlo1.1.ARO2 по сайтам *Bam*HI и *Eco*RI.

Аналогичную плазмиду pAH162- $\lambda$ att-Km<sup>r</sup>-aroC, но с геном хорицмат-синтазы *E. coli* получили с помощью клонирования по сайтам *Pst*I и *Eco*RI фрагмента ДНК структурной части гена *aroC*. Этот фрагмент ДНК был амплифицирован с препарата хромосомной ДНК MG1655 (праймеры A1, A2).

Для клонирования генов *aroC* и *ARO2* в интегративном векторе pAH162- $\lambda$ att-Km<sup>r</sup>, который являлся условно репликативным, использовался штамм CC118.



## 2.7. Рекомбинационная инженерия *E. coli* MG1655

Делеции и инсерции в хромосоме штамма MG1655 получали с помощью Red-системы фага  $\lambda$ , источником которой являлась плаزمида pKD46. В отличие от оригинальной работы Даценко и Ваннера (Datsenko, Wanner, 2000) использовали удаляемый *in vivo* маркер  $\lambda attL-cat-\lambda attR$ , который амплифицировали с плазмиды pMW118- $Sm^r$ . Для осуществления модификаций хромосомы в клетки необходимого штамма трансформировали плазмиду pKD46, после чего электропорацией вносили полученный с помощью ПЦР необходимый фрагмент ДНК. Этот фрагмент, фланкированный короткими последовательностями (36 п.н.), необходимыми для сайт-специфической интеграции, включал  $\lambda attL-cat-\lambda attR$  и, в случае инсерций, интегрируемую последовательность. После отбора клонов-интегрантов на среде с хлорамфениколом и проверки интегрированных конструкций с помощью ПЦР, маркер  $Sm^r$  удалялся с помощью рекомбиназы фага  $\lambda$ , источником которой являлась плазмида pMWts- $\lambda Int/Xis$ . Излечение от термочувствительных плазмид pKD46 и pMWts- $\lambda Int/Xis$  проводили, инкубируя клетки при непермиссивной температуре (37°C или, в некоторых случаях, 42°C). После удаления  $Sm^r$  маркера оставался *attB* (31 п.н.). Полученные делеции и инсерции проверяли с помощью ПЦР, в которой использовались специфические на генетическую модификацию праймеры. Для уточнения спорных моментов фрагменты ДНК, амплифицированные с помощью проверочных праймеров, секвенировали.

### 2.7.1. Получение делеций генов

Праймеры для получения делеций одиночных генов *tyrA*, *pheA*, *tyrR*, *trpR*, *tnaA*, *purR*, *rpoS* планировали одинаковым образом, изложенным ниже, и в Таблицу 2.4 не были включены. Эти гены делетировали с сохранением рамки считывания. Это могло быть только в случае, если *attB* (31 п.н.) фага  $\lambda$ , остающийся после вырезания маркера, транслировался без стоп-кодона. При



транслировании ПС *attB* в шести рамках считывания определялась одна такая рамка: 5'-c-gct-caa-gtt-agt-ata-aaa-aag-cag-gct-tca-3'. С учётом этой рамки фрагмент ДНК, кодирующий  $\lambda attR-cat-\lambda attL$ , встраивали между первыми 11 и последними 12 кодонами удаляемого гена. Прямой праймер на начало гена включал один нуклеотид перед ATG-кодоном, 35 нуклеотидов кодирующей рамки и ПС  $\lambda attR$ : 5'-cgctcaagttagatataaaaaagctgaacgagaaacg. Обратный праймер на конец гена состоял из 36 нуклеотидов, включая стоп-кодон, и ПС  $\lambda attL$ : 5'-tgaagcctgctttttataactaagttggcattataa.

Делецию двух соседних генов *tyrA* и *pheA* получали с помощью праймеров D1 и D2. Делецию генов *edd-eda* получали с помощью праймеров D3 и D4, а генов *zwf-edd-eda* – с помощью праймеров D3 и D5.

### 2.7.2. Получение штаммов, продуцирующих L-гистидин

Мутация  $hisG^r$  из штамма VKPM В-7270 была введена в клетки MG1655<sup>+</sup> в две стадии с помощью P1 трансдукции. Первоначально ген *hisG* делетировали, как описано выше. Штамм MG1655<sup>+</sup> $\Delta hisG::Cm^r$  не рос на среде M9 без добавления гистидина. Замещение  $\Delta hisG::Cm^r$  на  $hisG^r$  восстанавливало рост на минимальной среде.

Модификация аттенюатора *his* оперона, обозначенная как *hisL'*- $\Delta$ , была введена в хромосому посредством интеграции фрагмента ДНК, который получали с помощью двух последовательных ПЦР. В первой реакции использовали праймеры P1, P2 и плазмиду pMW118- $Cm^r$  в качестве матрицы. Во второй реакции фрагмент, полученный в первой реакции, удлиняли (праймеры P1, P3).

### 2.7.3. Замена промотора перед геном *yddG* в хромосоме *E. coli*

Промотор P<sub>L</sub> и его ослабленный вариант P<sub>L1</sub> комбинировали с областью инициации трансляции (TIR) мРНК гена *lacZ*, которая содержала

нетранслируемую ПС перед АТГ-кодоном, включая ПС Шайна-Дальгарно, и, потенциально, трансляционный энхансер. Фрагменты ДНК « $\lambda attR-cat-\lambda attL-P_L-TIR_{lacZ}$ » и « $\lambda attR-cat-\lambda attL-P_{L1}-TIR_{lacZ}$ » для интеграции перед геном *yddG* дикого типа получали поэтапно. Сначала с помощью ПЦР получали фрагменты ДНК « $\lambda attR-cat-\lambda attL$ » (P4, P5), « $P_L-TIR_{lacZ}$ » (P6, P8), « $P_{L1}-TIR_{lacZ}$ » (P7, P8). Если первый фрагмент, как и в предыдущих случаях, амплифицировали с ДНК плазмиды pMW118-Cm<sup>r</sup>, то последние фрагменты амплифицировали с ДНК фага  $\lambda$ . ПС  $TIR_{lacZ}$  входила в состав праймера P8. Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазой BglII и лигировали фрагмент « $\lambda attR-cat-\lambda attL$ » с фрагментами « $P_L-TIR_{lacZ}$ » и « $P_{L1}-TIR_{lacZ}$ » по отдельности. После переосаждения ДНК из лигированных смесей этанолом и ресуспендирования в H<sub>2</sub>O ставили с их суспензий ПЦР с помощью праймеров P4 и P8. Праймер P4, специфичный на 3'-конце ПС  $\lambda attR$ , содержал 36 нуклеотидов, комплементарных ПС перед геном *yddG* в хромосоме. Праймер P8 с 5'-конца был комплементарен первым 36 нуклеотидам структурной части *yddG*, как схематично показано в следующем разделе на Рисунке 3.3.1.

Для замены промоторов, P<sub>φ10</sub> на P<sub>L</sub>, перед копией *yddG*, интегрированной в хромосому с помощью miniMu (*htrE::P<sub>φ10</sub>-yddG*), использовали фрагмент ДНК « $\lambda attR-cat-\lambda attL-P_L-TIR_{lacZ}$ », который получали с помощью ПЦР с хромосомной ДНК штамма BW25113P<sub>L</sub>-*yddG* Cm<sup>r</sup> и праймеров P8, P13. Последний праймер был комплементарен на 5'-конце ПС терминатора оперона *rrnB E. coli*, который располагался перед геном *yddG* в miniMu (Рисунок 3.3.5).

#### 2.7.4. Конструирование штаммов для изучения регуляции гена *yddG*

Для получение гена гибридного белка YddG'-LacZ с помощью рекомбинационной инженерии была получена делеция гена *lacZ* (P14, P15). Инактивация этого гена была проведена с сохранением рамки считывания, но без сохранения последних 12 кодонов для того, чтобы исключить интеграцию

фрагмента ДНК *lacZ* в исходное место локализации на хромосоме. Интеграцию *lacZ* вместо *yddG* не удалось отобрать в штамме MG1655 $\Delta$ *lacZ*, проводя селекцию на агаризованной среде LB с X-gal. Такая интеграция была получена в штамме MG1655 $\Delta$ *lacZ*P<sub>L</sub>-*yddG*. Фрагмент ДНК *lacZ* (P16, P17) без ATG-кодона интегрировали после 15 нуклеотида *yddG* с замещением его кодирующей области. Восстановление исходной регуляторной области *yddG* проводили в два этапа. Сначала регуляторную область P<sub>L</sub>-TIR<sub>lacZ</sub> замещали на кассету P<sub>lacUV5</sub>-*sacB-cat*, где ген *sacB* кодировал левансахаразу *Bacillus subtilis*. Фрагмент ДНК для получения с помощью ПЦР (P18, P19), используя в качестве матрицы плазмиду pRSFPlacsacB. Интеграцию этой кассеты отбирали по устойчивости к хлорамфениколу. Затем фрагмент ДНК, содержащий исходную регуляторную область *yddG* (P20, P21), амплифицированный с препарата хромосомы MG1655, интегрировали вместо P<sub>lacUV5</sub>-*sacB-cat*. Отбор клонов, утративших *sacB*, проводили на среде LB с добавлением сахарозы (20%) и ИПТГ.

Для получения штамма MG1655P<sub>lacI</sub>-*lacZ* ген *lacI*, локализующийся перед *lacZ* в хромосоме *E. coli*, удаляли полностью вместе с регуляторной областью *lacZ*, интегрируя на это место фрагмент  $\lambda$ *attR-cat-attL* (P22, P23). После удаления маркера Cm<sup>r</sup> между *lacZ* с собственным участком связывания рибосом и промотором P<sub>lacI</sub> оставался *attB*.

### 2.7.5. Конструирование штаммов, содержащих аллели *tyrA-ssrA*

Модификацию *tyrA-ssrA* в штамме MG1655 $\Delta$ *tyrR* получали в два этапа с помощью  $\lambda$ Red-интеграции (рис. 4.4.1). На первом этапе интегрировали *ssrA*-хвост, маркированный Cm<sup>r</sup>. Фрагмент ДНК для этой интеграции получали с помощью двух ПЦР. В первой реакции использовались праймеры P28, P29 и ДНК плазмиды pMW118-Cm<sup>r</sup> в качестве матрицы. Праймер P28 содержал 36 нуклеотидов, гомологичных 5'-концу гена *pheA*, и 27 нуклеотидов,

комплементарных области attL плазмиды pMW118- Cm<sup>r</sup>. Праймер P29 включал 30 нуклеотидов гена *ssrA*, терминирующий кодон ТАА и 27 нуклеотидов, комплементарных attR плазмиды pMW118- Cm<sup>r</sup>. Во второй ПЦР ДНК-фрагмент удлиняли используя праймеры P28, P30. Праймер P30 включал 36 нуклеотидов, комплементарных 3'-концу гена *tyrA*, и 18 нуклеотидов, гомологичных 5'-концу праймера P29.

Полученный ПЦР-продукт длиной ~ 1700 п.н. после переосаждения этанолом вводили в штамм MG1655Δ*tyrR*(pKD46) с помощью электропорации. Колонии Cm<sup>r</sup> проверяли на присутствие модификации *tyrA-ssrA* с помощью ПЦР и на ауксотрофию по Фен. В результате был получен штамм MG1655 Δ*tyrR* Δ*pheA::cat tyrA-ssrA*.

Маркер удалили посредством восстановления гена *pheA* с помощью вторичной λRed- интеграции. Фрагмент ДНК с геном *pheA* дикого типа был получен в ПЦР с использованием хромосомной ДНК MG1655 в качестве матрицы и праймеров P31 и P32. Штамм MG1655 Δ*tyrR tyrA-ssrA* рос на среде M9 без Фен, а также и без Тир.

Штаммы BW25113Δ*pheA::cat tyrA-ssrA*' , различающиеся модифицированными *ssrA*'-хвостами, получали также с помощью λRed-интеграции соответствующих фрагментов ДНК. Последние синтезировали с помощью ПЦР в два этапа. На первом этапе получали фрагмент «λ*attR-cat-attL -term\_rrnB*», используя ДНК плазмиды pMW118-Cm<sup>r</sup> в качестве матрицы и общий для всех конструкций праймер P28, который комбинировали с P33 для получения окончания LAA, с P34 – для LDD, с P35 – для AAV. Во второй реакции использовали очищенный ПЦР-продукт первой реакции в качестве матрицы и праймеры P36 и P37 для получения окончаний с одним или двумя остатками Ala соответственно. После получения штаммов BW25113Δ*pheA::cat tyrA-ssrA*' удаляли маркер Cm<sup>r</sup> с помощью введения плазмиды pMW-*int-xis*.

### 2.7.6. Тюнинг экспрессии гена *pgl* в продуценте фенилаланина DV157

Маркированные промоторы  $\lambda attR-cat-\lambda attL-P_{tac-900}$  и  $\lambda attR-cat-\lambda attL-P_{tac-3900}$ , присутствующие изначально перед геном *pgl* в производных BW25113, вносили в продуцент с помощью P1-трансдукции. Интеграции, замещающие природную регуляторную область гена *pgl*, отбирали по маркеру  $Cm^r$  и проверяли с помощью праймеров Z6, Z7 и Z6, Z8, где 3'-концы праймеров Z7 и Z8 были гомологичны ПС «-35» промоторов  $P_{tac-900}$  (ТТCACA) и  $P_{tac-3900}$  (ТТTGCA) соответственно.

### 2.7.7. Получение генетических модификаций $P_{tac-aroC}$ и $P_{tac-ARO2}$ в хромосоме

Этапы получения модификаций  $P_{tac-aroC}$  и  $P_{tac-ARO2}$  в хромосоме схематично показаны на рисунке 2.4.

Кодирующие области *ARO2* и *aroC* интегрировали в хромосому штамма TG1 $\Delta$ *aroC* по методу «Dual In/Out», разработанному в ОА «АГРИ» (Minaeva et al., 2008). Эта методика являлась модификацией способа интеграции в хромосому с использованием сайт-специфической системы рекомбинации фага  $\phi 80$  (Haldimann, Wanner, 2001). В дополнение к оригинальному методу, помимо создания искусственных сайтов  $\phi 80 attB$  в хромосоме (в данной работе не использовались), был модифицирован интегративный вектор рАН162, содержащий  $\phi 80 attP$ . Маркер  $Tc^r$  в рАН162 был заменён на вырезаемые с помощью рекомбиназы фага  $\lambda$  (плазмида рMWts- $\lambda$ Int/Xis), маркеры  $\lambda attL-Km^r-\lambda attR$  или  $\lambda attL-Tc^r-\lambda attR$ . Для интеграции *ARO2* и *aroC* в природный сайт  $\phi 80 attB$  использовались предварительно полученные плазмиды рАН162- $\lambda attL-Km^r-\lambda attR-ARO2$  и рАН162- $\lambda attL-Km^r-\lambda attR-aroC$  (см. раздел 2.6.5). Эти условно репликативные плазмиды (автономно поддерживающиеся только в штамме *pir*<sup>+</sup>) вводили в клетки штамма TG1 $\Delta$ *aroC*, содержащие плазмиду рАН123, которая была источником интегразы фага  $\phi 80$ . Колонии, выросшие на агаризованной среде LB+Km, содержали интегрированные в хромосому

плазмиды с *ARO2* или *aroC* (Рисунок 2.4). Наличие таких интеграций подтверждали с помощью ПЦР с суспензий клеток этих колоний в H<sub>2</sub>O и с использованием пар олигонуклеотидов, комплементарных ПС ДНК внутри *ARO2* или *aroC* и прилегающей к сайту  $\phi 80attB$  области хромосомы TG1 (праймеры Z8, Z9) соответственно. Термочувствительная плазида-помощник рАН123 легко утрачивалась после рассева клонов интегрантов до отдельных колоний на LB-среде и инкубации чашек при 37°C. После излечения от плазмиды рАН123 удаляли маркер Km<sup>r</sup> и репликон рАН162, который также находился между  $\lambda att$ -сайтами (Рисунок 2.4).

Для интеграции промотора P<sub>tac</sub> в безмаркерные штаммы TG1 $\Delta$ *aroC* $\phi$ 80*attL-ARO2- $\phi$ 80attR* и TG1 $\Delta$ *aroC* $\phi$ 80*attL-aroC- $\phi$ 80attR* трансформировали плазмиду рKD46. В полученные плазмидные штаммы вводили с помощью электропорации фрагменты ДНК с маркированным промотором « $\lambda attR-cat-\lambda attL-P_{tac}$ ». Эти фрагменты ДНК получали с помощью двух последовательных амплификаций. В первой реакции амплифицировали фрагмент ДНК « $\lambda attR-cat-\lambda attL-P_{tac}$ » с помощью праймеров А3 и А4 с препарата хромосомной ДНК штамма MG1655 $\lambda attR-cat-\lambda attL-P_{tac}-lacZ$ , предоставленного Каташкиной Ж.И. (ОА «АГРИ»). Во второй реакции полученный фрагмент удлиняли для интеграции перед *ARO2* и *aroC* с помощью праймеров А5 и А6 соответственно, которые использовали совместно с А3. В обоих случаях последовательность промотора, с -40 по +31 нуклеотид относительно старта мРНК (+1), была соединена с кодирующей частью генов, через 25 нуклеотидов, предшествующих *ARO2* в рЕТ-*ARO2*. Эти 25 нуклеотидов включали SD последовательность гена *10* фага T7 и, так называемый, трансляционный энхансер (Olins, Rangwala, 1989).

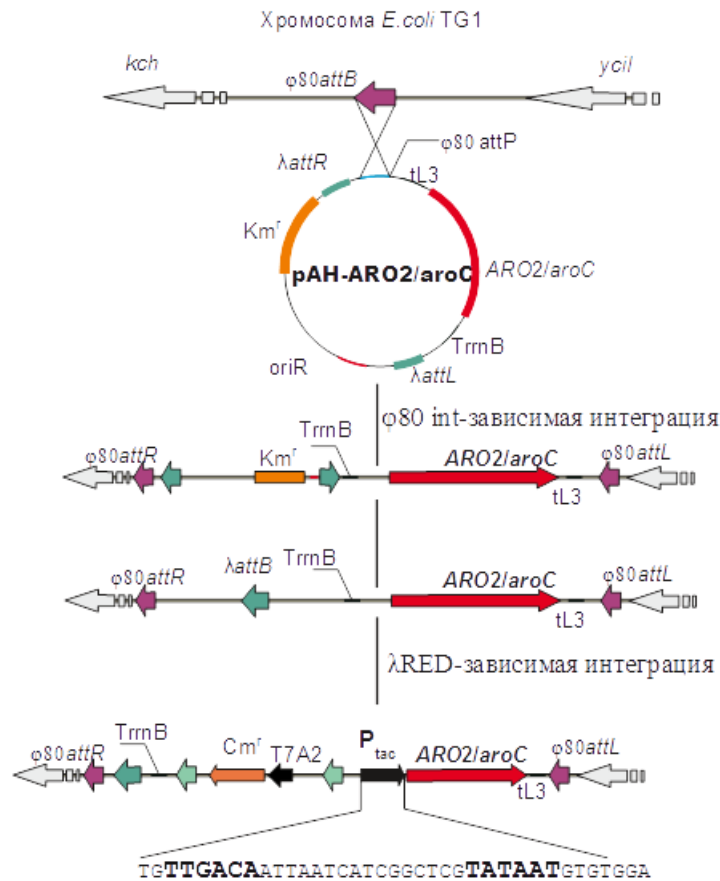


Рисунок 2.4 - Схема получения генетических модификаций P<sub>tac</sub>-*aroC* и P<sub>tac</sub>-*ARO2* в хромосоме

Структурная часть гена хоризматсинтазы обозначена красным. Сайты рекомбинации ферментов фагов  $\phi 80$  и  $\lambda$  обозначены фиолетовыми и зелёными цветами соответственно, гены маркеров – оранжевым. Показаны соседние к  $\phi 80 attB$  гены *kch*, *ycil* на хромосоме *E. coli*; терминаторы оперона *rrnB*, лидерного пептида треонинового оперона (tL3) – на интегративном векторе.

### 2.7.8. Замена нативного промотора *aroG* на промоторы генов Pho-регулона *phoA* и *pstS*

Промоторы P<sub>phoA</sub> и P<sub>pstS</sub> интегрировали перед геном *aroG4* с замещением собственного промотора P<sub>aroG</sub>. Ген *aroG4*, кодирующий устойчивую к Фен ДАНР-синтазу, находился в составе кассеты miniMu\_GAL (Рисунок 2.5).

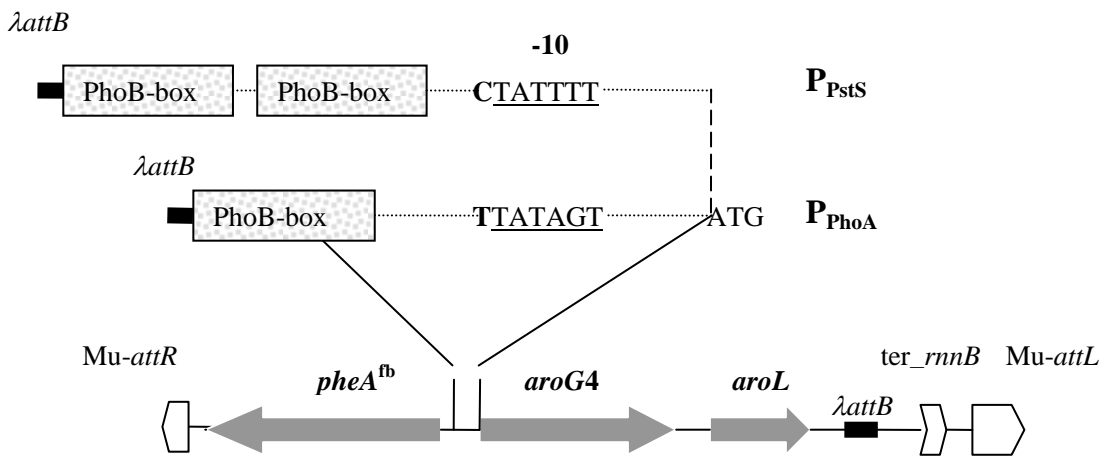


Рисунок 2.5 - Схема замещения нативного промотора *aroG4* промоторами  $P_{phoA}$  и  $P_{pstS}$  в касете miniMu\_GAL

Фрагменты ДНК промоторов амплифицировали с хромосомной ДНК штамма MG1655 и праймеров P40, P41 для  $P_{phoA}$ , и праймеров P42, P43 для  $P_{pstS}$ . Фрагмент ДНК с маркером амплифицировали с помощью праймеров P38, P39 и плазмиды pMW118-Cm<sup>r</sup> в качестве матрицы. Амплифицированные фрагменты ДНК после переосаждения этанолом обрабатывали рестриктазой BglII. Фрагменты ДНК « $\lambda attR$ -cat- $\lambda attL$ - $P_{phoA}$ » (P38, P41) и « $\lambda attR$ -cat- $\lambda attL$ - $P_{pstS}$ » (P38, P43) для интеграции получали с помощью ПЦР с соответствующих лигированных смесей.

## 2.8. Манипуляции с РНК

### 2.8.1. Выделение РНК

Тотальную РНК выделяли из клеток фенольным методом (Sambrook, Russell, 2001). Препараты РНК обрабатывали ДНКазой (Sigma, США), не содержащей РНКаз, в течение 2 ч при 37°C, с последующей экстракцией 1



объемом смеси фенол-хлороформ (1:1) и осаждением 2.5 объемами этанола (95%). Концентрацию РНК определяли, измеряя отношение абсорбции при 260/280 нм.

### **2.8.2. ПЦР, сопряженная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)**

Обратную транскрипцию проводили с использованием AMV-ревертазы (Sigma, США), праймера P24 и 1 мкг общей РНК согласно руководству (*Sambrook, Russell, 2001*). Реакционную смесь инкубировали 10 мин при 25°C, 60 мин при 42°C, прогревали 10 мин при 70°C и помещали в лед. Одновременно проводили контрольную реакцию без добавления AMV-ревертазы для выявления присутствия минорной ДНК. Затем проводили ПЦР-амплификацию кДНК, используя праймеры P24 и P25.

### **2.8.3. Определение стартовой точки транскрипции**

Определение стартовой точки транскрипции проводили с помощью метода “удлинения олигонуклеотидной затравки” (primer extension). Праймер P26 метили с помощью T4 полинуклеотидкиназы (Fermentas, Литва). Реакционная смесь включала прилегающий буфер для этого фермента, ~250 мкКи ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)АТР, 10 ед. T4 ПНК, 40 пмоль праймера. Реакцию проводили при 37°C в течение 10 мин, фермент инактивировали нагреванием при 95°C в течение 5 мин.

Обратную транскрипцию проводили с использованием AMV-ревертазы (Sigma, США), праймера ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)P26, тотальной РНК (1, 2, 3, 4 мкг) согласно руководству (*Sambrook, Russell, 2001*). Реакционную смесь общим объемом 20 мкл инкубировали 1 мин при 90°C, 1 мин в ледяной бане, 20 мин при 25°C и 30 мин при 42°C. Затем добавляли 0,5М CH<sub>3</sub>COONa, 80% спирт и 3 мкг тРНК и инкубировали 10-15 мин при -70°C для осаждения продуктов реакции.

Фрагмент ДНК промоторной области гена *yddG* был амплифицирован с препарата хромосомы MG1655 с помощью праймеров P26 и P27 и секвенирован по методу Сэнгера с использованием CycleReader DNA Sequencing Kit (Fermentas, Литва) и меченого праймера ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )P26.

Продукты реакций секвенирования и обратной транскрипции были денатурированы при 95°C 5 минут и проанализированы при помощи ПААГ-электрофореза (*Sambrook, Russell, 2001*).

## 2.9. Манипуляции с белками

### 2.9.1. Получение клеточных экстрактов и анализ белков

Клетки, выращенные в условиях эксперимента, осаждали центрифугированием (13200 об/мин, 5 мин), промывали 2-3 раза 0,9% NaCl и хранили в виде осадка при -65°C. Все манипуляции с клетками до и после этого проводили на холоду (+4°C).

Перед использованием клетки размораживали, ресуспендировали в необходимом буфере (К-фосфат или 0,9% NaCl, в случае щелочной фосфатазы). Полученную суспензию обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE 200 (Англия) до просветления. От клеточного дебриса избавлялись центрифугированием в течение 20 мин при 13200 об/мин. Супернатант использовали для измерения ферментативных активностей и анализа бактериальных белков с помощью SDS-ПААГ электрофореза (*Sambrook, Russell, 2001*).

Перед нанесением на гель полученный супернатант разбавляли равным объемом буфера для образцов (50 мМ трис-HCl, pH 6,8; 5%-ный SDS; 1,4 М 2-меркаптоэтанол; 10%-ный глицерин; 0,05%-ный бромфеноловый синий) и выдерживали в кипящей водяной бане в течение 15 мин. На дорожку наносили 10 – 15 мкг белка.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда (*Bradford, 1976*) с использованием реагента Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, США).

### **2.9.2. Двумерный электрофорез для протеомного анализа**

Проводили совместно с В. Ермашевым (ОА «АГРИ»).

Получение водорастворимой фракции белков для изоэлектрического фокусирования (IEF) проводили согласно руководству (*Rabilloud, Chevallet, 2000*). Образец для нанесения на pH-градиент содержал ~ 600 мкг общего белка в 200 мкл раствора (8 М мочевины, 1 М тиомочевины, 2% CHAPS, 10 мМ DTT, 0,5% IPG-буфера pH 4-7 (Amersham Pharmacia/GE Healthcare, Великобритания/США). IEF (Ettan IPGphor system; Amersham Pharmacia/GE Healthcare, Великобритания/США) осуществляли на пластине с иммобилизованным градиентом pH (IPG-пластина) 18 см при 500 В – 1 ч, 1000 В – 1 ч, 8000 В – 7 ч. После IEF IPG-пластину уравнивали в SDS-содержащем буфере (50 мМ Трис-НСl, pH 8,8, 6М мочевины, 30% глицерин, 2% SDS, 60 мМ DTT) в течение 20 мин и загружали на 12% SDS-ПААГ (20x25 см) (Ettan DALTsix electrophoresis System, Amersham Pharmacia/GE Healthcare, Великобритания/США). После электрофореза гели окрашивали в EZBlue™ (Sigma-Aldrich, США), сканировали и оцифровывали на PowerLook 1000 (Umax, США) для создания компьютерных изображений. Плотность пятна белка определяли количественно с помощью программного обеспечения Melanie-4 (SIB, Швейцария).

### **2.9.3. Идентификация белков из гелей с помощью масс-спектрометрии**

Масс-спектрометрический (MS) анализ образцов белка проводили в отделе протеомных исследований Института биомедицинской химии (Москва, Россия). Обработку гелей, трипсинолиз, экстракцию белка и масс-анализ

методом лазерной десорбции-ионизации во время пролета матрицы (MALDI-TOF) проводились в соответствии с протоколам, разработанными Говорун и др. (2003). Белок идентифицировали по набору его протеолитических пептидных масс, используя опцию Peptide Fingerprint программного обеспечения Mascot (Matrix Science, США, <http://www.matrixscience.com>). В процедуре поиска использовали информацию о геномах Национального центра биотехнологий США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## **2.10. Аналитические методы и определение ферментативных активностей**

### **2.10.1. Определение концентраций аминокислот, глюкозы, Pi**

Концентрации аминокислот в культуральной жидкости определяли с помощью тонкослойной хроматографии (*Krasikov et al.*, 2004). Разведённые образцы наносили на пластины «Сорбфил» (Сорбполимер, Россия) с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat V («САМАГ», Швейцария). Для определения ароматических аминокислот использовали мобильную фазу: изопропиловый спирт – этилацетат – вода – 25%-ный водный аммиак (16:16:5:3). Образцы после ферментации продуцента гистидина разгоняли в мобильной фазе: изопропанол-ацетон – 25%-ный водный аммиак – вода (12,5: 12,5: 3: 2). После окрашивания в растворе нингидрина (1%) в ацетоне концентрации аминокислот определяли количественным денситометрированием пластины на спектроденситометре TLC Scanner 3 («САМАГ», Швейцария). В качестве стандартов использовали растворы L-аминокислот (Ajinomoto, Япония).

Концентрации глюкозы определяли методом глюкозооксидазы с использованием анализатора глюкозы Biosen C-line Clinic (EKF- diagnostic GmbH, Германия).

Концентрации  $P_i$  определяли по изменении ОП при 340 нм с использованием «фосфорно-молибдатного реагента» (Dialab GmbH, Германия).

### 2.10.2. Тестирование секреции фенилаланина

Клетки штаммов DV157 и DV666 выращивали с аэрацией (240 об/мин, 37°C) в среде M9 с тирозином до ОП<sub>600</sub> ~ 2. Затем клетки отмывали 0,9% NaCl и концентрировали в два раза в среде M9 без тирозина. ОП<sub>600</sub> клеток при этом составляла 4 – 5, что соответствовало 2 – 3x10<sup>9</sup> колониеобразующих в мл. Клетки штаммов инкубировали при 37°C (240 об/мин). В указанное время пробы отбирали для анализа супернатантов и клеточных экстрактов на аминокислоты. Для определения внутриклеточной концентрации клетки из 1,5 мл центрифигировали через «сахарозную подушку» (60%). Содержимое экстрагировали с помощью хлорной кислоты (22%) и нейтрализовали 2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Концентрацию аминокислот определяли двумя методами: ВЖХ с использованием колонки Synergi Hydro-RP80R 250\_4.6mm 4 mm (Phenomenex) или с помощью аминокислотного анализатора (Hitachi L-8800 с разделительной колонкой # 2622SC-PF) в условиях, рекомендованных производителями с модификациями, разработанными в АО «АГРИ» (Новикова и др., 2006). Для вычисления внутриклеточной концентрации число клеток определяли с помощью титрования на чашках с LB. Клеточный объем считали равным 1мм<sup>3</sup>.

### 2.10.3. Определение активности β-галактозидазы

Определение активности проводили по модифицированному методу Миллера с использованием *O*-нитрофенил-β-D-галактопиранозида (Sigma-Aldrich, США) в качестве специфического субстрата (Miller, 1972). Ночную культуру разводили в 50, 20 или 10 раз в среде LB, M9 с глюкозой или глицерином соответственно, и выращивали при 37°C. 50 мкл бактериальной культуры ресуспендировали в 950 мкл Z-буфера (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM β-меркаптоэтанол, pH 7.0). Клетки лизировали добавлением 10 мкл 0.1% SDS и 20 мкл хлороформа, перемешивали на вортексе в течение 10 сек. и инкубировали 5 мин при 30°C; затем добавляли 200 мкл *O*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (4 мг/мл). Реакцию проводили в течение 10-20 мин до появления желтой окраски и останавливали добавлением 500 мкл 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Затем образцы центрифугировали при 13.2 тыс.об/мин в течение 5 мин и проводили измерение оптической плотности при 420 нм. Активность рассчитывали по формуле в единицах Миллера (EM):

$$\text{Активность} = 1000 \times \frac{OD_{420}}{t \times V \times OD_{600}}, \text{ EM}$$

Где *t* – время реакции, мин;

*V* – объем культуры, взятой для определения, в мл.

#### 2.10.4. Определение активности префенатдегидрогеназы

Ночную культуру, выращенную на среде M9, разводили до ОП<sub>600</sub> ~ 0,2 и подращивали до ОП<sub>600</sub> ~ 1,5 – 2 в зависимости от роста культуры 4- 8 ч. Клетки собирали центрифугированием из 10 мл культуры, промывали три раза 0,9% NaCl (0,9 мл) и хранили в виде осадка при –70°C. Клетки плохо растущего штамма, содержащего *tyrA-A-LAA*, подращивали до ОП<sub>600</sub> ~ 1 и собирали центрифугированием из 20 мл культуры. Для приготовления клеточных экстрактов клеточные осадки ресуспендировали в 600 мкл буфера: 50 mM Трис-НСl, pH=7,5; 0,5 mM EDTA; 2 mM фенилметилсульфонил фторид. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE 200 (Великобритания) при 4°C. От клеточного дебриса освобождались центрифугированием (13.2 тыс.об/мин; 4°C; 20 мин). Полученные препараты высаливали в течение ночи 4 объёмами 4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Белок растворяли в буфере: 100 mM Трис-НСl, pH 7,5; 20 mM KCl; 2 mM DDT; 0,5 mM EDTA с 10% глицерином и без. Реакционная смесь (1 мл) содержала 100 mM Трис-НСl, pH 7,5; 0,5 mM

префената натрия (Sigma-Aldrich, США); 0,5 мМ NAD<sup>+</sup>; 50 мкл клеточного экстракта (0,2 – 0,4 мг белка на пробу). Реакцию проводили 1 мин. при 37° С. Конверсия NAD в NADH, эквивалентная окислительному декарбоксилированию префената, фиксировалась спектрофотометрически по ОП<sub>340</sub>. Для контроля использовали клетки *ΔtyrA-pheA*, в экстракте которых увеличения ОП<sub>340</sub> в условиях эксперимента не происходило. Удельную активность рассчитывали по формуле (t – время реакции, мин):

$$\text{Уд. активность} = \frac{\text{ОП}_{340} \times 1000}{6,22 \times t \times \text{мг}}, \text{ нмоль/мин мг}$$

### 2.10.5. Определение активности 6-фосфоглюконолактоназы

Для получения клеточного экстракта ночную культуру, выращенную на минимальной среде M9, содержащей 1% глюкозы, разводили в 50 раз той же средой и подращивали до OD<sub>540</sub> ~ 1,0. Клетки из 10 мл культуры собирали центрифугированием и ресуспендировали в 400 мкл буфера, содержащего К-фосфат, рН=7,4; 2 мМ фенилметилсульфонил фторид. Разрушение клеток ультразвуком и центрифугирование от клеточного дебриса проводили, как описано в п. 3.9.2. Для определения активности 6-фосфоглюконолактоназы (6PGL) использовался известный метод (*Collard et al.*, 1999). δ-6-фосфоглюконолактон получали непосредственно в реакционной пробе объемом 1 мл, содержащей 50 мМ глюкозо-6-фосфата; 0,2 мМ NADP; 25 мМ HEPES рН=7,1; 2 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1,75 ед. глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (G6PDH from *torula yeast*, Sigma-Aldrich, США), при 30°С. Ход процесса контролировали спектрофотометрически по увеличению ОП<sub>340</sub> за счет образования NADPH. Когда оптическая плотность раствора достигала плато, в реакционную пробу добавлялись 0,5 ед. G6PDH и исследуемую пробу. Вновь исследовалось изменение ОП<sub>340</sub>. Дальнейшее возрастание оптической плотности было обусловлено продолжением образования NADPH в результате образования D-рибулозо-5-фосфата из 6-фосфоглюконата с помощью фосфоглюконат-

дегидрогеназы. Для контроля на спонтанный гидролиз  $\delta$ -6-фосфоглюконолактона добавляли такой же объем буфера вместо пробы. За 1 единицу активности фермента принималось количество необходимое для гидролиза 1 мкмоль 6-фосфоглюконолактона в минуту в этих условиях.

### 2.10.6. Определение активности щелочной фосфатазы

Клетки из ферментационных проб собирали центрифугированием, промывали три раза 0,9% NaCl (0,9 мл) и хранили в виде осадка при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Для приготовления клеточных экстрактов биомассу ресуспендировали в 600 мкл 0,9% NaCl. Клетки разрушали ультразвуком и далее освобождались от клеточного дебриса центрифугированием, как описано выше. После чего клеточный экстракт немедленно использовали для определения ферментативной активности.

Активность щелочной фосфатазы определяли как описано Спира и др. (*Spira et al.*, 1995) с использованием в качестве субстрата *p*-нитрофенилфосфата (pNPP) (Sigma-Aldrich, США). Реакционная смесь содержала 990 мкл 0.5M Tris-HCl (pH 8.0), 1мM MgCl<sub>2</sub> и 1.2 мM pNPP. При тестировании ингибирования фермента каждую из АА добавляли до концентрации 5 мM. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл клеточного экстракта. Реакционную смесь инкубировали несколько мин при 37°C до появления желтой окраски. Добавляли 200 мкл 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и измеряли оптическую плотность при длине волны 410 нм. Удельную активность рассчитывали по формуле (*t* – время реакции, мин):

$$\text{Уд. активность} = \frac{ОП_{410} \times 1000000 \times 1,2}{16200 \times t \times m_2}, \text{ нмоль/мин мг}$$



### 2.10.7. Определение активности ДАНР-синтазы

Клеточные экстракты готовили так же, как для определения щелочной фосфатазы.

Активность ДАНР-синтазы определяли с помощью тиобарбитурового метода (*Gollub et al.*, 1970; *Schoner, Herrmann*, 1976). Реакционная смесь (200 мкл) содержала 2 мМ фосфоенолпирувата (Sigma-Aldrich, США), 2 мМ эритрозо-4-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 0.1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфера (pH 6.5) и  $\text{H}_2\text{O}$ . Реакцию инициировали добавлением 10-20 мкл бесклеточного экстракта. Реакционную смесь инкубировали 10 мин при 37°C, охлаждали в ледяной бане и добавляли 80 мкл 25 мМ  $\text{NaJO}_4$  в 0.125 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , выдерживали 10 мин при 37°C. После охлаждения добавляли 160 мкл 2% раствора  $\text{NaAsO}_2$  в 0.5 М  $\text{HCl}$ , перемешивали на вортксе в течение 2-3 сек до исчезновения окраски и добавляли 320 мкл 0.3% тиобарбитуровой кислоты (Sigma-Aldrich, США) в смеси 1 М  $\text{NaOH}$  и 1М  $\text{HCl}$ . Смесь нагревали (100°C, 10 мин), охлаждали на ледяной бане и добавляли 600 мкл ацетона. После центрифугирования при 13 тыс. об/мин в течение 1 мин измеряли оптическую плотность при 549 нм. Удельную активность рассчитывали по формуле:

$$\text{Уд. Активность} = \frac{\text{ОП}_{549} \times 13,6}{3,3 \times \text{мг}}, \text{ нмоль/мин мг белка}$$

### 2.11. Анализ метаболических потоков

Сравнительный анализ центрального метаболизма в продуценте фенилаланина и производных лабораторного штамма MG1655 проводили совместно с А. Киверо (ОА «АГРИ») посредством определения коэффициентов метаболических потоков (Metabolic Flux Ratio Analysis (METAFor)). Этот метод основан на биосинтетически направленном дробном включении  $^{13}\text{C}$ -метки в протеиногенные аминокислоты при росте клеток на минимальной среде, содержащей смесь глюкозы, ( $^{13}\text{C}_6$ )-меченной и с природным изотопным содержанием, в качестве единственного источника углерода (*Szyperski*, 1995;

*Sauer et al.*, 1999). Коэффициенты или соотношения метаболических потоков определяли после анализа свободных аминокислот, полученных после гидролиза белков, с помощью двумерной гетероядерной ( $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ) - корреляционной спектроскопии (2D ( $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ) -COSY) и идентификации неслучайных  $^{13}\text{C}$ -меченных паттернов двух и трёх-углеродных фрагментов, т.е. фрагментов, происходящих из одной молекулы глюкозы.

Для получения гидролизата белков клетки осаждали центрифугированием из 250 мл среды (см. раздел 2.4.3). Дважды промывали 0,9% NaCl и разрушали ультразвуком. От клеточного дебриса освобождались центрифугированием (20 мин, 19000 g). Белки из супернатанта осаждали с помощью добавления равного объёма  $\text{HClO}_4$  (10%), последующей инкубации при  $70^\circ\text{C}$  (40 мин) и центрифугирования (20 мин, 19000 g). Осадок промывали 70%-ным этанолом. Полученный таким образом суммарный клеточный белок гидролизovali в 6 M растворе HCl при  $110^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Для проведения корреляционной спектроскопии гидролизаты белков лиофилизировали.

2D ( $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ) -корреляционная спектроскопия гидролизатов клеточных белков была выполнена сотрудниками ФГБУ «ИБХ им. акад. М.М. Шимякина и Ю.А. Овчинникова РАН» под руководством проф. А.С. Арсеньева.

В спектрах белковых гидролизатов наблюдались сигналы от 16 из 20 аминокислот, кроме Три, Глю, Асп и Цис, которые окислялись при гидролизе. Количественный анализ полученных экспериментальных данных проводился с помощью программного обеспечения, реализованного в среде Mathematica<sup>TM</sup> («Wolfram Research», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Получение генетически стабильных штаммов-продуцентов *E. coli*, способных утилизировать сахарозу

#### 3.1.1. Анализ первичной структуры одного из вариантов сахарозного транспозона Tn2555

С помощью рестрикционного анализа было идентифицировано пять, различающихся по структуре, инсерций сахарозного транспозона Tn2555 в плазмиду RP4, обозначенных как Tn2555.1 – Tn2555.5 (Дорошенко, 1988). Одна из этих инсерций Tn2555.3 транспозировалась в плазмиду pBR325 (там же).

Исследование этой инсерции было продолжено. Первичная структура Tn2555.3 из плазмиды pBRS5.2 (рис. 3.1) была определена и проанализирована (GeneBank:AY485150). Структура Tn2555.3 представлена на Рисунке 3.1А. Кластер генов утилизации сахарозы оказался полностью идентичным (4 нуклеотидные замены) генам *scr* из плазмиды pUR400. Инсерционная последовательность, присутствующая в Tn2555.3 в трёх копиях (было установлено ранее), соответствовала элементу IS26 (Mollet *et al.*, 1983). Внутренняя копия IS26 в Tn2555.3 отделяла кластер генов *scr* (~ 7 т.п.о.) от незначительной области (~ 4 т.п.о.). ПС последней не содержала протяжённых открытых рамок считывания.

С помощью рестрикционного анализа была установлена структура Tn2555.1 (Рисунок 3.1Б), интегрированного в RP4. Tn2555.1 отличался от Tn2555.3 инверсией частей, содержащих и не содержащих гены *scr*.

Известно было, что элемент IS26 перемещается по механизму образования коинтегратов и их последующего разрешения посредством гомологичной рекомбинации (Galas, Chandler, 1989). Секвенирование не выявило существенных мутаций в гене транспозазы каждой из копий IS26. Поэтому перемещение сахарозных генов в другой репликон могло происходить в результате независимых транспозиций каждой из трёх копий этого элемента.

Предположительно Tn2555.3 мог превратиться в Tn2555.1 в результате образования коинтеграта, индуцированного внутренней копией IS26.

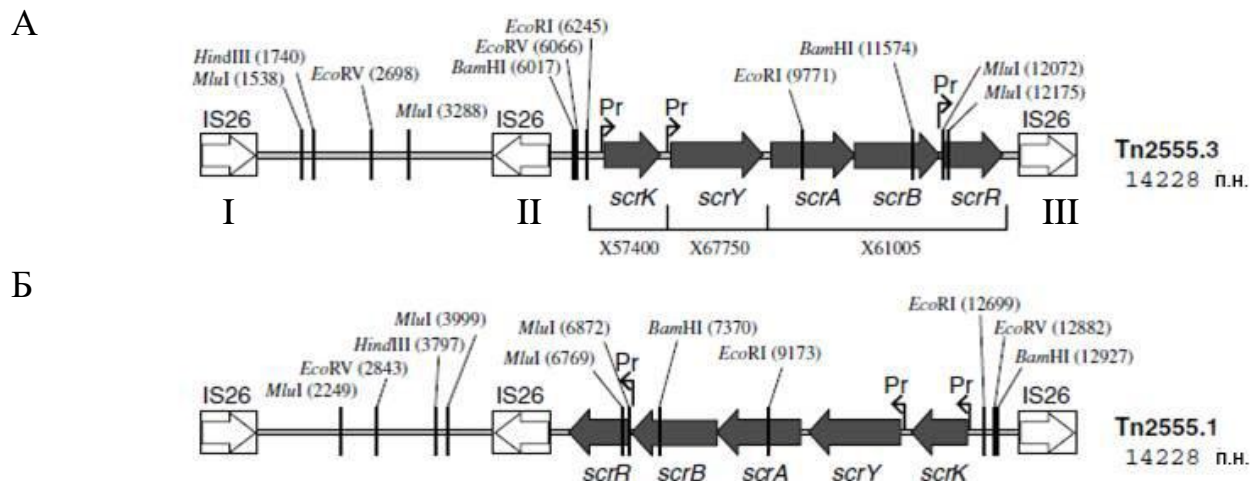


Рисунок 3.1 - Структуры Tn2555.3 (А) и Tn2555.1 (Б)

Ниже генов *scr* в Tn2555.3 указаны номера последовательностей фрагментов (GeneBank) из плазмиды pUR400. Показаны сайты рестриктаз, которые использовались для анализа коинтегратов (Раздел 3.1.2).

### 3.1.2. Модель транспозиции Tn2555

Предположив, что каждая из трёх копий IS26 в Tn2555.3 может индуцировать образование коинтегратов, мы рассмотрели три варианта коинтегратов донорного и реципиентного репликонов, подразумевая плазмиды pBR325::Tn2555.3 и RP4 соответственно (Рисунок 3.2А). После разрешения коинтегратов I и III, опосредованных концевыми копиями IS26, в реципиентном репликоне мог оказаться Tn2555.3, а после разрешения коинтеграта II, опосредованного внутренним элементом IS26, – Tn2555.1 (Рисунок 3.2Б).

Для проверки предполагаемой модели перемещения Tn2555.3 был проведен эксперимент по отбору транспозиций Tn2555.3 из pBRS5.2 в RP4.

Конъюгативная плазмида RP4 могла мобилизовать перенос pBRS5.2 в реципиентный штамм после образования коинтеграта между ними. Чтобы коинтегра́т образовывался в результате транспозиции, а не гомологичной рекомбинации использовали  $\text{RecA}^-$  штамм HB101. Клетки этого штамма, содержащего плазмиды pBRS5.2 и RP4 скрещивали с клетками штамма W3350. Частота возникновения транско́ньюгантов  $\text{Cm}^f$  или  $\text{Suc}^+$  составляла  $\sim 10^{-6}$  на клетку реципиента. Частота мобилизации pBR325 плазмидой RP4 в контрольном скрещивании не превышала  $\sim 10^{-9}$ .

Из восьми независимо полученных транско́ньюгантов  $\text{Cm}^f\text{Suc}^+$  была выделена и проанализирована плазмидная ДНК. В двух транско́ньюгантах присутствовали неразрешённые коинтегра́ты. Анализ их структуры с помощью рестриктаз *MluI* и *HindIII* показал, что в одном случае коинтегра́т был образован IS26-I, а в другом – IS26-III, то есть это были коинтегра́ты I и III типов (Рисунок 3.2А). Такие коинтегра́ты, помимо общих фрагментов, имели характерные *HindIII*-фрагменты размерами  $\sim 14$  и  $5,6$  т.п.о. соответственно и одинаковый *MluI*-фрагмент размером  $8,8$  т.п.о. Последний фрагмент должен был отсутствовать у коинтегра́та II, для которого были бы характерны *HindIII*-фрагмент размером  $5,6$  т.п.о. и *MluI*-фрагмент размером  $9,6$  т.п.о.

Пять транско́ньюгантов содержали по две плазмиды, похожие на RP4 и pBR325. Последние плазмиды соответствовали pBR325::IS26. Их размер составлял  $\sim 7$  т.п.о., вместо  $\sim 6$  т.п.о. для pBR325 и они имели по два сайта рестриктаз *PstI* и *SalI*, которые по одному присутствовали в pBR325 и в IS26. Для того, чтобы отделить от pBR325::IS26 и проанализировать плазмиды RP4-типа, их переносили при помощи конъюгации из W3350 в штамм HB101. Все проверенные ( $\sim 30$  от каждого скрещивания) транско́ньюганты  $\text{Km}^f\text{Str}^f$ , где последний маркер соответствовал штамму HB101, были  $\text{Suc}^+\text{Cm}^s$ . Таким образом, эти клоны должны были содержать плазмиду RP4::Tn2555. Рестрикционный анализ плазмидной ДНК, выделенной из этих клонов, подтвердил это предположение. Клоны от четырех скрещиваний содержали плазмиду типа RP4::Tn2555.3, а клон от одного скрещивания – RP4::Tn2555.1.

Структуры Tn2555.1 и Tn2555.3 различались наличием *Mlu*I-(2,8 и ~ 8,8 т.п.о.) и *Eco*RV-фрагментов (~10 и 3 т.п.о.).

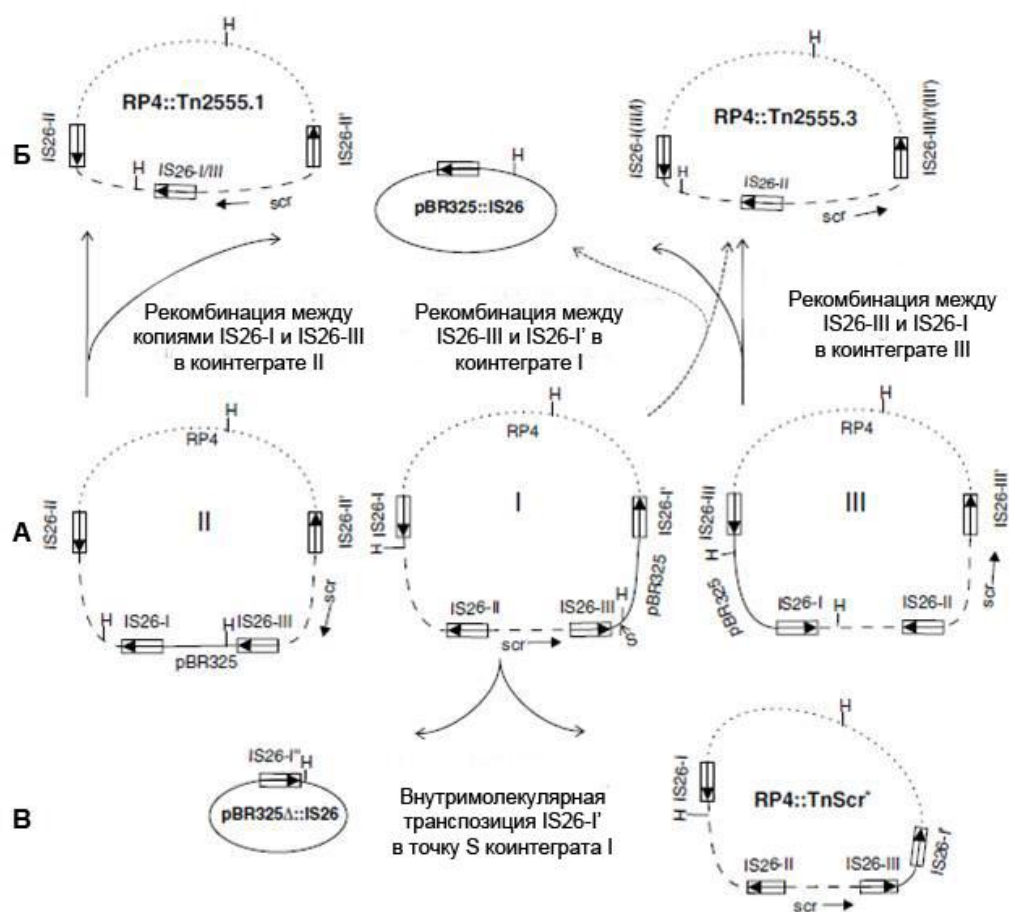


Рисунок 3.2 - Модель перемещения генов *scr*, находящихся в составе Tn2555.3

(А) Варианты коинтегратов pBR325::Tn2555.3 и RP4, образованные I, II или III копией IS26. Нумерация копий IS26 в составе Tn2555.3 показана на Рисунке 3.1А.

(Б) Образование RP4::Tn2555.1 и RP4::Tn2555.3. Гипотетическое образование нового сахарозного транспозона TnScr (В).

Обозначен сайт расщепления рестриктазой *Hind*III (H), с помощью которых анализировали продукты транспозиции.

В клетках восьмого трансконъюганта, помимо плазмиды RP4-типа, присутствовал делеционный вариант плазмиды pBR325, содержащий IS26 (pBR325Δ::IS26). Присутствие плазмиды pBR325Δ::IS26 свидетельствовало о внутримолекулярной транспозиции внутри коинтеграта, которая приводила к

разъединению репликонов и, следовательно, к образованию нового сочетания последовательностей в сахарозном транспозоне. На Рисунке 3.2В представлен возможный вариант образования плазмиды pBR325Δ::IS26 и RP4::TnScr, где TnScr – новый вариант сахарозного транспозона, содержащий четыре копии IS26. Новые варианты Tn2555, содержащие три копии IS26, могли образоваться в результате внутримолекулярной транспозиции IS26-II в pBR325 в коинтеграте II.

По терминологии Галаса и Чандлера (*Galas, Chandler, 1989*), Tn2555 являлся псевдосоставным транспозоном. Как составной транспозон он был фланкирован копиями IS-последовательности, но при этом не перемещался как единое целое.

Последующие работы, цитирующие нашу статью о модели транспозиции Tn2555 (*Doroshenko, Livshits, 2004*), касались исследований распространения генов лекарственной устойчивости с помощью IS26. Помимо участия IS26 в образовании локусов множественной лекарственной устойчивости в плазмидах энтеробактерий (*Miriagou et al., 2005*) и опосредованной IS26 интеграции генов множественной лекарственной устойчивости в хромосому *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* (*Daly et al., 2005*) сообщалось также об участии IS26 в переносе гена β-лактамазы широкого спектра действия из хромосомы *Klebsiella pneumoniae* в другие энтеробактерии (*Zienkiewicz et al., 2013*). Гены *scr*, возможно, также были перенесены с помощью IS26 из хромосомы *K. pneumoniae* в плазмиды энтеробактерий. По данным К. Джариса (личное сообщение) IS26 был также обнаружен по соседству с генами *scr* в плазмиде pUR400.

Таким образом, было установлено, что Tn2555 не содержал дополнительных генов, кроме генов *scr*, которые бы способствовали росту клеток на сахарозе. В то же время, способ перемещения генов утилизации сахарозы из Tn2555 был неоднозначен и не позволял получать штаммы с генетически детерминированной структурой.

### 3.1.3. Интеграция генов *scr* в хромосому *E. coli*

Для получения стабильных интеграций генов *scr* в хромосоме использовали технологию miniMu-интеграции. Для этого был получен интегративный вектор pMS1 и гены *scr* интегрировали в хромосому *E. coli* MG1655 с помощью транспозиции miniMu-*scrKYABR* (Patent EP 1149911). Интеграции генов *scr* переносили с помощью фаговой трансдукции в штаммы-продуценты, которые проверяли в пробирочных ферментациях на продукцию соответствующих аминокислот. В дальнейшем использовали интеграции, которые не снижали показателей штамма при культивировании на глюкозе. Точки интеграций определяли с помощью «обратной ПЦР» (Зименков и др., 2004). В том числе, была получена интеграция генов *scr* в ген *ebgA*, локализующийся на 69,4 мин. ген. карты *E. coli*.

### 3.1.4. Продукция триптофана и фенилаланина из сахарозы в *E. coli*

Для получения ароматических аминокислот из сахарозы в продуценты вводили , как вновь полученный кластер генов *scr*, интегрированных в хромосому (*ebgA::scrKYABR*), так и кластер сахарозных детерминантов *csc* (*dsd::cscB1KAR*). Последний использовали для сравнения разных систем утилизации сахарозы. Источником генов *csc*, являлся штамм LJ200, любезно предоставленный К. Джарисом (ФРГ). Этот штамм содержал ген *cscB1*, кодирующий мутантную сахарозную пермиазу с увеличенной активностью. Оба локуса переносили с помощью трансдукции фагом T4GT7. Клоны трансдуктантов отбирали на минимальной среде с сахарозой в качестве источника углерода и необходимыми добавками для каждого из продуцентов.

Выход Три из сахарозы был примерно одинаков для производных продуцента SV164(pGH5), содержащих гены *scr* или *csc* (Таблица 3.1). В обоих случаях выход Три из сахарозы превышал выход из глюкозы на 1-1,5%. Оба



кластера сахарозных генов давали преимущества в получении Три из сахарозы по сравнению с глюкозой, но их эффекты на продукцию были одинаковы.

Таблица 3.1 - Продукция *L*-триптофана при ферментации в пробирках

Штамм	Глюкоза, 40 г/л			Сахароза, 40 г/л		
	ОП <sub>540</sub>	Три, г/л	Выход, %	ОП <sub>540</sub>	Три, г/л	Выход, %
–	6,0	5,0	12,5	–	–	–
<i>scr</i>	6,2	5,1	12,7	6,2	5,5	13,7
<i>csc</i>	6,0	5,0	12,5	6,2	5,6	14,0

В отличие от продуцента Три производные *Suc*<sup>+</sup> от продуцента фенилаланина DV1017 с генами *scr* и *csc* отличались по показателям на среде с сахарозой (Таблица 3.2). Для штамма DV1017*csc* продукция фенилаланина из сахарозы была примерно в два раза ниже. В то время как показатели штаммов DV1017*scr* и DV1017*csc* на среде с глюкозой были примерно одинаковы.

Таблица 3.2 - Продукция *L*-фенилаланина при ферментации в аппаратах

Штамм	Источник	ОП <sub>540</sub>	Выход, %	Укс., г/л	μ, ч <sup>-1</sup>	
DV1017	углерода					
	<i>scr</i>	глюкоза	37±1	16±1	0,8±0,2	0,14
		сахароза	38±4	15,7±0,3	1,5±0,1	0,13±0,01
<i>csc</i>	глюкоза	36±1	15±2	1,1±0,4	0,14±0,01	
	сахароза	35±4	8,2±0,5	0,4±0,2	0,18±0,01	

Ферментацию Фен проводили в аппаратах, поэтому штаммы сравнивали не только по количеству накопленного Фен, но и по скорости роста и накоплению органических кислот. На сахарозе DV1017*csc* рос быстрее и

меньше накапливал уксусной кислоты, в отличие от DV1017*scr*. Это согласовывалось с известным фактом, что метаболизм природного штамма *E. coli* W с генами *csc*, при росте на сахарозе сопровождался активацией цикла трикарбоновых кислот и низким накоплением уксусной кислоты (Раздел 1.3.4).

Таким образом, нами было показано, что искусственно интегрированный кластер генов *scr*, наряду с природным кластером генов *csc*, обеспечивает получение продукции ароматических аминокислот из сахарозы. При этом, гены *scr* давали устойчивый результат по продукции независимо от штамма, в отличие от генов *csc*. При использовании последних наблюдалось снижение продукции аминокислоты на среде с сахарозой, по сравнению с глюкозой для некоторых штаммов. Поскольку при культивировании на сахарозе метаболизм мог изменяться (о чём, в частности, свидетельствовали различия в накоплении уксусной кислоты), то для максимизации продукции аминокислот из сахарозы могла потребоваться дополнительная коррекция клеточного метаболизма.

### 3.2. Получение модельных продуцентов с помощью рекомбинационной инженерии

Рекомбинационная инженерия позволяла получать штаммы с известной первичной структурой. Для характеристики экспортёра ароматических аминокислот были получены делеционные варианты MG1655 (GeneBank:U00096), продуцирующие Фен, Тир, Три. Как видно из Таблицы 3.3, Фен или Тир начинали накапливаться в культуральной жидкости после инактивации конкурирующего биосинтеза:  $\Delta tyrA$  и  $\Delta pheA$  соответственно (строки 1 – 3).

Поскольку все делеции были выполнены с сохранением рамки считывания, то после вырезания маркера должна была сохраняться природная регуляция оперонов  $pheL - \Delta pheA$  и  $aroF - \Delta tyrA$ , которые транскрибировались навстречу друг другу и регулировались, в том числе, и транскрипционной интерференцией (Раздел 1.2.3.2). Поэтому на ферментационных средах с добавленными Тир или Фен, экспрессия генов  $pheA$  или  $tyrA$  должна была, соответственно, возрасть в штаммах MG1655 $\Delta tyrA$  или MG1655 $\Delta pheA$ . Именно этим обстоятельством мы объяснили различие в эффектах от инактивации регулятора общего ароматического пути TyrR на продукцию Тир и Фен, повышение и снижение, соответственно (Таблица 3.3, строки 5, 6), по сравнению с исходными штаммами (там же, строки 2, 3). Если оперон  $pheL - pheA$  регулировался Фен посредством аттенуации, то оперон  $aroF - tyrA$  репрессировался TyrR в присутствии Тир. В результате экспрессия оперона  $pheL - pheA$  должна была подавляться сильнее в MG1655 $\Delta tyrA \Delta tyrR$ , чем в MG1655 $\Delta tyrA$ . Последний штамм продуцировал больше Фен. Инактивация репрессора TyrR положительно сказывалась на продукции Фен в штамме с дополнительной копией гена  $pheA^{fbr}$ , кодирующей устойчивый к ретроингибированию фермент, который был интегрирован в хромосому отдельно от оперона  $aroF - \Delta tyrA$  (Раздел 3.4).

Для получения продукции Три, помимо конкурирующих путей биосинтеза Тир и Фен, необходимо было инактивировать катаболизм Три (ген *tnaA*, кодирующий триптофазану) и транскрипционный репрессор TrpR (Таблица 3.3, строки 7, 8).

Таблица 3.3 - Накопление Фен, Тир и Три в ферментации в пробирках

№	Штамм MG1655	АА, 0,125 г/л	ОП <sub>540</sub>	Фен, г/л	Тир, г/л	Три, г/л
1	–	–	30 $\pm$ 3	<0,01	<0,01	<0,01
2	$\Delta$ <i>tyrA</i>	Тир	30 $\pm$ 5	<b>0,8<math>\pm</math>0,2</b>	<0,01	<0,01
3	$\Delta$ <i>pheA</i>	Фен	29 $\pm$ 2	<0,01	<b>0,8<math>\pm</math>0,4</b>	<0,01
4	$\Delta$ <i>tyrR</i>	–	~ 30	<0,1	0,1-0,2	<0,01
5	$\Delta$ <i>tyrA<math>\Delta</math><i>tyrR</i></i>	Тир	26 $\pm$ 3	<b>0,4<math>\pm</math>0,1</b>	<0,01	<0,01
6	$\Delta$ <i>pheA<math>\Delta</math><i>tyrR</i></i>	Фен	21 $\pm$ 3	<0,01	<b>2,5<math>\pm</math>0,5</b>	<0,01
7	$\Delta$ <i>tyrA<math>\Delta</math><i>trpR</i></i>	Тир	~ 25	~ 0.3	<0,01	<0,01
8	$\Delta$ <i>trpR<math>\Delta</math><i>tnaA<math>\Delta</math><i>tyrA</i>-<i>pheA</i></i></i>	Тир, Фен	30 $\pm$ 1	<0,01	<0,01	<b>0,8<math>\pm</math>0,2</b>

На примере получения продуцента гистидина было продемонстрировано конструирование штамма посредством последовательного комбинирования нескольких генетических модификаций (Дорошенко и др., 2013).

В отличие от АА, конкурирующих друг с другом за общий предшественник, биосинтез гистидина из фосфорибозилпирофосфата (PRPP) и АТР проходил по уникальному пути (Рисунок 3.3) . Этот путь включал десять реакций, которые катализировались ферментами оперона *hisLGDCBHAFl* в *E. coli*. Биосинтез регулировался гистидином на уровне активности первого фермента пути HisG, по типу ретроингибирования, а также на уровне транскрипции *his* оперона – механизмом аттенуации транскрипции, реагирующим на количество аминокислотированной гистидином тРНК<sup>Гис</sup>





строка 3). Был использован мутантный аллель *hisG* (E271K), кодирующий устойчивый к ретроингибированию фермент HisG<sup>r</sup> (Аствацатурянц и др., 1988). При комбинации *hisG*<sup>r</sup> с *hisL*'-Δ продукция Гис возросла более, чем в 10 раз (Таблица 3. 4, строка 4).

Таблица 3.4 - Продукция L-гистидина при ферментации в пробирках

№	Генотип штамма	Клетки, г/л	Гис, г/л	Гис, мг/г сух. кл	Выход, %
1	MG1655 <sup>+</sup>	18±2	< 0,05	—	—
2	Δ <i>hisL</i> '-Δ	19±2	< 0,1	—	—
3	<i>hisG</i> <sup>r</sup>	11,3±0,8	0,2±0,1	20±10	0,5
4	<i>hisG</i> <sup>r</sup> <i>hisL</i> '-Δ	6±2	2,7±0,2	430±50	6,8
5	<i>hisG</i> <sup>r</sup> <i>hisL</i> '-Δ Δ <i>purR</i>	11±2	4,9±0,5	450±50	12,3

В экстрактах штаммов MG1655<sup>+</sup>, MG1655<sup>+</sup> *hisL*'-Δ и MG1655<sup>+</sup>*hisG*<sup>r</sup> *hisL*'-Δ была определена удельная активность HisG. Ее значение ~100-140 ед/(мг кл. белка) для штаммов, содержащих *hisL*'-Δ более чем в 10 раз превышало значение удельной активности АТФ-фосфорибозилтрансферазы клеточного экстракта штамма MG1655<sup>+</sup>. В экстрактах MG1655<sup>+</sup> *hisL*'-Δ активность HisG была чувствительна к ингибированию: добавление гистидина (0.25 мМ) снижало активность на 85%. В этих же условиях фермент HisG<sup>r</sup> из MG1655<sup>+</sup>*hisG*<sup>r</sup> *hisL*'-Δ сохранял более 80% активности.

Уровни возрастания белковых продуктов *his* оперона после инактивации аттенуатора тестировали с помощью сравнительного анализа протеомных профилей штаммов с *hisL*'-Δ и без этой модификации (Рисунок 3.5). Как видно из Таблицы 3.5, количество белка соответствующих ферментов возросло

в 10 (HisF) – 40 (HisD) раз. Для сравнения, известная делеция *hisO1242* в аттенуаторе оперона (см. рис. 4.2.2), полученная генетико-селекционным путём, приводила к возрастанию активности HisD в 15 раз.

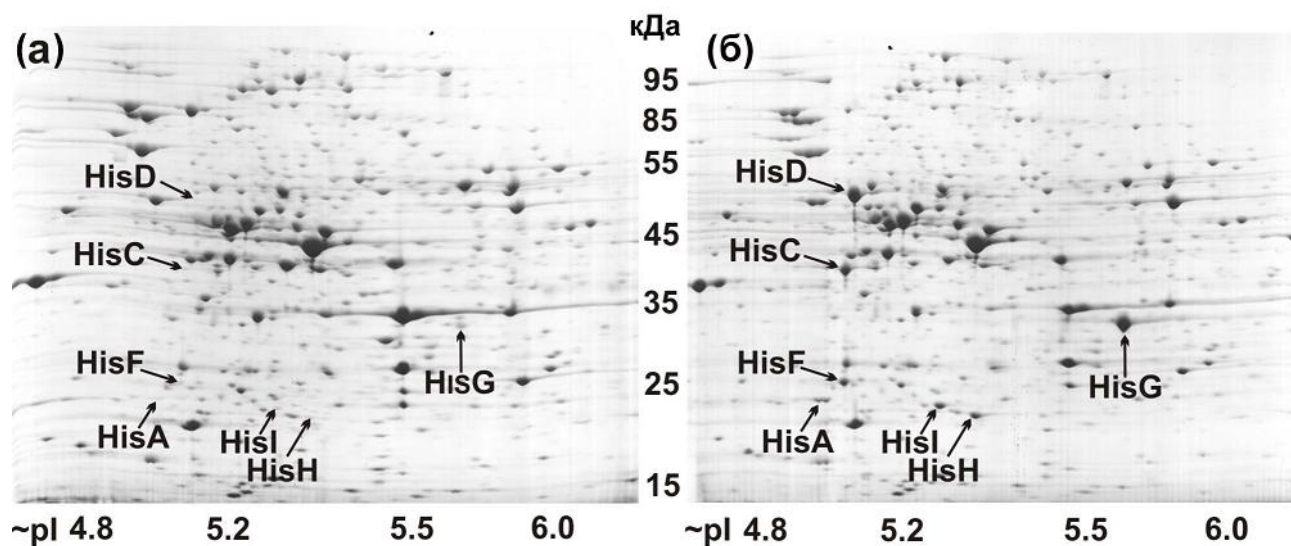


Рисунок 3.5 - Протеомные карты клеток  $MG1655^{+}hisG^{r}$  (а) и  $MG1655^{+}hisG^{r}\Delta hisL$  (б), отобранных в точке, указанной на кривых роста этих штаммов (в)

(а) и (б) Стрелками показаны пятна белков *his* оперона.

(в) Кривые роста  $MG1655^{+}hisG^{r}$  (1) и  $MG1655^{+}hisG^{r}\Delta hisL$  (2) на среде М9.



Таблица 3.5 - Относительные уровни белков *his* оперона (по результатам анализа протеомных профилей (Рисунок 3.5))

Штамм	Оптическая интенсивность пятен относительно всех пятен того же 2D-ПААГ						
	HisG	HisD	HisC	HisH	HisA	HisF	HisI
MG1655 <sup>+</sup> <i>hisG</i> <sup>r</sup>	0,15	0,05	0,03	0,03	0,02	0,04	0,03
MG1655 <sup>+</sup> <i>hisG</i> <sup>r</sup> $\Delta$ <i>hisL</i> '- $\Delta$	2,1	2,23	0,9	0,4	0,52	0,42	0,4

Штамм MG1655<sup>+</sup>*hisG*<sup>r</sup> *hisL*'- $\Delta$  существенно снизил накопление биомассы по сравнению со своим предшественником MG1655<sup>+</sup>*hisG*<sup>r</sup>, как при культивировании в ферментационной среде (Таблица 3.4), так и при росте в среде M9 (Рисунок 3.5в). Добавление аденозина в ферментационную среду, которая исходно была лимитирована по пуринам, содержащимся только в дрожжевом экстракте, увеличивало накопление биомассы штамма MG1655<sup>+</sup>*hisG*<sup>r</sup> *hisL*'- $\Delta$  на 30%, но при этом примерно на 30% снижалось количество гистидина, накапливаемого в среде культивирования. Для снижения зависимости роста MG1655<sup>+</sup>*hisG*<sup>r</sup>*hisL*'- $\Delta$  от пуринов был инактивирован транскрипционный регулятор PurR (Cho et al., 2011). Гипоксантин, образующийся из аденозина, является индуктором PurR, который регулирует биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, в том числе и синтез их общего с гистидином предшественника PRPP (Рисунок 3.3). В частности, синтез PRPP, катализируемый продуктом гена *prs*, репрессируется PurR (He et al., 1993). Делеция  $\Delta$ *purR* восстановила накопление биомассы при сохранении специфической продукции Гис на клетку (Таблица 3.4, штамм 5).

Полученный таким образом штамм MG1655<sup>+</sup>*hisG*<sup>r</sup> *hisL*'- $\Delta$ *purR* (обозначен, как KF37) использовался коллегами из АГРИ для разработки подходов дальнейшего усовершенствования продуцента Гис (Malykh et al., 2018).

Таким образом, генетические модификации хромосомы, спланированные на основе данных о синтезе и его регуляции для конкретной аминокислоты, привели к сверхпродукции этой аминокислоты. В отличие от модельного продуцента гистидина, продуценты АА с реальной продукцией ~ 1 г/л были получены без использования соответствующих ферментов (PheA, TyrA, TrpDE) со снятым ретроингибированием. Таким образом, синтез гистидина в *E. coli* регулировался, в первую очередь, на уровне ретроингибирования первого фермента пути, тогда как синтез каждой из ароматических аминокислот из общего предшественника - хоризмовой кислоты регулировался не только ретроингибированием первого фермента пути, но и уровнем его синтеза.

### 3.3. Повышение устойчивости к синтезируемому продукту за счёт расширения его экспорта из клетки

Для расширения экспорта Фен и Три в соответствующих продуцентах были использованы данные о потенциальных экспортёрах АА YddG и YedA в *E. coli* (Лившиц, 2006). Были протестированы плазмиды pAУСТЕРyddG и pAУСТЕРydeA, полученные нашими коллегами. Эти плазмиды вводили в продуценты Фен и полученные плазмидные штаммы проверяли на продукцию в пробирочных ферментациях. Если pAУСТЕРyddG (Патент РФ 2222596) повышала продукцию как в более активных, так и в слабых продуцентах, то положительный эффект pAУСТЕРydeA (Патент РФ 2229513) в дальнейшем был очевиден только в штаммах с высоким уровнем продукции. YddG, вероятно, имел более высокое сродство к Фен и был выбран для нашего исследования. Ген *yddG* оказался одним из первых генов кишечной палочки, перед которым был изменён промотор в хромосоме.

#### 3.3.1 Интеграция промотора P<sub>L</sub> перед геном *yddG* в хромосоме *E. coli* и свойства полученных штаммов

Для усиления экспрессии гена *yddG* в хромосоме *E. coli* использовали промотор ранних генов фага  $\lambda$  P<sub>L</sub> (Douschle et al., 1986), а также его ослабленный вариант, обозначенный как P<sub>L1</sub>. Промотор P<sub>L</sub> являлся сильным промотором, узнаваемым РНК-полимеразой в комплексе с  $\sigma^{70}$ , и - конститутивным в отсутствие репрессора CI фага  $\lambda$ , поэтому имелись опасения, что его интеграция в хромосому не будет отобрана. Ослабленный вариант P<sub>L1</sub> соответствовал одноимённому основному промотору в составе P<sub>L</sub>, но без UP (Upstream Promoter)- элемента, стимулирующего транскрипцию (Рисунок 3.6А). Промоторы были скомбинированы с TIR мРНК гена *lacZ E. coli*, что должно было повышать эффективность трансляции *yddG*.

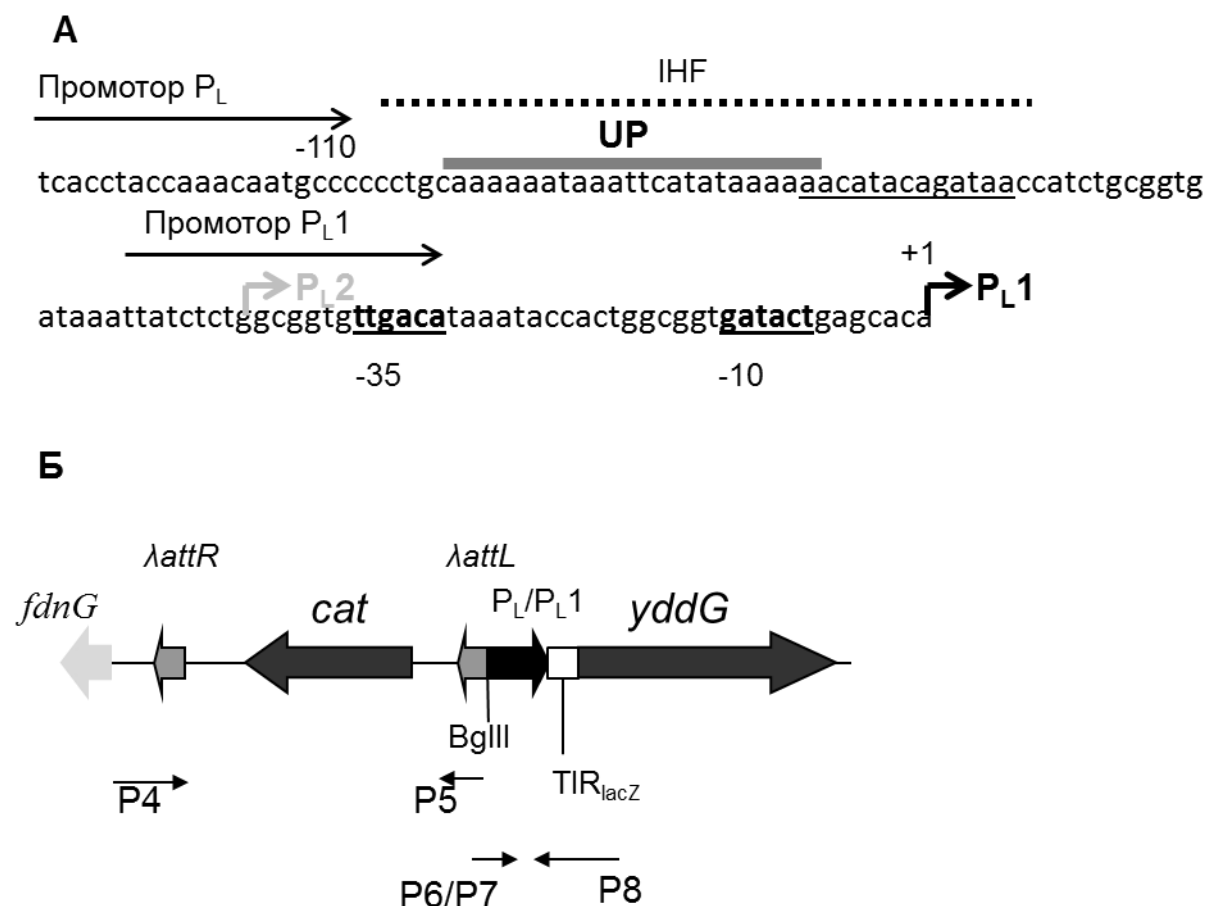


Рисунок 3.6 - Карта промотора  $P_L$  бактериофага  $\lambda$  (А) и структура участка хромосомы *E. coli* перед *yddG* после интеграции *attR-cat-attL-P<sub>L</sub>/P<sub>L1</sub>* (Б)

А: Структура промотора  $P_L$  (Giladi et al., 1998). Нуклеотидная ПС промотора включает область -110 – +1. Обозначены: старты транскрипции основного и минорного промоторов  $P_{L1}$  и  $P_{L2}$ ; -10 и -35 сайты для  $P_{L1}$ ; область UP (upstream promoter)-элемента, стимулирующего транскрипцию. Необходимый для активации промотора IHF (integration host factor) узнаёт ПС (подчеркнута), связывается с ДНК, изгибает её, приближая тем самым UP-элемент к  $\alpha$ -субъединице РНК-полимеразы, контактирующей с промотором.

ПС олигонуклеотидов, использованных для амплификации ДНК-фрагментов с  $P_L$  и  $P_{L1}$ , обозначены стрелками.

Б: Обозначен ген *cat*, фланкированный сайтами узнавания рекомбиназы  $\lambda$  *int-xis*. Стрелками внизу показаны участки отжига олигонуклеотидов, с помощью которых получали фрагменты ДНК для интеграции.

Сконструированные фрагменты ДНК (Рисунок 3.6Б) интегрировали в хромосому лабораторного штамма BW25113 с замещением примерно 110 н. перед *yddG*. Полученные штаммы BW25113<sub>P<sub>L</sub>-*yddG*</sub> и BW25113 P<sub>L1</sub>-*yddG* не отличались по росту от BW25113, но характеризовались повышенной устойчивостью к *L*-Фен, причем у первого штамма она была выше (Рисунок 3.6А).

Транскрипцию гена *yddG* в этих же штаммах анализировали с помощью ОТ-ПЦР. Транскрипт BW25113 P<sub>L</sub>-*yddG* образовал более интенсивную полосу в агарозном геле, чем препарат РНК из BW25113 P<sub>L1</sub>-*yddG*. Транскрипт гена *yddG* дикого типа не тестировался (Рисунок 3.6Б).

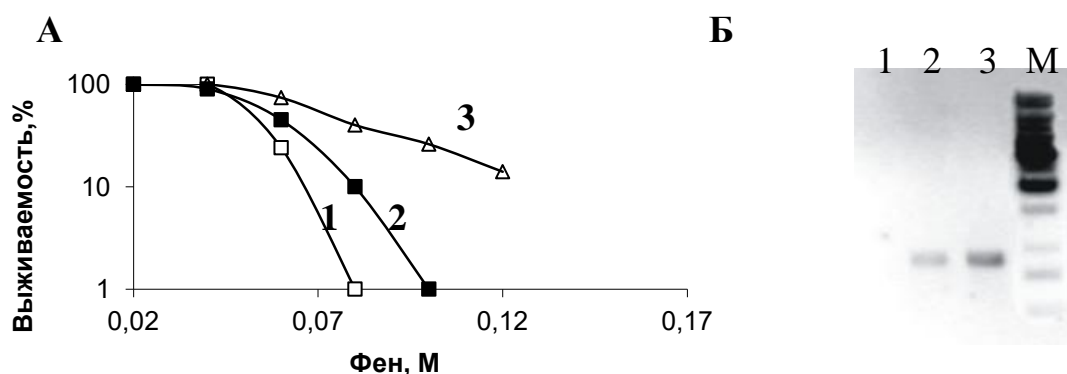


Рисунок 3.6 - Характеристика штаммов BW25113 (1), BW25113<sub>P<sub>L</sub>-*yddG*</sub> (2) и BW25113P<sub>L</sub>-*yddG* (3) по устойчивости к Фен (А) и по уровню мРНК *yddG* с помощью ОТ-ПЦР (Б)

М – маркеры (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, США).

Таким образом, увеличение экспрессии гена *yddG*, локализованного на хромосоме повышало устойчивость клеток к фенилаланину.

Модификация P<sub>L</sub>-*yddG* была перенесена в продуцент триптофана SV164/pGH5 с помощью трансдукции фагом P1. Полученный штамм SV164P<sub>L</sub>-*yddG*/pGH5 накапливал примерно на 10% больше Три по сравнению с исходным SV164/pGH5 (Таблица 3.6) (Патент РФ 2229513).

Таблица 3.6 - Продукция L-Три при ферментации в пробирках

Штамм	ОП <sub>540</sub>	Три, г/л*
SV164/pGH5	7,8±0,5	3,7±0,2
SV164P <sub>L</sub> -yddG/pGH5	7,9±0,7	4,1±0,3

\* Усредненные значения восьми пробирок.

Ортолог YddG из *Salmonella enterica* sv. Typhimurium LT2 был охарактеризован как экспортёр MV (*Santiviago et al.*, 2002). Поэтому штаммы BW25113P<sub>L</sub>-yddG и BW25113 были проверены на устойчивость к MV (Рисунок 3.7). Новый штамм оказался более чувствительным к этому соединению, чем исходный. Чувствительность к MV могла быть обусловлена как различиями в свойствах YddG из этих бактерий, так и влиянием сверхэкспрессии yddG на соседние гены хромосомы, продукты которых могли быть токсичны в определённых условиях. Ген yddG локализовался на 33,3 мин. ген. карты *E. coli* K-12 MG1655, в варибельном у энтеробактерий локусе хромосомы. На Рисунке 3.8 приведена структура этого локуса в хромосомах MG1655 и *S. enterica* sv. Typhimurium LT2.

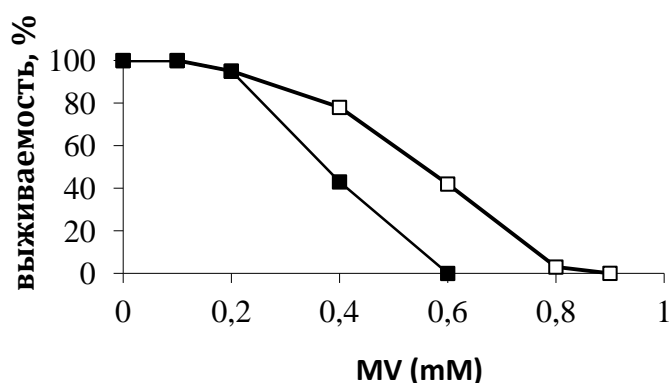
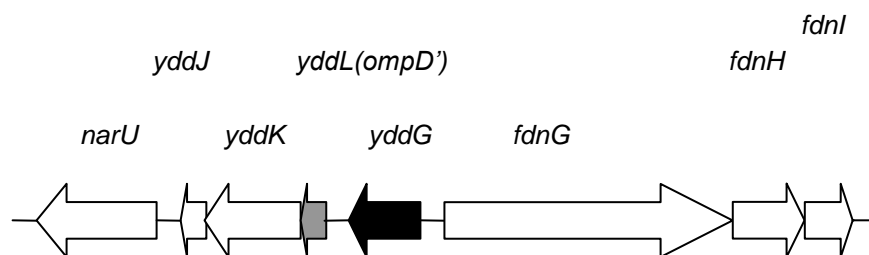


Рисунок 3.7 - Характеристика штаммов BW25113 (□) и BW25113P<sub>L</sub>-yddG (■) по устойчивости к MV

**A** *E. coli* K12  
MG1655



**Б** *S. enterica*  
LT2

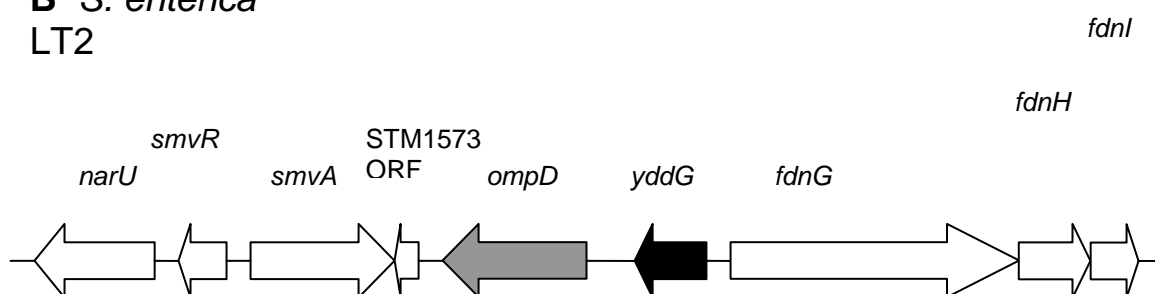


Рисунок 3.8 - Локусы хромосомы *E. coli* MG1655 (А; GeneBank:U00096) и *S. enterica* sv. Typhimurium LT2 (Б, GeneBank:NC003197), содержащие ген *yddG*.

За геном *yddG* в хромосоме *S. enterica* LT2 следовал ген порина внешней мембраны OmpD, который по данным тех же авторов экспортировал MV совместно с YddG. В *E. coli* присутствовала только треть гена *ompD*, которая кодировала нефункциональный белок. В тоже время за укороченным *ompD'* в хромосоме *E. coli* находились открытые рамки считывания, которые отсутствовали в хромосоме LT2, но могли входить в единую с *yddG* транскрипционную единицу. Для избежания побочных эффектов от сверхэкспрессии соседних генов получали интеграции дополнительных копий *yddG* в хромосоме.

### 3.3.2. Получение штаммов *E. coli* с дополнительной копией гена *yddG* в хромосоме и их характеристика

Копии *yddG* в хромосоме получали с помощью miniMu-интеграции (Doroshenko *et al.*, 2007). Первоначально *yddG* встраивали в виде молчащей копии. Для этого использовали промотор гена  $\phi 10$  фага T7, узнаваемый T7 РНК-полимеразой, которая отсутствовала в клетках *E. coli*. Промотор  $P_{\phi 10}$  был встроен перед геном *yddG*, клонированным в векторе рMDV3- $Cm^r$  между концевыми ПС Mu (Рисунок 3.9А).

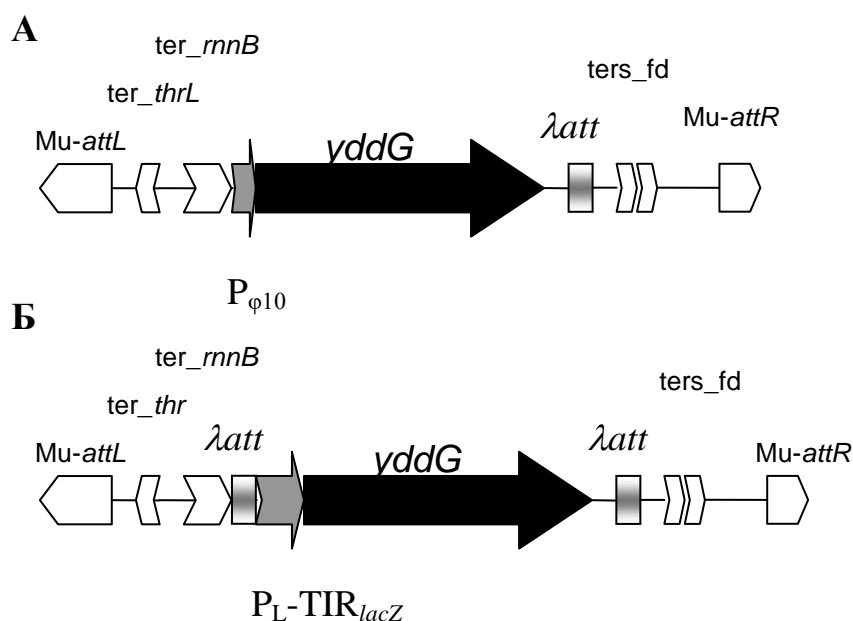


Рисунок 3.9 - Структуры miniMu-P $\phi 10$ -*yddG* (А) и miniMu- $P_L$ -*yddG*(Б)

Концы фага Mu - Mu-*attL* (450 н.), Mu-*attR* (116 н.). Транскрипционные терминаторы (*ter*) - лидерного пептида треонинового оперона, оперона *rnnB* *E. coli* и фага fd. Сайт присоединения фага  $\lambda attB$  остаётся после удаления гена *cat*.



После получения клонов интегрантов был выбран клон MG1655 P<sub>φ10</sub>-*yddG* (DV033), который не отличался от исходного штамма MG1655 по скорости роста на минимальной и богатой средах. Точка интеграции miniMu-P<sub>φ10</sub>-*yddG* в DV033 была локализована в гене *htrE* (154.005 н. на физ. карте MG1655 (GeneBank:U00096)). Ген *htrE* кодировал ашер(usher)-порин, являющийся платформой сборки фимбрии Y<sub>ad</sub>, и находился в составе оперона, ответственного за их синтез и сборку (Raina *et al.*, 1993). Позже появилась информация, что эти фимбрии, консервативные у *E. coli*, необходимы для колонизации кишечника и образования биоплёнок (Wurpel *et al.*, 2013). Таким образом, этот локус не имел значения для лабораторных штаммов и штаммов-продуцентов.

Для активации копии *yddG*, интегрированной в *htrE*, промотор P<sub>φ10</sub> был заменён на промотор P<sub>L</sub> фага λ (Рисунок 3.9Б). Полученный штамм обозначили как DV036. Возросший уровень транскрипции *yddG* в DV036 был подтверждён с помощью ОТ-ПЦР. РНК выделяли из клеток штаммов MG1655, DV033, DV036, выросших в среде LB до середины логарифмической фазы. Транскрипт, содержащий структурную часть *yddG*, был обнаружен только в образце штамма DV036, содержащего *htrE::P<sub>L</sub>-yddG*.

Штамм DV036 характеризовался повышенной устойчивостью к Фен, аналогам Фен и Три по сравнению с штаммом дикого типа MG1655 и его производным, содержащим молчащую копию *yddG: htrE::P<sub>φ10</sub>-yddG* (Таблица 3.7) (Doroshenko *et al.*, 2007). Штамм с Δ*yddG* практически не отличался от MG1655 с геном *yddG* дикого типа. Эти же штаммы были проверены на устойчивость к метилвиологену. Как видно из таблицы, делеция гена *yddG* в *E. coli* не сказывалась на устойчивости к MV, но DV036 оказался более чувствительным к MV. Таким образом, возросшая чувствительность к MV при сверхэкспрессии *yddG* в хромосоме была обусловлена свойствами Y<sub>ddG</sub>, а не местом локализации гена на хромосоме.

MV стимулировал образование супероксид радикала ( $O_2^-$ ), который мог повреждать некоторые ферменты, в том числе и транскетолазу, ответственную за образование предшественника АА, эритрозо-4-фосфата (Benov, Fridovich, 1999). Поскольку проверка на устойчивость к MV проводилась на минимальной среде, то в условиях сверх-выброса АА штамм DV036 мог начинать в них нуждаться. Действительно, добавление каждой из ароматических аминокислот: Фен, Тир или Три (по 25 мкг/мл) в минимальную среду, содержащую MV, снижало негативный эффект MV.

Таблица 3.7 - Устойчивость к Фен, аналогам Фен и Три, метилвиологену

Штамм	Модификация	МИК (мг/мл)				
		L-Phe	DL-p-f-Phe	DL-o-f-Phe	DL-5-f-Trp	MV
MG1655	–	14000	1500	50	0,2	20
DV064	$\Delta yddG$	14000	1500	50	0,1	20
DV036	<i>htrE::P<sub>L</sub>-yddG</i>	>30000	3000	80	0,6	13
DV033	<i>htrE::P<sub>φ10</sub>-yddG</i>	14000	1500	50	0,2	20

Кишечная палочка имела охарактеризованный экспортер MV EmrE (первоначально обозначенный как MvrC (Morimyo et al., 1992)), который отсутствовал у сальмонелл. Позже было показано, что EmrE совместно с порином внешней мембраны OmpW обеспечивает устойчивость к четвертичным катионным соединениям, подобным MV (Beketskaia et al., 2014). Проверка показала, что штамм *S. enterica* LT2 значительно более чувствителен к MV, чем MG1655. МИК MV для LT2 составляла всего 1 мг/мл в наших условиях тестирования. По-видимому, YddG не участвовал в экспорте MV из клеток *E. coli* на фоне более эффективного экспортёра EmrE.

Для определения субстратной специфичности YddG штамм DV036 проверяли на рост в присутствии ингибирующих концентраций некоторых L-

форм аминокислот. Положительные отличия в росте, по сравнению с другими штаммами, тестировались в присутствии изолейцина, метионина и серина. Для подтверждения устойчивости к Мет проверили устойчивость DV036 к его аналогам норлейцину и Мет-сульфону (Таблица 3.8). Сверхэкспрессия гена *yddG* повышала устойчивость к норлейцину, почти в 2 раза, тогда как мутация  $\Delta yddG$  снижала устойчивость к этому аналогу. В случае Мет-сульфона наблюдалась обратное: снижение устойчивости у штамма DV036 и повышение резистентности к нему для DV064 на минимальной среде.

Таблица 3.8 - Устойчивость к Мет и его аналогам

Штамм <i>E. coli</i>	Модификация <i>yddG</i>	МИК (мг/мл)		
		L-Мет	Норлейцин	Мет-сульфон
MG1655	–	60	0.2	1.5
DV064	$\Delta yddG$	60	0.15	1.6
DV036	<i>htrE::P<sub>L</sub>-yddG</i>	>60*	0.35	1.2

\* 60 мг/мл является предельно растворимой концентрацией метионина в среде M9.

Вероятно, YddG экспортировал Мет и норлейцин, но не Мет-сульфон. Токсичный эффект последнего усиливался при сверхэкспрессии *yddG*, когда внутриклеточный пул Мет мог снижаться за счёт его активного выброса из клетки.

Таким образом, YddG, как и RhtA имел широкую субстратную специфичность, но с вероятным низким сродством к своим многочисленным субстратам.

### 3.3.3 Увеличение продукции ароматических аминокислот в результате сверхэкспрессии *yddG* в штаммах-продуцентах

Культивирование штамма DV036 в минимальной среде M9 не сопровождалось накоплением аминокислот в культуральной жидкости в количествах, которые мы могли достоверно определять. Поэтому для тестирования выброса АА из клеток, содержащих *htrE::P<sub>L</sub>-yddG*, были использованы продуцирующие эти аминокислоты штаммы (*Doroshenko et al.*, 2007).

Модификации гена *yddG*: *htrE::P<sub>T7</sub>-yddG*, *htrE::P<sub>L</sub>-yddG*,  $\Delta yddG$  были введены в модельные продуценты Фен, Тир и Три, сконструированные с помощью рекомбинационной инженерии (Раздел 2.7). Штаммы проверяли на продукцию аминокислот в ферментации и в пробирках. Как видно из полученных результатов (Рисунок 3.10), введение молчащей копии *htrE::P<sub>T7</sub>-yddG* не сказывалось на продукции каждой из аминокислот. Инактивация *yddG* снижала продукцию всех АА: фенилаланина – на 40%, тирозина – на 10%, триптофана – менее, чем на 10%. В то же время введение *htrE::P<sub>L</sub>-yddG* привело к значительному увеличению продукции: Фен и Тир – в три раза, Три – в полтора раза.

Продуцент Три имел более серьёзные лимитирующие факторы на пути к увеличению продукции. Антранилатсинтаза ингибировалась Три при более низких концентрациях, чем PDT и PDH ингибировались Фен и Тир соответственно (*Pittard, Yang*, 2008). Кроме того, продуцент Три был ауксотрофом по Фен и Тир, добавление которых в среду ингибировало основные ДАНР-синтазы *E. coli* и, соответственно, поток углерода в общий ароматический путь.

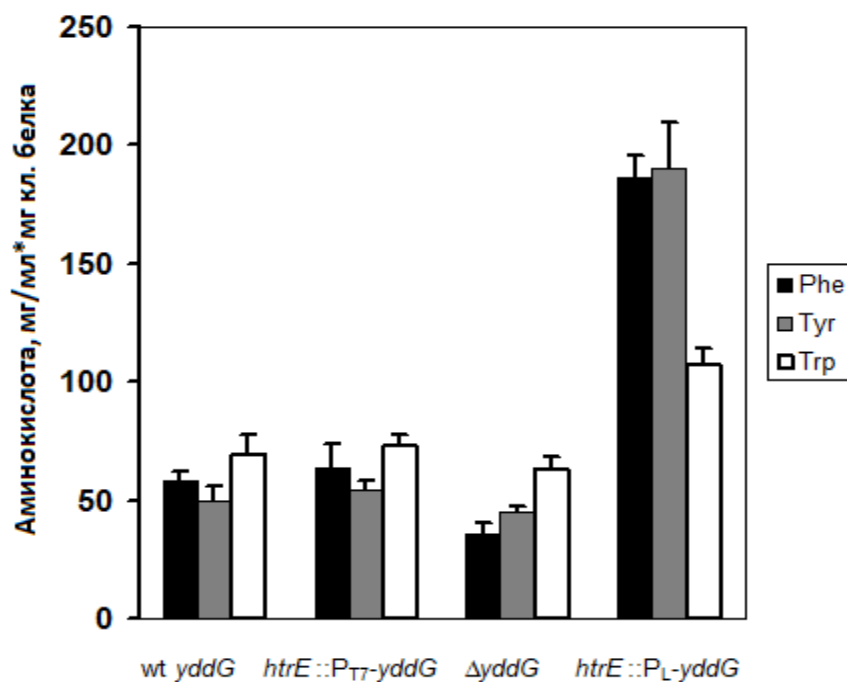


Рисунок 3.10 - Накопление Фен, Тир и Три в культуральной жидкости в ферментации в пробирках

Использовались штаммы *E. coli*, продуцирующие фенилаланин (DV157), тирозин (DV683), и триптофан (DV1060) и их производные, содержащие различные аллели *yddG* (указаны ниже диаграммы). Представлены средние значения трёх экспериментов.

Характерными признаками усиления экспорта могло быть, как увеличение скорости выброса аминокислоты, так и согласующееся с этим снижение её внутриклеточной концентрации. Эти характеристики были проверены для продуцента Фен. Действительно, штамм, содержащий  $P_L$ -*yddG* (DV666), накапливал Фен в среде в два раза быстрее, чем штамм DV157 с геном *yddG* дикого типа. Внутриклеточная концентрация Фен была также выше в клетках последнего (Рисунок 3.11) (Doroshenko et al., 2007).

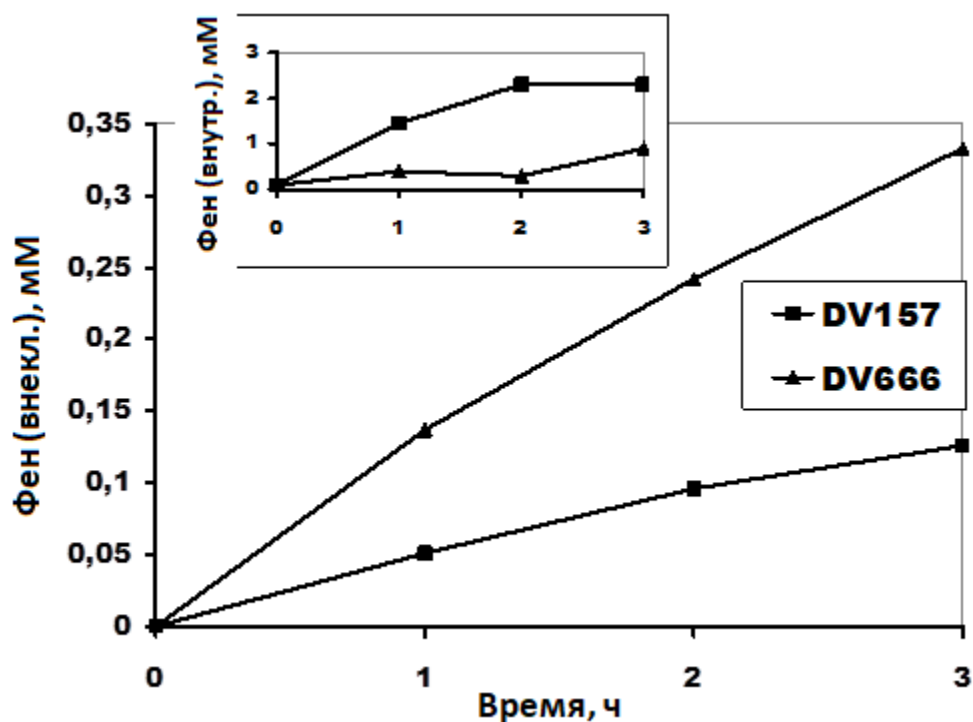


Рисунок 3.11 - Временные изменения вне и внутриклеточных концентраций Фен для продуцентов, содержащих ген *yddG* дикого типа (DV157) и  $P_L$ -*yddG* (DV666)

### 3.3.4 Репеллентные свойства *DL-p-f-Phe* для *E. coli* с $P_L$ -*yddG*

Клеточные суспензии штаммов с  $P_L$ -*yddG* образовывали пятна большей площади при росте на среде с *DL-p-f-Phe*, чем штаммы MG1655, BW25113 и BW25113 $\Delta$ *htrE*::Cm<sup>r</sup> (Рисунок 3.12). Вероятно, клетки, выделяющие *DL-p-f-Phe*, могли взаимно отталкиваться и разрастаться по поверхности агара. Таким образом, клетки штаммов с  $P_L$ -*yddG* обладали условной повышенной подвижностью на среде с *DL-p-f-Phe*, чем штаммы без этой модификации. Т.е., *DL-p-f-Phe*, накапливаемый вокруг клеток, которые его активно выбрасывали, являлся репеллентом. Это наблюдение наглядно демонстрировало участие YddG в экспорте *DL-p-f-Phe*.

С помощью такого подхода тестировали штамм MG1655 $P_L$ -*yddG* $\Delta$ *yddL*-*yddJ*, в котором были удалены три открытые рамки, следующие за геном *yddG* в

хромосоме и, предположительно, входящие в ту же транскрипционную единицу (Рисунок 3.8). Клетки такого штамма также проявляли повышенную подвижность. Следовательно, белковые продукты этих генов не являлись необходимыми для функционирования YddG.

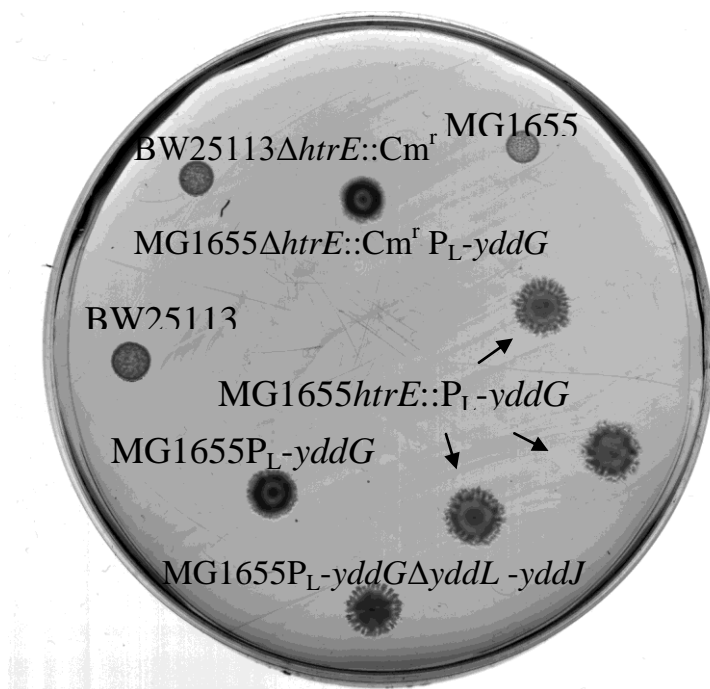


Рисунок 3.12 - Фотография чашки с агаризованной (агар < 15 %) средой M9, содержащей 250 мг/л DL-*p*-f-Phe  
Штаммы, клетки которых образуют пятна, указаны.

### 3.3.5. Сравнение протеомов штаммов с P<sub>L</sub>-yddG и без этой модификации

Для тестирования метаболических изменений, вызванных введением модификации P<sub>L</sub>-yddG, провели сравнение протеомов продуцентов Фен DV157 и DV666. Штаммы для отбора проб культивировали в периодической ферментации (Таблица 3.9). Увеличение продукции Фен (на 30-60%) для штамма DV666 коррелировало с возрастанием продуктивности, т.е. продукции

в единицу времени, так как общее время культивирования, продолжающееся до окончания потребления глюкозы, сократилось.

Таблица 3.9 - Влияние сверхэкспрессии гена *yddG* на продукцию Фен из глюкозы (50 г/л) при ферментации в аппаратах Biostat Q

Штамм	№ аппарата	ОП540	Время культ., ч	Фен, г/л	Выход, %
DV157	1	10,4	20,95	0,7	1,6
	2	10,8	20,35	0,7	1,6
DV666	3	9,8	20,65	0,9	2,0
	4	9,5	19,8	1,1	2,4

Пробы для анализа протеома отбирали на 5 и 15 часов культивирования. Получение протеомных карт и анализ интересующих белков проводили, как описано в разделах 2.9.2 и 2.9.3. Анализировали цитоплазматические белки, относительное содержание которых в клетках штамма DV666 возросло по сравнению с DV157 (Рисунок 3.13). Активация *YddG* в штамме DV666 не приводила к видимому увеличению биосинтетических ферментов Фен (сравнивали *AroG* и *AroC*).

Вероятно, в клетках DV666 активировался ответ на кислотный стресс. Такой вывод был сделан на основании увеличения биосинтетических ферментов аргинина и лизина и белков *nuo* оперона. По аналогии с другими родственными переносчиками, *YddG* функционировал как антипортер протонов и усиленный экспорт Фен мог сопровождаться накоплением  $H^+$  в цитоплазме. Поэтому могли активироваться *Arg* и *Lys*-зависимые кислотоустойчивые системы, а также протонный насос цепи переноса электронов, кодируемый *nuo* опероном. Усиление респираторного комплекса могло повлечь за собой активацию цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и активацию ответа на оксидативный стресс, что также наблюдались в клетках штамма DV666 (Рисунок 3.13).



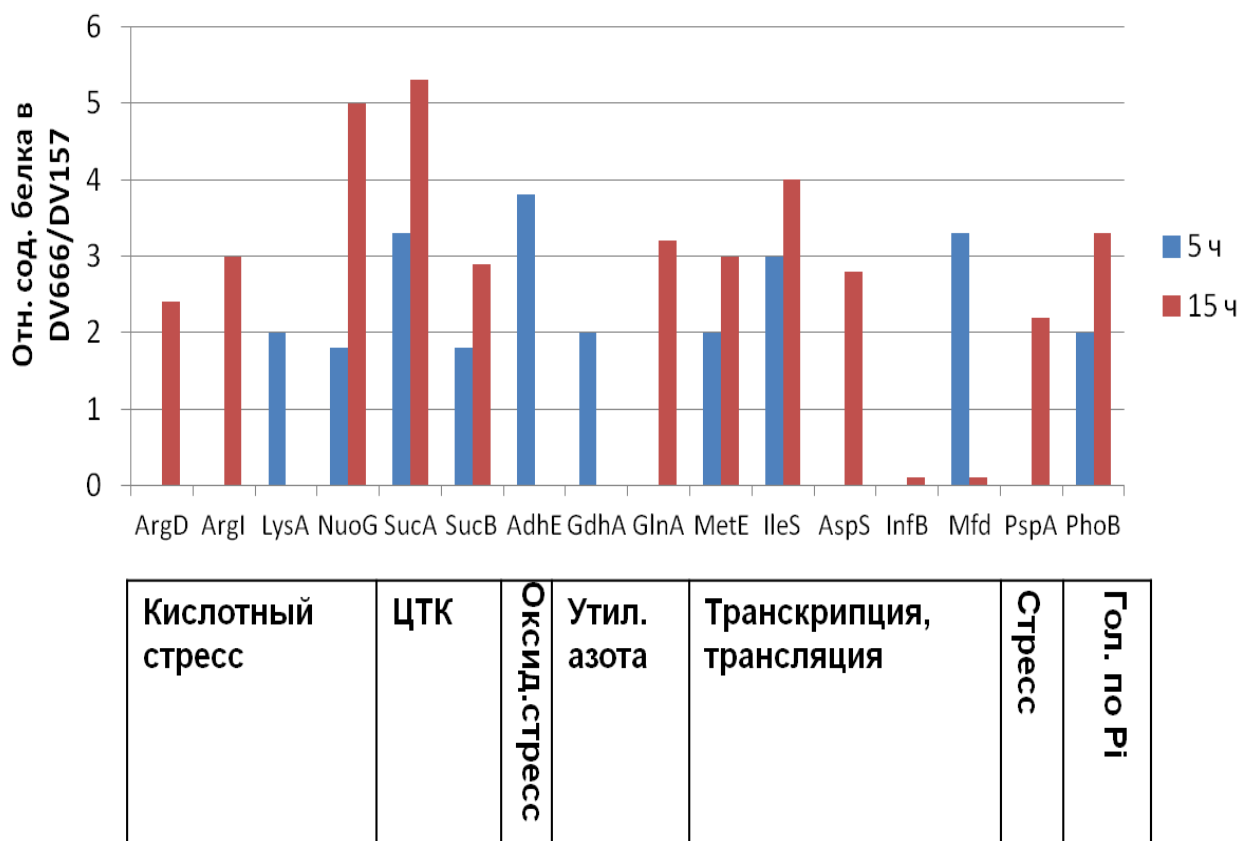


Рисунок 3.13 - Сравнительный анализ протеомов штаммов DV157 и DV666, культивированных в периодической ферментации (Таблица 3.9: апп. № 2, 4)

В клетках DV666 активировался азотный метаболизм (белки GdhA и GlnA), что, видимо, было связано с увеличенным потреблением аммония для синтеза фенилаланина. В клетках этого штамма раньше наступало голодание по Рі, а также увеличилось относительное содержание некоторых белков, связанных с трансляцией и транскрипцией.

Таким образом, наблюдаемые различия протеомов отвечали более высокой приспособленности штамма DV666 к условиям продукции Фен и, в целом, характеризовали более активный метаболизм последнего.

### 3.3.6. Молекулярно-генетическая характеристика YddG

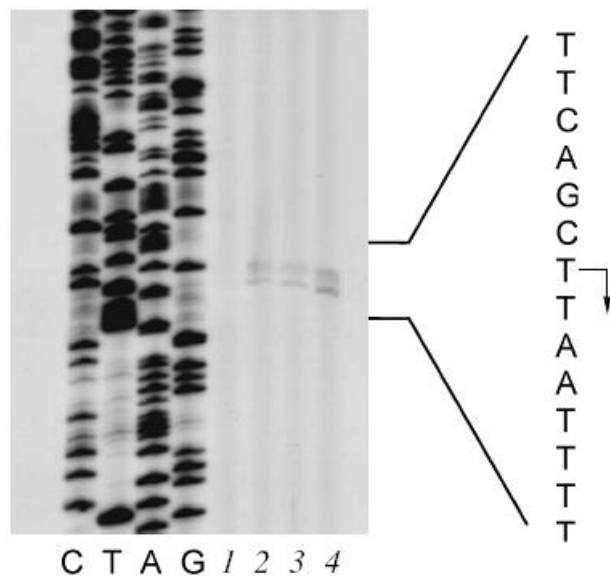
Ген *yddG* транскрибровался с собственного промотора, который был идентифицирован. Старт транскрипции *yddG* был определен экспериментально (Рисунок 3.14). Области «-10» и «-35» промотора были картированы относительно старта транскрипции. Неоптимальный спейсер между ними (18 нуклеотидов), вырожденная «-35» область, а также наличие С в позиции «-13» были характерны для промоторов *E. coli*, которые узнавались РНК-полимеразой в комплексе как с  $\sigma^{70}$ , так и с  $\sigma^S$  (Tupas, Hengge, 2006).

Старту транскрипции (+1) соответствовал Т в положении «-36» относительно АТГ-кодона. На электрофореграмме выше зоны основного транскрипта присутствовали дополнительные полосы (Рисунок 3.14А). Они свидетельствовали об образовании гомополимерных структур на 5'-конце молекулы мРНК, которые могли образоваться в результате проскальзывания транскрипта (slippage effect) (Xiong, Reznikoff, 1993). Возможность «слипадж эффекта», приводящего к повторной транскрипции (reiterative transcription) подтверждалась наличием гомополимерных трактов из Т нуклеотидов в районе старта транскрипции (Рисунок 3.14 Б). Известно, что повторяющаяся транскрипция может происходить на матрице с повторами 2-3 нуклеотидов и если такая транскрипция происходит с использованием уридинтрифосфатов (УТР), то образующиеся транскрипты, как правило, высвобождаются из комплекса инициации транскрипции (Turnbough, 2011). По аналогии с регуляцией *purVI*-оперона *E. coli* посредством контролируемой повторной транскрипцией мы предположили подобный механизм для гена *yddG*. Таким образом, избыток УТР в клетке мог приводить к удлинению одного из двух уридиновых трактов в 5'-мРНК *yddG* и терминации транскрипции.

Для изучения экспрессии гена *yddG* был сконструирован ген гибридного белка YddG-LacZ в месте природной локализации *yddG* в хромосоме *E. coli*. Активность  $\beta$ -галактозидазы в полученном штамме MG1655 $\Delta$ *lacZyddG'*-*lacZ*

(~100 EM) была в 5 и 25 раз ниже активности LacZ в штамме MG1655 без индукции и в условиях индукции ИПТГ (~3000 EM) соответственно.

**А**



**Б**

-35

5'- CGGTAGAAAAACGCACCACTGCCTGACAGGCCCAGTTAAAA  
AAATGCTATAAAAATCAGCTTAATTTTAAACGGCAAGAGAGAC  
-10

Рисунок 3.14 - Картирование промотора гена *yddG*

(А) Определение сайта инициации транскрипции методом «удлинения олигонуклеотидной затравки». кДНК синтезирована из препарата РНК, использованного в концентрациях 1, 2, 3, 4 мкг/мкл (дорожки 1, 2, 3, 4 соответственно).

(Б) ПС промотора *yddG* (нематричная цепь). Области «-35», «-10» и старт транскрипции подчеркнуты.

В условиях конститутивной экспрессии, т.е. без индукции, контрольный штамм имел максимальную активность  $\beta$ -галактозидазы на среде LB, тогда как исследуемый – максимальную активность на среде M9 с глюкозой. Таким образом, ген *yddG* индуцировался при росте клеток MG1655 на минимальной среде (но не более, чем в 1,5 раза). Этот факт согласовывался с регуляцией *yddG* посредством «слипадж эффекта», т.к. при росте на богатой среде мог возникнуть избыток УТР в клетке.

Топология YddG в мембране *E. coli* была определена экспериментально сотрудниками нашей группы Айрих Л.Г. и Цыренжаповой И.С. (Airich et al., 2010). Проведённое исследование, подтверждающее наличие 10 ТМ сегментов подробно описано в кандидатской диссертации (Цыренжапова, 2010).

Топология YddG исследовалась с помощью получения гибридных генов  $P_{lac}$ -yddG'-blaM и  $P_{lac}$ -yddG'-ZsGreen в векторе pBR322, где укороченные варианты разной длины обозначены как yddG'. Гибридные белки в мембранной фракции визуализировали с помощью иммуноблотинга с моноклональными антителами к  $\beta$ -лактамазе и с поликлональными антителами к флуоресцентным белкам рифовых кораллов соответственно. Несмотря на то, что все гибридные белки детектировались в мембранной фракции, только гибрид полноразмерного YddG с ZsGreen был активным. Т.е. плазида, кодирующая этот гибридный ген, сообщала клеткам устойчивость к L-Фен. После получения кристаллической структуры YddG из *S. novella* (Tsuchiya et al., 2016) стала ясна причина отсутствия активности укороченных вариантов YddG. Переносчик YddG имел форму корзины, для формирования которой необходимы были все ТМ сегменты. В частности, полость переносчика, куда входил субстрат, образовывали 8 из 10 ТМ сегментов.

Скорректированные положения ТМ сегментов в аминокислотной ПС YddG *E. coli*, установленные на основании выравнивания с аминокислотной ПС YddG из *S. novella* показаны на Рисунке 3.15. Там же приведено выравнивание паралогов *E. coli* YddG, YdeA и RhtA для сравнения а.о. субстрат-связывающего кармана, которые Цутия с соавт. (Tsuchiya et al., 2016) идентифицировали в YddG из *S. novella*. В проанализированных позициях YddG из *E. coli* имел сходство и различия, как с YddG из *S. Novella*, так и с YdeA и с RhtA. Во всех трёх белках в этих позициях находились амфипатические или гидрофобные а. о. Такие остатки способны связывать как гидрофобные, так и гидрофильные группы субстратов, что косвенно свидетельствовало о широкой субстрат-специфичности этих экспортёров.



Рисунок 3.15 - Выравнивание аминокислотных ПС переносчиков *E. coli*

YddG, YdeA, RhtA и YddG из *S. novella* (TM-Aligner (Bhat et al., 2017))

TM сегменты, образующие субстратную полость переносчика обозначены жёлтым; а.о.

YddG из *S. novella*, образующие входы со стороны периплазмы и цитоплазмы - зелёным и голубым соответственно (Tsuchiya et al., 2016). Гидрофобные и амфипатические а.о. субстрат-связывающего кармана показаны красным и фиолетовым соответственно.

Остаток G26 отмечен жирным шрифтом.

С целью оптимизации эффлюкса АА посредством YddG Айрих Л.Г. были отобраны мутации G26F и G26E, которые характеризовались ускоренным накоплением Три (Патент РФ 2530171). Мутация G26E приводила также к ускорению накопления Фен (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 - Скорость накопления *L*-Фен и *L*-Три для нерастающих клеток, продуцирующих эти аминокислоты

Модификация <i>yddG</i>	скорость накопления, мг/л ч ( $\sim 2 \times 10^9$ кл)	
	<i>L</i> -Фен (DV157)	<i>L</i> -Три (DV1060)
<i>htrE</i> ::P <sub>φ10</sub> - <i>yddG</i>	10	11 <sub>±2</sub>
<i>htrE</i> ::P <sub>L</sub> - <i>yddG</i>	14	19 <sub>±3</sub>
<i>htrE</i> ::P <sub>L</sub> - <i>yddG</i> -G26F	14	23 <sub>±1</sub>
<i>htrE</i> ::P <sub>L</sub> - <i>yddG</i> -G26E	16	25 <sub>±1</sub>

Остаток G26 не являлся консервативным среди паралогов YddG (Рисунок 3.15), но он локализовался, согласно структурной модели YddG, в области выходного отверстия переносчика в переплазме. Предположительно, мутации в этом остатке могли сказываться на дальнейшем транспорте гидрофобных субстратов через переплазму.

Выведение токсичных и лекарственных веществ из клеток грамотрицательных бактерий происходит в результате координации транспортных реакций через цитоплазматическую и внешнюю мембраны (Zgurskaya et al., 2015). Известно, что транспортные системы множественной лекарственной устойчивости состоят из нескольких компонентов: переносчика через внутреннюю мембрану, переплазматического белка и порина внешней мембраны. При этом переносчик через внутреннюю мембрану имеет домен, выходящий в цитоплазму, с которым связывается переплазматический белок. YddG и ему подобные переносчики не имеют переплазматического домена. Мутация G26E могла затруднять выход Фен и Три в периплазму, приводить к

накоплению этих аминокислот в мембране и таким образом делать их более доступными для других транспортных систем. Боковая диффузия через стенки каналов  $\alpha$ -спиральных мембранных белков характерна для гидрофобных субстратов (*van den Berg, 2010*), которые, как известно, легко перемещаются в мембране.

Таким образом, в этой части работы было показано, что возрастающую токсичность фенилаланина в ферментации можно преодолевать с помощью сверхэкспрессии YddG. Ген *yddG*, экспрессирующийся исходно на низком, плохо детектируемом уровне, кодирует переносчик, который может осуществлять эффлюкс *L*-Фен из клетки в условиях суперпродукции последнего.

Ген *yddG* был одним из первых генов кишечной палочки, манипуляции с экспрессией которого проводили непосредственно в хромосоме. Впоследствии такой подход стал активно применяться в АО «АГРИ» для других генов (Патенты РФ 2268305; 2333953) и оптимизирован Ж. Каташкиной (*Каташкина Ж.И. и др., 2005*).

### 3.4. Получение продуцента фенилаланина $\text{Tyr}^+$ , не накапливающего тирозин

Для получения штаммов, не нуждающихся в Тир, необходимо было ослабить активность PDH, кодируемую геном *tyrA*. Предполагалось получить несколько аллелей гена *tyrA*, кодирующих ферменты с разными уровнями активности. Для этой цели был выбран С-концевой программируемый протеолиз, на тот момент уже изученный.

Для проверки функциональности PDH в присутствии SsrA-хвоста, ген *tyrA* был удлинён нуклеотидной ПС, кодирующей AANDENYALAA. Аллель *tyrA-ssrA* получали в штамме MG1655 $\Delta\text{tyrR}$  с помощью рекомбинационной инженерии в два этапа, как показано на Рисунке 3.16.

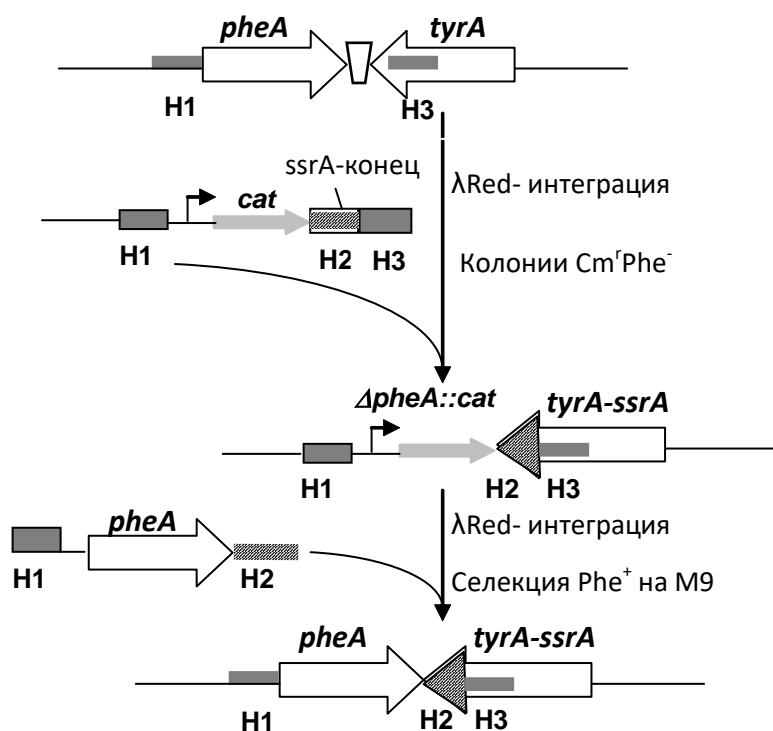


Рисунок 3.16 - Схема получения *tyrA-ssrA* в хромосоме MG1655 $\Delta\text{tyrR}$

Области гомологии для рекомбинации, обозначенные как H1 – H3, были заложены в ПС праймеров (Раздел 2.7.5), которые использовались для получения фрагментов ДНК.



Штамм MG1655 $\Delta$ *tyrR tyrA-ssrA* рос на минимальной среде без АА и был проверен на продукцию АА на среде без добавления Тир (Таблица 3.11). MG1655 $\Delta$ *tyrR tyrA-ssrA* увеличил продукцию Фен по сравнению с MG1655 $\Delta$ *tyrR* и не накапливал Тир в количествах, которые могли бы тестироваться (Патент РФ 2264459).

Таблица 3.11 - Накопление аминокислот при ферментации в пробирках

Штамм	OD <sub>540</sub>	L-Фен, г/л	L-Тир, г/л
MG1655 $\Delta$ <i>tyrR</i>	28,5 ± 0,6	0,017 ± 0,002	0,13 ± 0,01
MG1655 $\Delta$ <i>tyrR tyrA-ssrA</i>	26,3 ± 0,4	0,46 ± 0,04	<0,01

Для варьирования активности ТугА в продуценте Фен, сконструировали аллели гена *tyrA*, меченные модифицированными *ssrA*-концами, обозначенные далее как *ssrA'* (Рисунок 3.17А). Варьируя С-конец, изменяли сродство к протеазам ClpX, ClpA, а укорачивая ПС SsrA с N-конца, снижали сродство к адаптору SspB. Аллели *tyrA-ssrA'* получали в штамме BW25113 с одновременной делецией гена *pheA*, кодирующего чувствительную к Фен PDT (Рисунок 3.17 Б).

Штаммы BW25113 $\Delta$ *pheA tyrA-ssrA'* проверяли на рост на среде M9 с Фен, но без Тир (Рисунок 3.18) (Doroshenko et al., 2010). Штаммы по росту на этой среде можно было разделить на три группы: растущие, как BW25113 $\Delta$ *pheA*; слабо растущие штаммы (с ТугА-А-LAA и с ТугА-А-AAV), и промежуточный по росту штамм с ТугА-LAA.

Для подтверждения изменений в белках ТугА-SsrA' определяли их PDH-активность. Действительно, эта активность снижалась по мере восстановления исходного *ssrA*-конца (Таблица 3. 12) (Doroshenko et al., 2010).

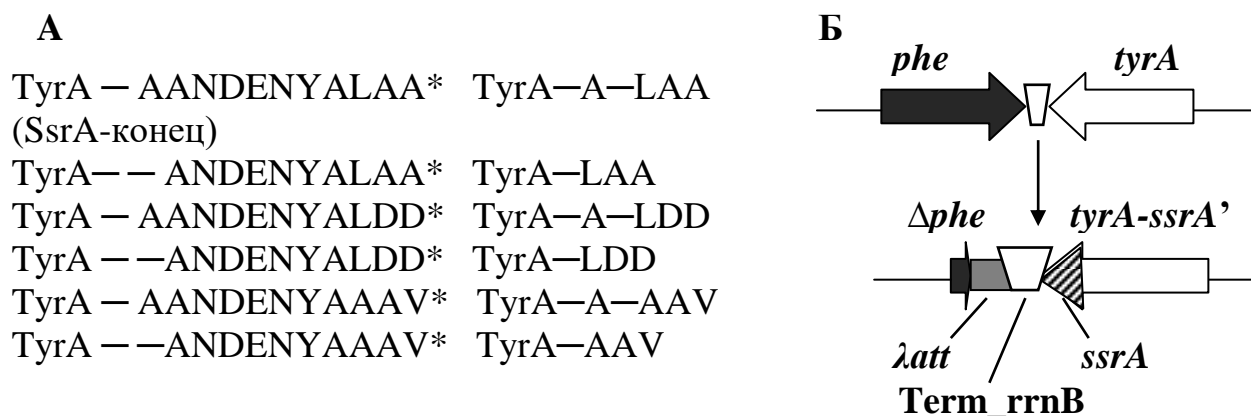


Рисунок 3.17 - Модификации SsrA (SsrA') на С-конце TyrA (А) и схема, демонстрирующая изменения локуса *pheA-tyrA* в хромосоме *E. coli* (Б)  
 При получении *tyrA-ssrA'* природный терминатор после гена *tyrA* был заменён на терминатор *rrnB*, ген *pheA* инактивирован. *lattB* остался после вырезания маркера.

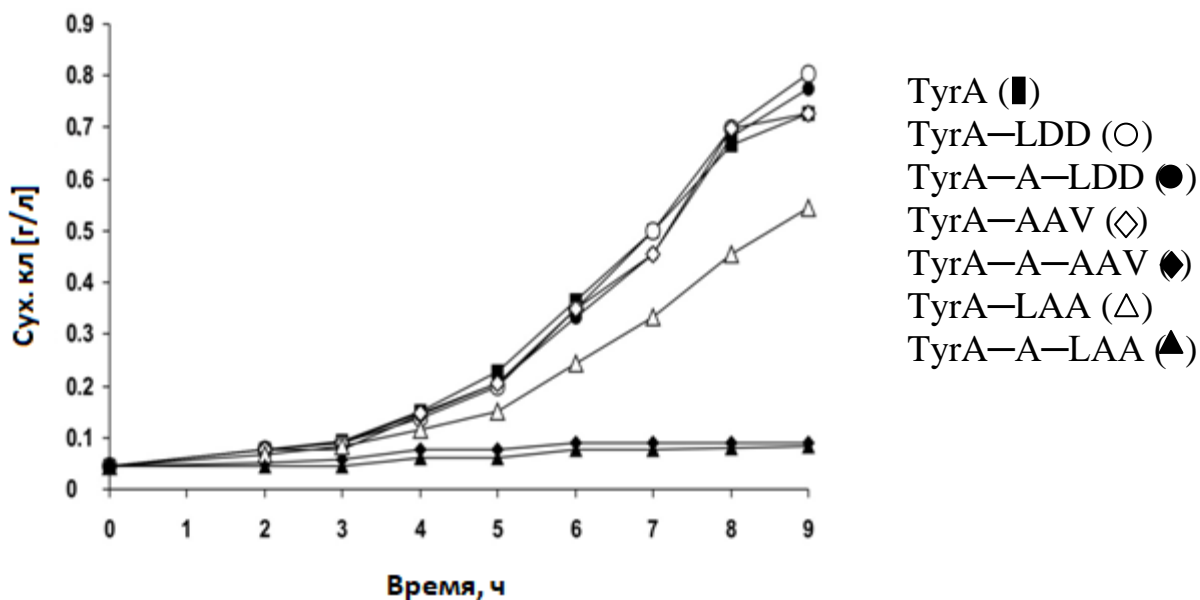


Рисунок 3.18 - Рост штаммов BW25113 $\Delta$ *pheA* и BW25113 $\Delta$ *pheA**tyrA-ssrA'* в минимальной среде М9 с Фен (37°C, 240 об/мин)

Таблица 3.12 - Активность PDH в клеточных экстрактах

Продукт <i>tyrA-ssrA'</i> в BW25113 $\Delta$ <i>pheA</i>	Активность (нМ/мин мг), в присутствии		
	1% глицерина	—	—
	—	—	50 мкМ L-Тир
TyrA <sup>wt</sup>	31	29	9
TyrA-LDD	32	28	6
TyrA-A-LDD	28	9	не опред.
TyrA-LAA	20	<1	не опред.

При приготовлении клеточных экстрактов в присутствии глицерина и без него было обращено внимание, что снижение активности более значительно в последнем случае (Таблица 3.12). Если активности ферментов TyrA<sup>wt</sup> и TyrA-LDD были примерно одинаковы с глицерином и без, то уже активность TyrA-A-LDD снизилась почти на 70%, а активность TyrA-LAA – более чем на 95% в экстрактах, приготовленных без глицерина. Активность TyrA-A-LAA не определялась даже в присутствии глицерина. Глицерин, как известно, добавляют для поддержания конформационной стабильности ферментов (Bradbury, Jakoby, 1972). Таким образом, SsrA'-хвост, по мере приближения к оригиналу, способствовал увеличению структурной нестабильности белка, по-видимому, из-за ускорения его протеолиза.

Гены, кодирующие TyrA, TyrA-LAA, TyrA-A-LAA, TyrA-LDD и TyrA-A-LDD, были введены в продуцент Фен DV269, который был тирозиновым ауксотрофом ( $\Delta$ *tyrA*). Полученные штаммы тестировали в периодической ферментации на комплексной среде, содержащей Тир только в составе дрожжевого экстракта. Штаммы различались по накоплению биомассы и продукции Фен (Рисунок 3.19) (Doroshenko et al., 2010). Все штаммы с TyrA-SsrA' практически не накапливали Тир ( $\leq 0,1\%$  от продукции Фен) по сравнению со штаммом TyrA<sup>+</sup> (Таблица 3.13). В той же ферментации новые штаммы сравнивали со штаммами  $\Delta$ *tyrA*, TyrR<sup>+</sup> и TyrR<sup>-</sup>: DV269 и DV269 $\Delta$ *tyrR*

(Рисунок 3.19). Последние штаммы культивировали на такой же комплексной среде, что и штаммы TyrA-SsrA', но с добавлением 0,125 г/л Тир. Штамм DV269TyrA-LAA, в отличие от других штаммов *tyrA-ssrA*, синтезировал больше Фен, чем DV269 (в 1,5 раза). Уровень продукции Фен для DV269TyrA-LAA соответствовал продукции Фен штаммом DV269 $\Delta$ *tyrR*. По-видимому, в продуценте DV269TyrA-LAA (обозначен далее как DV1017) подобрался оптимальный уровень синтеза тирозина, который сбалансировал накопление биомассы и TyrR-опосредованную репрессию, что привело к увеличению продукции фенилаланина.

Таблица 3.13 - Примесь Тир для производных DV269, содержащих различные аллели *tyrA*

Аллель	TyrA	TyrA-LAA	TyrA-A-LAA	TyrA-LDD	TyrA-A-LDD
Tyr, мг/л	50 $\pm$ 10	4 $\pm$ 2	< 2	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2
Tyr/Phe, %	1.3	0.06	<0.04	0.1	0.1

Таким образом, был получен модельный продуцент фенилаланина DV1017, не нуждающийся в добавлении тирозина в ферментационную среду и накапливающий Фен в ферментации на уровне изогенного штамма  $\Delta$ *tyrA* $\Delta$ *tyrR*. Этот штамм использовался в следующих пунктах данной работы.

Результатом этой части работы явилась разработанная стратегия получения продуцента Фен, не нуждающегося в тирозине. Эта стратегия была реализована в промышленном продуценте.

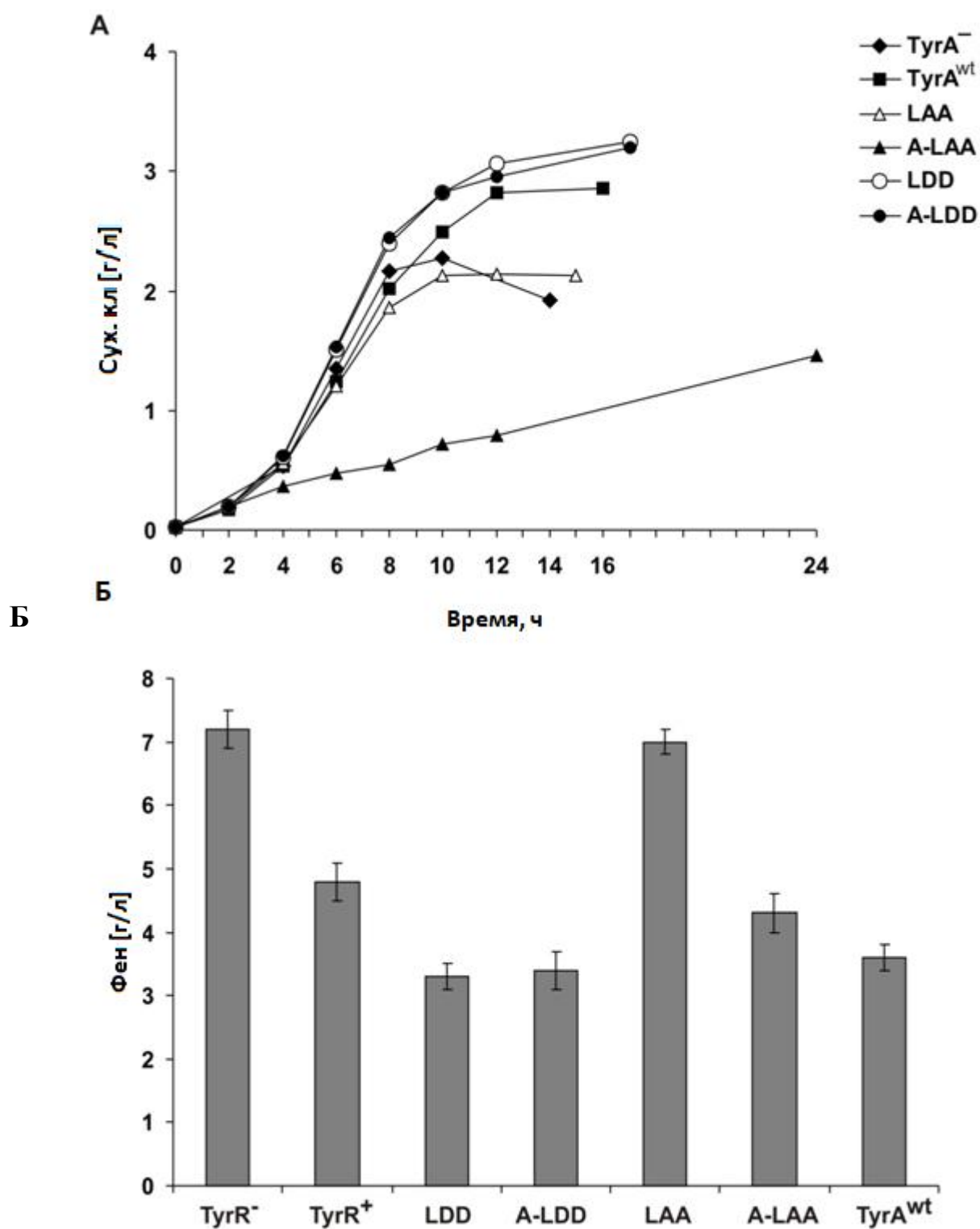


Рисунок 3.19 - Накопление биомассы (А) и продукция Фен (Б) в ферментации в аппаратах для штаммов  $\Delta tyrA$  DV269 $\Delta tyrR$  (TyrR<sup>-</sup>), DV269 (TyrR<sup>+</sup>) и производных DV269, содержащих различные аллели *tyrA-ssrA'*, а так же *tyrA*.

### 3.5. Исследование достаточности восстановленного флавина для хоризматсинтазы *E. coli* при продукции *L*-фенилаланина

Хоризмат-синтаза *E. coli*, катализирующая последнюю реакцию общего ароматического пути, имела абсолютную зависимость от восстановленного флавинмононуклеотида (FMNH<sub>2</sub>), являющегося крайне нестабильным соединением. В отличие от монофункциональной CHS кишечной палочки бифункциональная CHS *S. cerevisiae* (ген *ARO2*) восстанавливала флавин с использованием NADPH. Нами было сделано предположение, что FMNH<sub>2</sub> может быть в дефиците в клетках *E. coli*, продуцирующих Фен, и использование бифункционального фермента может привести к увеличению продукции последнего (Слесарёва и др., 2017).

#### 3.5.1. Экспрессия гена *ARO2*, кодирующего хоризмат-синтазу *S. cerevisiae*, в *E. coli*

Для гетерологичной экспрессии в кишечной палочке ген *ARO2* был химически синтезирован с заменой редких для *E. coli* кодонов (Раздел 2.6.5). Для проверки экспрессии синтезированного гена *ARO2* с оптимизированными для *E. coli* кодонами использовали вновь полученную плазмиду pET-*ARO2*, где этот ген был подставлен под промотор  $\phi 10$ , узнаваемый РНК-полимеразой фага T7. Экспрессию *ARO2* в системе T7 тестировали в клетках BL21(DE3), индуцированных ИПТГ. Как видно из электрофореграммы (Рисунок 3.20), в клеточном экстракте BL23(DE3)/pET-*ARO2* присутствовал белок, соответствующий по своему размеру мономеру *ARO2* (40,8 кДа). В дальнейшем область инициации трансляции *ARO2* из pET-*ARO2* (TIR <sub>$\phi 10$ T7</sub>) была использована для экспрессии этого гена, интегрированного в хромосому, под контролем промотора P<sub>tac</sub>.

Субстрат для хоризмат-синтазы не являлся коммерчески доступным веществом, но он мог нарабатываться в клетке. Поэтому функциональность фермента *ARO2*, синтезирующегося в клетках *E. coli*, предполагалось проверять *in vivo*. Для этого структурная часть гена *ARO2* была интегрирована в

хромосому штамма *TG1ΔaroC* в природный сайт *attB* фага φ80. Для контроля аналогичным образом была проведена интеграция *aroC*. Полученные штаммы *TG1ΔaroCφ80attL-ARO2-φ80attR* и *TG1ΔaroCφ80attL-aroC-φ80attR*, содержащие гены хоризмат-синтаз без промоторов, не росли в минимальной среде М9 без добавок АА, как и исходный штамм *TG1ΔaroC*. Производные обоих штаммов начинали расти на среде М9 после интеграции промотора  $P_{tac}$  перед генами *ARO2* и *aroC* (Таблица 3.14). В штаммах *TG1ΔaroCφ80attL-P<sub>tac</sub>-ARO2-φ80attR* (*TG1ΔaroCP<sub>tac</sub>-ARO2*) и *TG1ΔaroCφ80attL-P<sub>tac</sub>-aroC-φ80attR* (*TG1ΔaroCP<sub>tac</sub>-aroC*) обе конструкции комплементировали функцию *AroC* без добавления ИПТГ.

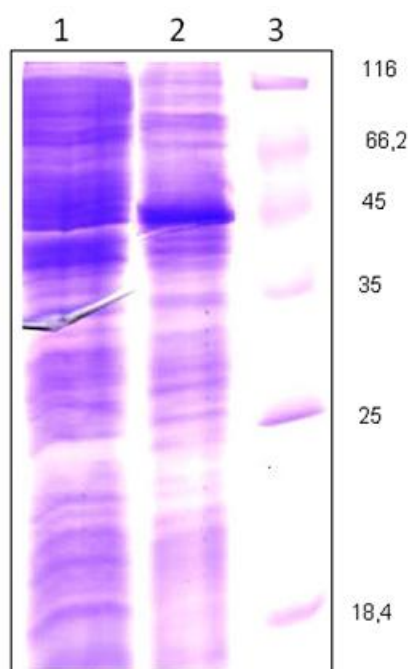


Рисунок 3.20 – Экспрессия *ARO2* в системе T7

Электрофоретический анализ в 12,5% SDS-ПААГ клеточных экстрактов штаммов BL23(DE3)/pET-22b (1) и BL23(DE3)/pET-22b-*ARO2* (2), выращенных с добавлением ИПТГ. М — маркеры молекулярной массы.

Как видно из табл. 4.5.1, штамм  $TG1\Delta aroCP_{tac}-ARO2$  имел более высокую скорость роста по сравнению с  $TG1$  и  $TG1\Delta aroCP_{tac}-aroC$ . Преимущество в росте штамма  $TG1\Delta aroCP_{tac}-ARO2$  могло определяться, как свойствами  $ARO2$ , так и различием в экспрессии  $ARO2$  и  $AroC$  в клетках  $TG1\Delta aroC$ .

Таблица 3.14 - Рост производных штамма  $TG1\Delta aroC$  с генами  $ARO2$  и  $aroC$  на среде M9 без AA

Штамм	TG1	$TG1\Delta aroC$	$TG1\Delta aroCP_{tac}-ARO2$	$TG1\Delta aroCP_{tac}-aroC$
$\mu, ч^{-1}$ (7-8 ч)	0,13	0	0,15	0,13
$\mu, ч^{-1}$ (5-6 ч)	0,20	0	0,21	0,18
$\mu, ч^{-1}$ (3-4 ч)	0,41	0	0,46	0,36

Для тестирования синтеза  $ARO2$  и  $AroC$  в  $TG1\Delta aroCP_{tac}-ARO2$  и в  $TG1\Delta aroCP_{tac}-aroC$  белки из клеточных экстрактов этих штаммов были проанализированы с помощью SDS-ПААГ (Рисунок 3.21). Белковая полоса, близкая по подвижности к мономеру  $ARO2$  (40,8 кДа) была слабо видна только в экстракте клеток  $TG1\Delta aroCP_{tac}-ARO2$ , индуцированных ИПТГ (Рисунок 3.21; дорожка 5). Белковая полоса, соответствующая по размеру мономеру  $AroC$  (39,1 кДа), присутствовала в экстрактах клеток  $TG1\Delta aroCP_{tac}-aroC$  независимо от добавления ИПТГ (там же; дорожки 3, 6). Для подтверждения наличия  $ARO2$  и  $AroC$  в упомянутых пробах, обозначенных далее по номерам дорожек, а также для поиска  $ARO2$  в пробе 2 (клеточный экстракт  $TG1\Delta aroCP_{tac}-ARO2$  без ИПТГ), белковые зоны, обозначенные овалами на том же рисунке, были вырезаны из геля, обработаны трипсином и проанализированы с помощью MALDI-TOF.  $ARO2$  не был обнаружен в пробе 2, но его присутствие в пробе 5 оценивалось в 207 баллов. (Баллы выше 86 были значимыми.) Присутствие  $AroC$  в пробах 3 и 6 (без и с добавлением ИПТГ) оценивалось в 160 и 169 баллов соответственно.



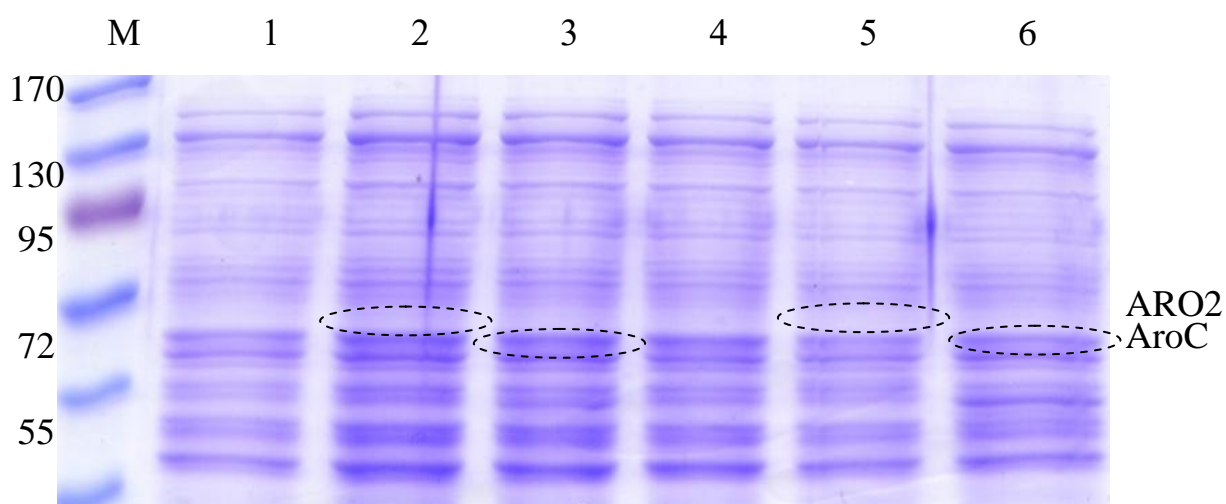


Рисунок 3.21 - Электрофоретический анализ в 12,5% SDS-ПААГ клеточных экстрактов штаммов выращенных в среде M9 без (1–3) и с добавлением 1 мМ ИПТГ (4–6)

TG1 – дорожки 1, 4; TG1 $\Delta$ aroCP<sub>tac</sub>-ARO2 - 2, 5; TG1 $\Delta$ aroCP<sub>tac</sub>-aroC - 3, 6. Овалами обозначены зоны, отданные на масс-спектроскопию. М - маркеры молекулярной массы.

Поскольку ARO2 был виден только в экстрактах клеток, индуцированных ИПТГ, в отличие от AroC, обнаруженного в клетках, выращенных как с ИПТГ, так и без него, было сделано заключение, что экспрессия гена *ARO2* была слабее, чем гена *aroC*. Такой вывод подтвердился количественной оценкой эффективности трансляции с помощью UTR Designer (Seo *et al.*, 2013). Этот *in silico* метод предсказал в четыре раза более высокую трансляцию TIR<sub>10T7</sub>-*aroC* по сравнению с TIR<sub>10T7</sub>-*ARO2*. Следовательно, слегка улучшенный рост TG1 $\Delta$ aroCP<sub>tac</sub>-*ARO2* по сравнению со штаммами TG1 $\Delta$ aroCP<sub>tac</sub>-*aroC* и TG1, содержащими ген *aroC* дикого типа, мог быть обусловлен свойствами бифункциональной хоризмат-синтазы ARO2.

### 3.5.2. Сравнение двух типов хоризмат-синтаз в продуценте фенилаланина DV1017

Предполагая, что преимущества бифункционального фермента могли быть выявлены в условиях сверхпродукции соединений, образующихся из хоризмата,  $P_{tac}$ -ARO2 и  $P_{tac}$ -aroC были введены в продуцент фенилаланина с инактивированной хоризмат-синтазой DV1017 $\Delta$ aroC. Этот штамм не синтезировал Фен (Таблица 3.15, строка 2). Штаммы DV1017 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 и DV1017 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC (там же, строки 3, 4) продуцировали Фен на уровне штамма DV1017 (там же, строка 1). Все штаммы, продуцирующие Фен, накапливали незначительные примеси Тир, т.к. содержали ослабленный аллель хоризмат-мутазы/префенат-дегидрогеназы *tyrA*-LAA (Раздел 3.4). Новые штаммы DV1017 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC и DV1017 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2 увеличили накопление биомассы на 6 и 9%, соответственно, по сравнению со штаммом DV1017 и это, вероятно, произошло из-за увеличения синтеза Тир (+ $\Delta$ 40 и 30 %). При этом продукция Фен практически не увеличилась (+ $\Delta$ 1.5 и 3%).

Таблица 3.15 - Накопление Фен (основной продукт) и Тир (примесь) при ферментации в аппаратах

№	Штамм	ОП <sub>540нм</sub>	Фен, г/л	Тир, мг/л
1	DV1017	32 $\pm$ 2	6,6 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 2
2	DV1017 $\Delta$ aroC	13 $\pm$ 2	<0,02	<0,02
3	DV1017 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -aroC	34 $\pm$ 2	6,8 $\pm$ 0,5	10 $\pm$ 2
4	DV1017 $\Delta$ aroC $P_{tac}$ -ARO2	35 $\pm$ 2	6,7 $\pm$ 0,5	9 $\pm$ 2

Предположительно, активность хоризмат-синтазы не являлась узким местом биосинтеза Фен в штамме DV1017. Клеточная флавинредуктазная активность могла быть достаточной для хоризмат-синтазы AroC, и использование бифункциональной хоризмат-синтазы ARO2 не давало преимуществ.

### 3.5.3. Сравнение двух типов хоризмат-синтаз в продуценте фенилаланина DV1017 $\Delta$ *tyrR*

Активность хоризмат-синтазы могла стать узким местом биосинтеза Фен после дальнейшего расширения ароматического пути в штамме DV1017, например, после инактивации репрессора этого пути *TyrR*. Действительно, введение делеции  $\Delta$ *tyrR* в DV1017 привело к улучшению показателей штамма: выхода фенилаланина из глюкозы на 1%, продуктивности на 0,02 г/л/ч (Рисунок 3.22).

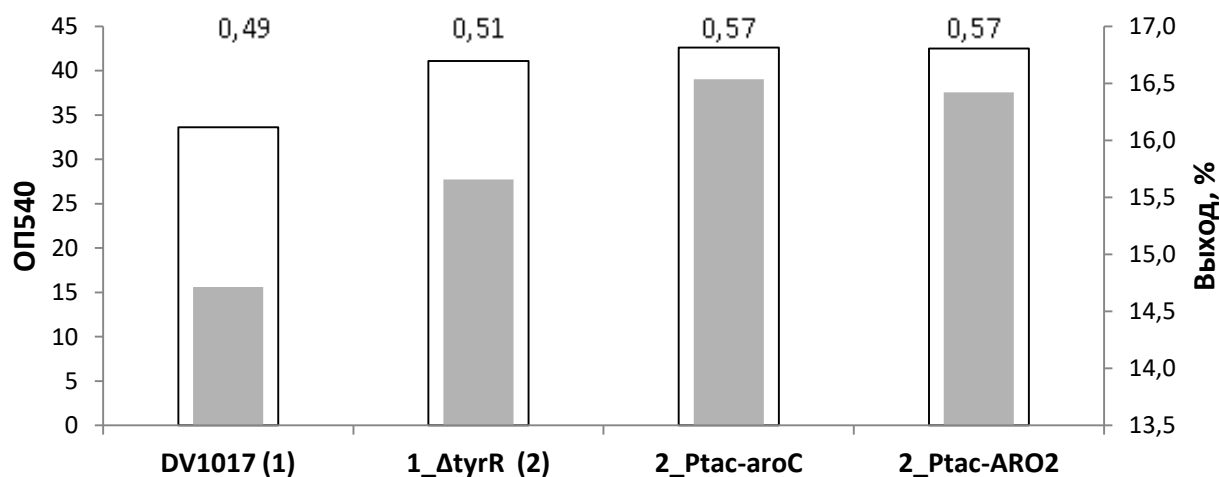


Рисунок 3.22 – Результаты ферментации в аппаратах Biostat Q штаммов DV1017 и вариантов DV1017 $\Delta$ *tyrR* (обозначены под диаграммами)

ОП и выход – белые и серые прямоугольники соответственно. Выше прямоугольников показана продуктивность (г/л/ч).

Введение в штамм DV1017 $\Delta$ *tyrR* модификаций P<sub>tac</sub>-*ARO2* или P<sub>tac</sub>-*aroC* повысило выход фенилаланина из глюкозы на 0,8 и 0,9%, соответственно, а продуктивность на 0,06 г/л/ч по сравнению с показателями DV1017 $\Delta$ *tyrR* (там же). Хоризмат-синтаза стала «узким местом» в продуценте фенилаланина DV1017 $\Delta$ *tyrR*, т.к. введение дополнительного гена этого фермента приводило к увеличению продукции. Однако, положительный эффект P<sub>tac</sub>-*ARO2* и P<sub>tac</sub>-*aroC* на продукцию фенилаланина был одинаковый.

### 3.5.4. Тестирование бифункциональности ARO2 в продуценте фенилаланина DV1017 $\Delta$ *pgi*

CHS ARO2 не показала преимуществ перед AroC, поэтому возник вопрос о проявлении бифункциональности ARO2 в клетках *E. coli*. Поскольку бифункциональный фермент ARO2 был зависимым от NADPH, то он мог иметь преимущества перед монофункциональным ферментом в случае усиления окислительной части PPP, в котором NADPH образуется.

Для перенаправления потока углерода через окислительную часть PPP в штаммах DV1017 $\Delta$ *aroC*P<sub>tac</sub>-*ARO2* и DV1017 $\Delta$ *aroC*P<sub>tac</sub>-*aroC* делетировали ген *pgi*, кодирующий фосфоглюкозоизомеразу. Полученные штаммы сравнили с исходными и между собой в ферментации (Рисунок 3.23). Время ферментации штаммов  $\Delta$ *pgi* стало более 20 часов, тогда как исходные штаммы потребляли то же количество глюкозы за 13-15 часов. Замедленный рост штаммов  $\Delta$ *pgi* на среде с глюкозой объяснялся нарушением окислительно-восстановительного потенциала клетки из-за переизбытка образования NADPH. Тем не менее, штамм DV1017 $\Delta$ *aroC*P<sub>tac</sub>-*ARO2* $\Delta$ *pgi* дорос до более высокой оптической плотности (ОП<sub>540</sub> = 35), имел более высокую продуктивность (0,21 г/л/ч), по сравнению с показателями DV1017 $\Delta$ *aroC*P<sub>tac</sub>-*aroC* $\Delta$ *pgi* (ОП<sub>540</sub> = 31, продуктивность – 0,16 г/л/ч). Выходы фенилаланина из глюкозы у обоих штаммов  $\Delta$ *pgi* снизились относительно исходных штаммов DV1017 $\Delta$ *aroC*P<sub>tac</sub>-*ARO2* и DV1017 $\Delta$ *aroC*P<sub>tac</sub>-*aroC*, у которых они равнялись 15%, на 5 и 7%

соответственно. Следовательно, перенаправление потока углерода через PPP имело негативный эффект на ферментационные характеристики обоих штаммов, но для штамма с *ARO2* этот эффект был слабее.

Как видно из Рисунка 3.23, инактивация окислительной части PPP в результате введения делеции гена *zwf* снизила продуктивность обоих штаммах. При этом снижение этой характеристики для штамма с  $P_{tac}\text{-}ARO2$ , у которого продуктивность изначально была выше, было сильнее ( $\Delta 0,04$  г/л/ч), чем для штамма с  $P_{tac}\text{-}aroC$  ( $\Delta 0,02$  г/л/ч).

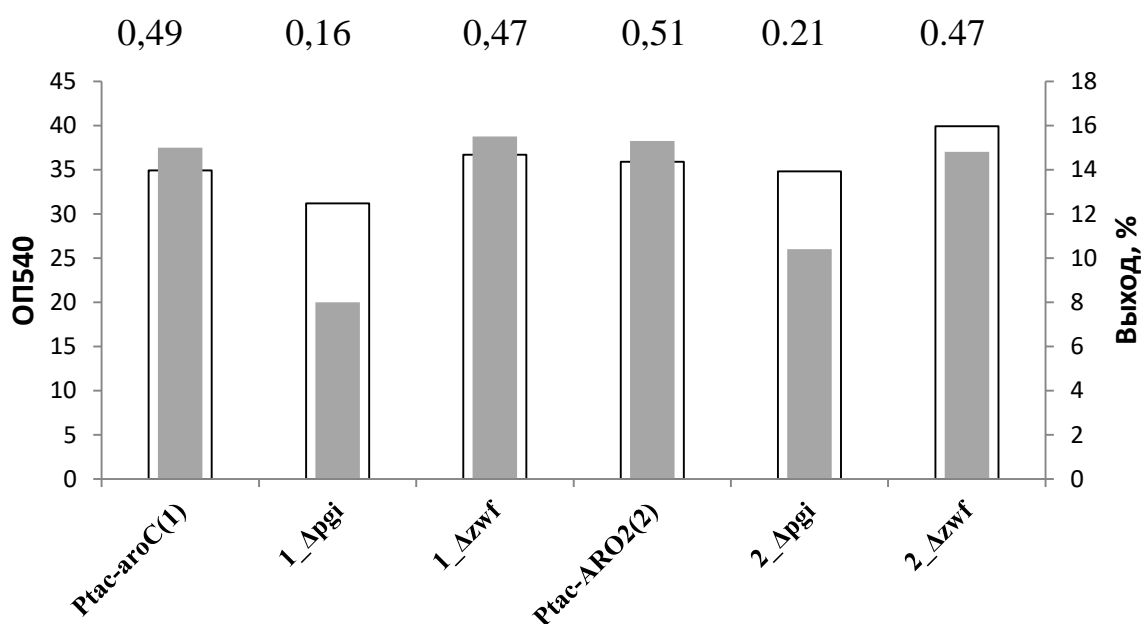


Рисунок 3.23 – Результаты ферментации, проведенной в аппаратах Biostat Q, штаммов - производных *DV1017aroC*

ОП и выход – белые и серые прямоугольники соответственно. Выше прямоугольников показана продуктивность (г/л/ч).

Таким образом, было показано, что бифункциональная CHS *S. cerevisiae* пригодна для использования в продуценте Фен *E. coli*. Штамм-продуцент Фен, содержащий бифункциональный фермент *ARO2*, оказался более зависимым от

функционирования окислительной части PPP. CHS ARO2 проявила своё бифункциональное свойство в штамме *Δpgi*, где она повысила устойчивость клеток к сверхпродукции NADPH за счёт его потребления. Преимущества гетерологичной хоризмат-синтазы перед собственной хоризмат-синтазой в клетках *E. coli Pgi<sup>+</sup>* не были выявлены.

### **3.6. Конструирование модельного продуцента с метаболической регуляцией синтеза *L*-фенилаланина**

#### **3.6.1 Конкуренция между синтезом фенилаланина и накоплением биомассы**

Фен синтезировался из E4P, интермидиата пентозофосфатного пути, поток углерода в который был значительно ниже, чем в путь EMP, что было продемонстрировано и в нашем исследовании также. В условиях роста на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного источника углерода через PPP утилизировалось не более 20 % углерода для лабораторного штамма MG1655 (Таблица 3.16) (*Киверо и др.*, 2008). В этих условиях были определены коэффициенты метаболических потоков для штамма MG1655, его производных с инактивацией различных ветвей гликолиза (EDP, EDP+PPP, EMP) и продуцента Фен. В продуценте Фен PPP был усилен на 10 %, о чём свидетельствовало увеличение доли PEP, образующегося из PPP.

Коэффициенты метаболических потоков продуцента Фен соответствовали в большей степени таковым для MG1655, но со следующими исключениями. Из-за ослабления потока углерода через путь EMP наблюдалось перераспределение потоков на Сер: сокращение доли Сер из EMP (из G3P) и увеличении доли Сер, образующегося из Гли.

Дополнительное отличие продуцента от всех исследованных лабораторных штаммов касалось увеличения конверсии OA в фумаровую кислоту (Fum), что согласно лит. данным (*Sauer et al.*, 1999), могло

свидетельствовать о дефиците аммония. Fum образовывался из аспарагиновой кислоты с выделением аммония. Лимитация по аммоний при росте продуцента на минимальной среде M9 могла начинаться из-за синтеза Фен, для которого требовался аммоний, и которого могло быть недостаточно в среде M9.

Таблица 3.16 – Коэффициенты метаболических потоков для штаммов, растущих в среде M9

Штамм	MG1655				продуцент Фен
	Доля от общ. пула, %	– $\Delta edd-eda$	$\Delta edd-eda-zwf$	$\Delta edd-eda, \Delta pgi$	
PEP из EMP	82	80	90	12*	70
PEP из PPP	18	20	10*	88	30
R5P из окс. PPP	21	14	0	56	19
R5P из E4P и F6F	22	20	26	10	23
R5P из G3P	57	66	74	34	58
Ser из Gly	20	32	34	19	61
Ser из G3P	80	68	66	81	39
OA из PEP	62	51	59	44	60
OA из TCA	38	49	41	56	40
OA $\leftrightarrow$ Fum	75	60	44	46	84

\* Эти значения получились вследствие обратимости реакций PPP и гликолиза.

Искусственное усиление PPP пути положительно сказывалось на продукции Фен. В Таблице 3.17 приведён пример с тюнингом экспрессии гена *pgl* в модельном продуценте фенилаланина DV157 (Патент РФ 2288268). Этот ген кодировал 6-фосфоглюконолактоназу (6PGL) (EC 3.1.1.31), катализирующую вторую реакцию оксидативной части PPP. Замена природной регуляторной области гена *pgl* на конститутивные промоторы разной силы приводила к повышению активности 6PGL, что коррелировало с увеличением

накопления фенилаланина в культуральной жидкости в ферментации в пробирках. При этом снижалась оптическая плотность, т.е. накопление биомассы. Подавление роста происходило в результате увеличения потока через РРР и, отчасти, из-за токсичного эффекта NADPH, образующегося в его оксидативной части.

Таблица 3.17 - Накопление фенилаланина при ферментации в пробирках

Штамм	OD <sub>540</sub>	Фен, г/л	бPGL, Ед/мин*
DV157	18,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1	7 ± 2
DV157 P <sub>tac-900</sub> - <i>pgl</i>	18 ± 2	0,9 ± 0,2	не опред.
DV157 P <sub>tac-3900</sub> - <i>pgl</i>	13 ± 4	1,2 ± 0,2	26 ± 4

\* Активность определялась в производных штамма BW25113, содержащих указанные модификации гена *pgl*.

Очевидно, что во время роста клеток накопление Фен являлось вторичным процессом и, действительно, в реальных процессах основное накопление Фен происходило после окончания роста, в стационарной фазе. Для поддержания стационарной фазы в промышленной ферментации использовался периодический процесс с подпиткой глюкозы. Поэтому использование регулируемого синтеза Фен в ферментации было актуальным.

### 3.6.2. Моделирование стационарной фазы в периодической ферментации с помощью $P_i$ -лимитации

Для продления стационарной фазы в периодической ферментации проводились эксперименты по подбору концентраций  $P_i$ , которые бы лимитировали рост, но не продукцию Фен. В том числе, такие эксперименты проводились для модельного продуцента DV269 Фен (Таблица 3.17) (Патент РФ 2405040). При снижении концентрации  $KH_2PO_4$  индуцировалась щелочная фосфатаза, наблюдалось снижение биомассы и увеличение накопления Фен.



Таблица 3.17 - Накопление Фен при ферментации в пробирках для штамма DV269 в зависимости от концентрации Pi

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , г/л	$\text{OD}_{540}$	Фен, г/л	Индукция PhoA
1	$24 \pm 1$	$3,9 \pm 0,2$	нет
0,6	$23 \pm 1$	$5,0 \pm 0,2$	есть
0,4	$22 \pm 1$	$5,5 \pm 0,1$	есть

Для определения характеристик DV269 Pi-лимитация ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6 г/л) была воспроизведена при культивировании в аппаратах (Рисунок 3.24). Было обнаружено, что лимитация по Pi в ферментации наступала во второй половине экспоненциальной фазы роста, т.е. после истощения Pi в среде клетки продолжали ещё расти. Клетки могли использовать внутренние запасы Pi, накопившиеся в виде полифосфатов во время роста при избытке Pi в среде.

Отсутствие отрицательного эффекта Pi-лимитации на рост продуцента Фен позволяло использовать регуляторные элементы Pho-регулона для контроля биосинтеза Фен в ферментации.

Поток углерода в общий ароматический путь контролировался активностью ДАНР-синтазы. Определение активности ДАНР-синтазы при периодическом культивировании в аппаратах выявило её существенное снижение ко второй половине ферментации (Рисунок 3.24 В). Активность этого фермента снижалась в два раза. При этом активность, определённая в присутствии Фен, была в два раза ниже активности фермента, тестируемой без Фен. Таким образом, ДАНР-синтазная активность могла быть узким местом при синтезе Фен в штамме DV269.

DV269, помимо природных генов ДАНР-синтаз, содержал ген *aroG4*, кодирующий устойчивый к Фен фермент, под нативным промотором. Поскольку активность ДАНР-синтазы в присутствии Тир или Три существенно не менялась, то был сделан вывод, что основной вклад в активность, устойчивую к Фен, давал мутантный фермент AroG4. Действительно, DV269

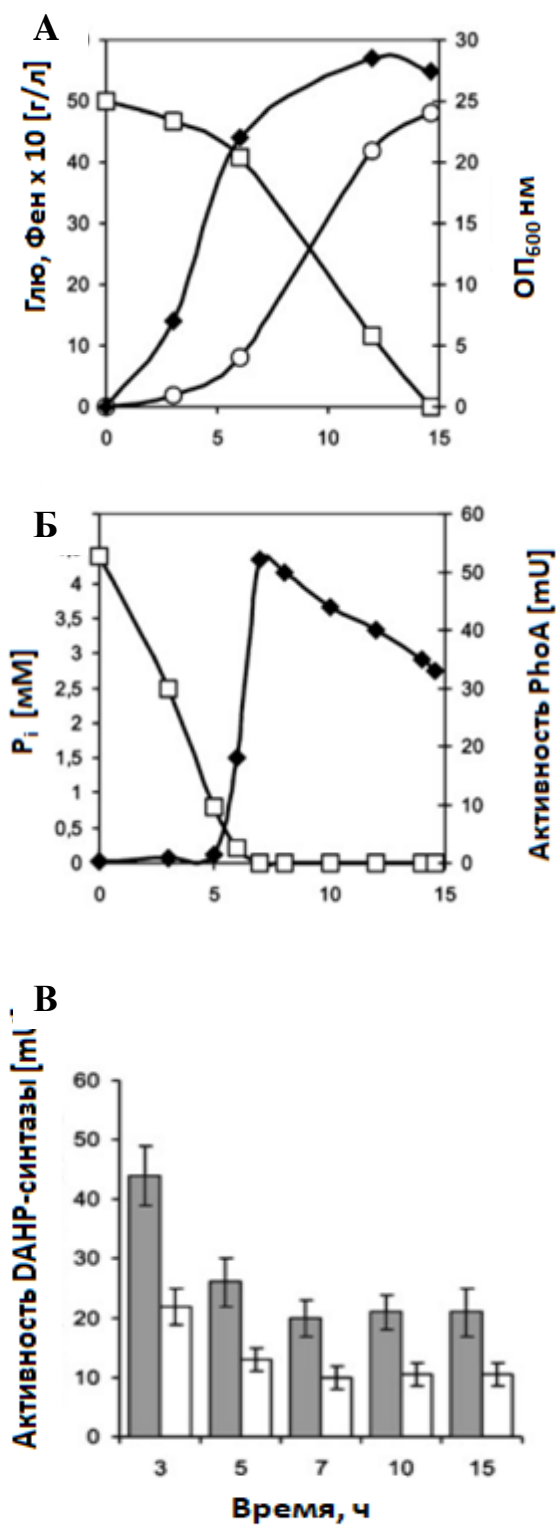


Рисунок 3.24 - Временные показатели штамма DV269 при периодическом культивировании в аппаратах BIOSTAT Q

А: Накопление биомассы ( $\blacklozenge$ ), Фен ( $\circ$ ), потребление глюкозы ( $\square$ ).

Б:  $P_i$  ( $\square$ ) и активность щелочной фосфатазы ( $\blacklozenge$ ).

В: Активность DANP-синтазы в присутствии Фен ( $\square$ ) и без него ( $\blacksquare$ ).

являлся штаммом  $TyR^+$ , поэтому вклад  $AroF$  в общую активность был незначителен, т.к.  $TyR$ -опосредованная репрессия  $aroF$  была более сильной, чем  $aroG$ .

### 3.6.3. Использование промоторов генов $Pho$ -регулона для контроля экспрессии гена $aroG4$

Для контроля экспрессии гена  $aroG4$  тестировали известные промоторы  $Pho$ -регулона  $P_{phoA}$  и  $P_{pstS}$ . Если первый промотор узнавался РНК-полимеразой в комплексе с  $\sigma^{70}$ , то второй промотор – как с  $\sigma^{70}$ , так и с  $\sigma^S$ , что могло улучшить транскрипцию целевого гена в стационарной фазе. После замены нативного промотора  $P_{aroG}$  в штамме DV269 на  $P_{phoA}$  или  $P_{pstS}$  наблюдалось увеличение продукции Фен для вновь полученных штаммов DV271 и DV368 по сравнению с исходным штаммом DV269 (Таблица 3.18). Таким образом, недостаточная активность ДАНР-синтазы, действительно, оказалась узким местом биосинтеза фенилаланина в штамме DV269.

Таблица 3.18 - Продукция Фен в периодической ферментации из глюкозы

Штамм	Регуляция $aroG4$	ОП540нм	Фен, г/л
DV269	$P_{aroG}$	22,0	4,8
DV271	$P_{phoA}$	23,2	6,1
DV271 $\Delta rpoS$	$P_{phoA}$	21,4	7,2
DV368	$P_{pstS}$	24,2	6,7
DV368 $\Delta rpoS$	$P_{pstS}$	22,4	6,4

Возрастание продукции Фен для штаммов DV368 и DV271 по сравнению с исходным штаммом DV269 коррелировало с увеличением активности ДАНР-синтазы (Рисунок 3.25). Для штамма DV368, содержащего  $P_{pstS}$ - $aroG4$ , и характеризующегося более высокой активностью этого фермента (на 20%), продукция Фен увеличилась более существенно (~40%), чем для штамма

DV271 с  $P_{phoA}$ -*aroG4*. Инактивация  $\sigma^S$ , как и следовало ожидать, немного снижала продукцию Фен для DV368 (4%), но давала положительный эффект для DV271 (18%).

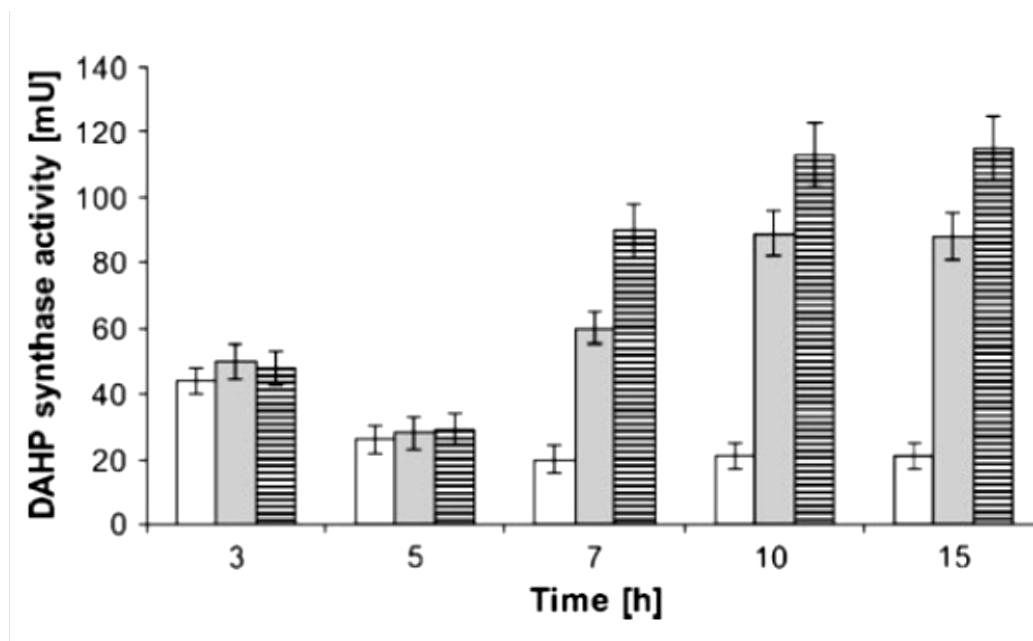


Рисунок 3.25 - Изменение активности ДАНР-синтазы при периодическом культивировании в аппаратах BIOSTAT Q в штаммах DV269 (□), DV271 (■), DV368 (▨)

Как видно из последнего рисунка, увеличение активности ДАНР-синтазы в штаммах DV368 и DV271 происходило во второй половине культивирования, поэтому не сказывалось отрицательно на накоплении биомассы (Таблица 3.18).

Таким образом, было продемонстрировано использование промоторов, относящихся к *Pho*-регулону, для регуляции синтеза Фен.

Применение *Pho*-регуляции оказалось реальным из-за отсутствия негативного эффекта *Pi*-лимитации на продукцию Фен. Образование продуктов из общего ароматического пути может быть благоприятным фактором при *Pi*-лимитации, т.к. при синтезе 1 М Фен в общем ароматическом пути выделяется 4 М *Pi*. Помимо основного набора генов, участвующих в ассимиляции фосфора, более 300 генов также регулируются *PhoB*, непосредственно, либо

опосредованно через регуляторы, которые активирует PhoB (*Yang et al.*, 2012). Предполагая, что при клеточном ответе на Pi-лимитацию могут активироваться реакции или биосинтетические пути, в которых высвобождается Pi, мы обнаружили, что PhoB активирует ген *tktB*, кодирующий транскетолазу, ответственную за образование эритрозо-4-фосфата (*Keseler et al.*, 2017).

Интересно, что Pho-регуляция синтеза продукта обнаружена в природе. В последние годы стало известно, что в актиномицетах синтез некоторых вторичных метаболитов находится под контролем регуляторов, отвечающих за клеточный ответ на лимитации по азоту или фосфору (*Xu et al.*, 2019).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа отражает определённые этапы в развитии методологии и идеологии конструирования продуцентов полезных соединений, на примерах продуцентов аминокислот.

Так, в работе проиллюстрирован переход от молекулярно-генетических методов, совмещённых с генной инженерией, к рекомбинационной инженерии, применяемых к конструированию штаммов. Если первые методы были использованы для изучения сахарозного транспозона с целью рационализации получения продуцентов *E. coli*, растущих на сахарозе, то вся последующая работа автора основана на применении рекомбинационной инженерии. Этот подход к получению штаммов, внедрённый в практику АО «АГРИ» в нулевые годы 21 века и явившийся тогда пионерским, включает последовательное конструирование штамма из хромосомных генетических модификаций с известной первичной структурой.

Что касается идеологии конструирования продуцентов для микробиологического производства, то она развивалась от «максимизации экспрессии генов биосинтетического пути» до «оптимизации этого пути», в том числе через осуществление метаболической регуляции биосинтеза целевого продукта (*Машко и др.*, 2002). В работе идеология метаболической регуляции была внедрена в практику на примере использования Pho-регуляции для получения *L*-фенилаланина.

В работе подходы к конструированию продуцентов ароматических аминокислот были расширены новой практикой использования экспортёра таких аминокислот. Охарактеризованный в работе YddG неоднократно рассматривался в дальнейшем для повышения продуктивности штаммов (*Lütke-Eversloh et al.*, 2007; *Gosset*, 2009; *Rodriguez et al.*, 2009;; *Wang et al.*, 2013; *Jones et al.*, 2015), а также с позиции физиологической роли экспортёров аминокислот в клетке (*Korshunov et al.*, 2020). Помимо применения YddG в продуцентах ароматических аминокислот, он был использован в относительно новом

направлении биотехнологии, а именно, для получения искусственных микробных сообществ (Mee *et al.*, 2014). На примере YddG было показано, что, регулируя синтез гена экспортёра и производства аминокислоты можно достичь программируемого роста и, в конечном счёте, соотношения двух штаммов-ауксотрофов *E. coli* по тирозину и триптофану (Kerner *et al.*, 2012).

С-концевой программируемый протеолиз был впервые использован в работе для снижения базального уровня метаболического фермента в продуценте. Дальнейшая разработка программируемого протеолиза прогнозируется, как минимум, по двум направлениям. Это применение к нему динамического контроля и адаптация этого метода для других бактерий (Torella *et al.*, 2013; Hentschel *et al.*, 2013).

## ВЫВОДЫ

1. Впервые получены сахарозоположительные продуценты *E. coli*, содержащие в хромосоме гены *scr* с установленной первичной структурой, которые кодируют зависимую от PTS утилизацию сахарозы.

2. С помощью методов рекомбинационной инженерии осуществлено конструирование модельных штаммов-продуцентов некоторых аминокислот (Гис, Фен, Три, Тир) с характеристиками, заранее предсказанными на основании дизайна их генетически-детерминированной структуры.

3. Показано, что ген *yddG* *E. coli*, кодирующий белок внутренней мембраны, в условиях искусственной его сверхэкспрессии способен увеличивать выход ароматических аминокислот из клеток их продуцирующих.

4. На основе использования С-концевого программируемого протеолиза для снижения уровня активности белка TugA *in vivo* разработана стратегия конструирования прототрофного по тирозину штамма *E. coli* - продуцента фенилаланина, не накапливающего тирозин в качестве нежелательной примеси.

5. На основании сравнительного анализа бифункциональной хоризмат-синтазы дрожжей, способной восстанавливать флавиномононуклеотид, и монофункционального фермента кишечной палочки сделан вывод о достаточности восстановленного флавиномононуклеотида в продуцентах фенилаланина *E. coli*.

6. Продемонстрирована эффективность использования промоторов Pho-регулона ( $P_{phoA}$  и  $P_{pstS}$ ) для метаболически регулируемой транскрипции гена ДАНР-синтазы, *aroG4*, которая в условиях лимитации по растворимому неорганическому фосфату в среде перенаправляет поток углерода из центрального метаболизма на синтез фенилаланина.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

АА – ароматические аминокислоты

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ЕМ – единица Миллера

ИМБ – интегральные мембранные белки

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция, сопряженная с обратной транскрипцией

ПААГ – полиакриламидный гель

ПС – последовательность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТМ – трансмембранный

ADP – аденозиндифосфат

Ar, Ar<sup>r</sup> – ампициллин, маркер устойчивости к ампициллину

ATP – аденозинтрифосфат

CHAPS – 3 - ((3-холамидопропил) диметиламмоний) -1-пропансульфонат

CHS – хоризмат-синтаза

Sm, Sm<sup>r</sup> – хлорамфеникол, маркер устойчивости к хлорамфениколу

ДАНР – 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат

DTT – Дитиотреитол

E4P – эритрозо-4-фосфат

EMR – Эмдена-Мейергофа-Парнаса (путь)

F6P – фруктозо-6-фосфат

Fum – фумаровая кислота

G3P – глицеральдегид-3-фосфат

G6P – глюкозо-6-фосфат

G6PDH – Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа

HEPES – 2- (4- (2-гидроксиэтил) пиперазин-1-ил) этансульфоновая кислота

IEF – изоэлектрическое фокусирование

METAFoR – анализ коэффициентов метаболических потоков (Metabolic Flux Ratio Analysis)

MS – масс-спектрометрия

MV – метилвиологен

NADP/NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат/его восстановленная форма

OA - оксалоацетат

PDH – префенатдегидрогеназа

PDT – префенатдегидратаза

PEP – фосфоенолпируват

6PGL – 6-фосфоглюконолактоназа

Pi – неорганический фосфор

pNPP – *p*-нитрофенилфосфат

PPP – пентозофосфатный путь

(p)ppGpp – гуанозин-5', 3'-тетрафосфат / гуанозин-5', 3'-пентафосфат

PTS – фосфотрансферазная система

R5P – рибозо-5-фосфат

SDS – додецилсульфат натрия

Tc, Tc<sup>r</sup> – тетрациклин, маркер устойчивости к тетрациклину

TCA – цикл трикарбоновых кислот

TIR – область инициации трансляции

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Айрих Л.Г., Дорошенко В.Г., Цыренжапова И.С., Имаизуми А. Способ получения L-аминокислоты // Патент РФ № 2405040 (27.11.2010). – 73 с.
2. Айрих Л.Г., Дорошенко В.Г., Цыренжапова И.С. Мутантный белок, кодируемый геном *yddG*, и способ получения ароматических L-аминокислот с использованием бактерии рода *Escherichia* // Патент РФ № 2530171 (10.10.2014). – 23с.
3. Аствацатурянц Г. В., Лисенков А.Ф., Смирнов Ю.В., Шакулов Р.С. Получение мутантов с нарушенным ретроингибированием биосинтеза гистидина // Генетика. – 1988. – Т. 24. – №. 10. – С. 1928-1934.
4. Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., Каплан А.М., Лобанов А.О., Вавилова Е.Ю., Козлов Ю.И. Разработка mini-Mu системы, обеспечивающей эффективную интеграцию генетического материала в хромосому бактерии *Escherichia coli* и его амплификацию // Биотехнология. – 2007. – №. 3. – С. 3-20.
5. Бирюкова И.В., Крылов А.А., Киселёва Е.М., Минаева Н.И., Машко С.В. Конструирование на основе *Escherichia coli* K-12 MG1655 нового штамма с улучшенными ростовыми характеристиками для экспериментов по метаболической инженерии // Генетика. – 2010. Т. 46. – №. 3. – С. 349-355.
6. Ворошилова Э.Б., Гусятинер М.М., Дорошенко В.Г., Скороходова А.Ю., Филиппов Д.В. Способ получения l-треонина с использованием бактерии, принадлежащей к роду *escherichia*, в которой инактивирован кластер генов *sfmacdfh-fimz* или ген *fimz* // Патент РФ № 2333953 (20.09.2008). – 24 с.
7. Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Гоуфман Е.И., Серябрикова М.В., Момыналиев К.Т., Лохов П.Г., Хряпова Е.В.,

- Кудрявцева Л.В., Смирнова О.В., Торопыгин И.Ю., Максимов Б.И., Арчаков А.И. Сравнительная характеристика протеомных карт клинических изолятов *Helicobacter pylori* // Биохимия. – 2003. – Т. 68. – № 1. – С. 42-49.
8. Гурский Я.Г., Маримонт Н.Ю., Бибилашвили Р.Ш. Влияние внутриклеточных концентраций тРНК, соответствующих редким аргининовым кодонам AGG and AGA, на экспрессию генов в *Escherichia coli* // Молекулярная биология. – 1992. – Т. 26. – № 5. – С. 1080–1087.
9. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. Новый метод конструирования оперонов с трансляционно-сопряженными генами в бактериальной хромосоме // Молекулярная биология. – 2009. – Т. 43. – № 3. – С. 547-557.
10. Дорошенко В. Г., Данилевич В.Н., Каратаев Г.И., Лившиц В.А. Структурная и функциональная организация транспозона Tn2555, несущего гены утилизации сахарозы // Молекулярная биология – 1988. – Т. 22. – № 3. – С. 645-658.
11. Дорошенко В.Г., Лобанов А.О., Федорина Е.А. Направленное изменение *Escherichia coli* MG1655 с целью получения мутантов, продуцирующих гистидин / Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2013. – Т. 49. – № 2. – С. 149-154.
12. Дорошенко В.Г., Лившиц В.А., Айрих Л.Г., Шмагина И.С., Аврасова Е.А., Овсиенко М. В., Машко С.В. Метаболическая инженерия *Escherichia coli* для продукции фенилаланина и родственных соединений // Биотехнология. – 2014. – Т. 30. – № 4. – С. 8-27.
13. Закатаева, Н.П., Кутукова Е.А., Гронский С.В., Трошин П.В., Лившиц В.А., Алёшин В.В. Экспорт метаболитов белками семейств DMT и RhtB и

- их возможная роль в межклеточной коммуникации // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 4. – С. 1-12.
14. Зименков Д.В., Скороходова А.Ю., Каташкина Ж.И., Минаева Н.И., Саврасова Е.А., Бирюкова И.В., Дорошенко В.Г., Ахвердян В.З., Машко С.В. Области хромосомы *E.coli*, предпочтительные для встраивания генов при использовании системы интеграции на основе фага-транспозона Му // Биотехнология. – 2004. – Т. 6. – С. 3-18.
  15. Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Каташкина Ж.И., Киверо А.Д., Бирюкова И.В., Дорошенко В.Г., Машко С.В. 6 – Фосфоглюконолактоназа из *Escherichia coli*, фрагмент ДНК, бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, - продуцент L-аминокислоты, и способ получения L-аминокислоты // Патент РФ № 2288268 (27.11.2006). – 25 с.
  16. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. Направленное изменение уровня экспрессии генов в бактериальной хромосоме // Мол. Биол. – 2005. – Т.39. – № 5. – С. 823-831.
  17. Каташкина Ж.И., Лунц М.Г., Дорошенко В.Г., Фомина С.А., Скороходова А.Ю., Ивановская Л.В., Машко С.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий с оптимизированным уровнем генной экспрессии // Патент РФ № 2268305 (20.01.2006). – 5 с.
  18. Киверо А.Д., Бочаров Е.В., Дорошенко В.Г., Соболев А.Г., Дубинный М.А., Арсеньев А.С. Изучение потоков углерода при утилизации глюкозы *Escherichia coli* MG1655 с помощью 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) ЯМР-спектроскопии // Прикладная Биохимия и Микробиология. – 2008. – Т.44. – С. 168-175.

19. Лившиц В.А., Соколов А.К., Дебабов В.Г., Жданова Н.И., Козлов Ю.И., Хургес Е.М., Бачина Т.А., Козырева Л.Ф. Способ получения L-треонина // Авторское свидетельство СССР №904325. – 1980. (Опубл. 1990)
20. Лившиц В. А., Хайкинсон М.Я., Сорокин А.В., Мурзина Л.Н., Богуш В.Г. 1982. Tn2555: новый транспозон, несущий детерминанты усвоения сахарозы/ В сб. Метаболические плазмиды бактерий. Тезисы докладов Всесоюзной конференции. Таллин, 1982. С.131-133.
21. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Машко С.В., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Беларёва А.В. Способ получения L-аминокислот, штамм *Escherichia coli* – продуцент аминокислоты // Патент РФ 2222596 (27.01.2004). – 8 с.
22. Лившиц В.А., Витушкина М.В., Гусятинер М.М., Зиятдинов М.Х., Ахвердян В.З., Саврасова Е.А., Дорошенко В.Г., Машко С.В. Способ получения L-аминокислот с использованием бактерий, принадлежащих к роду *Escherichia* // Патент РФ 2229513 (27.05.2004). – 3 с.
23. Лившиц, В. А. Транспорт аминокислот из клеток *Escherichia coli*: генетический контроль, регуляция и применение при конструировании штаммов-продуцентов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 / Лившиц Виталий Аркадьевич. – М., 2006. – 67 с.
24. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984, 480 с., под ред. Баева А.А., Скрыбина К.Г.
25. Машко С.В., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Мичурина Т.А., Гавриков А.В., Беневоленский М.С., Киверо А.Д., Каташкина Ж.И., **Дорошенко В.Г.**, Бирюкова И.В., Дебабов В.Г. Использование метаболической регуляции для оптимизации генов в бактериальных клетках – новое направление биотехнологии XXI века Биотехнология. 2002 №4 С. 3-14.

26. Новикова А.Е., Стойнова Н.В., Сычёва Е.В., Колоколова А.В. Идентификация и анализ норвалина и норлейцина в ферментационных бульонах штаммов *E. coli* // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2006. – Т. 6. – № 5. – С. 796-806.
27. Саврасова, Е.А., Ахвердян В.З., Лобанов А.О., Каплан А.М., Козлов Ю.И. Создание mini-Mu системы, лишенной селективных маркеров, для интеграции генов в хромосому бактерии *Escherichia coli* // Биотехнология. – 2007. – № 4. – С. 3-17.
28. Слесарева А.Е., Кун Л.Г., Дорошенко В.Г. Сравнение моно- и бифункциональной хоризматсинтаз в клетках *Escherichia coli*, не продуцирующих и продуцирующих фенилаланин // Биотехнология. – 2017. – Т. 33. – № 2. – С. 48-55.
29. Цыренжапова И.С., Дорошенко В.Г., Айрих Л.Г., Миронов А.С., Машко С.В. Ген *yddG Escherichia coli*, кодирующий потенциальный экспортер ароматических аминокислот: конститутивная транскрипция и зависимость уровня экспрессии от скорости роста клеток // Генетика. — 2009. – Т. 45. – №5. – С.601-609.
30. Цыренжапова И.С. Молекулярно-генетическая характеристика экспортёра YddG *Escherichia coli*: автореф. дис. ... к-та биол. наук: 03.01.03/ Цыренжапова Ирина Сергеевна. – М., 2010. – 26 С.
31. Юзбашев, Т.В., Выборная Т.В., Ларина А.С., Гвилава И.Т., Воюшина Н.Е., Мокрова С.К., Юзбашева Е.Ю., Манухов И.В., Синеокий С.П., Дебабов В.Г. Направленная модификация метаболизма *Escherichia coli* для создания штаммов – продуцентов треонина // Биотехнология. – 2013. – Т. 29. – № 2. – С. 8-33.
32. Aguena M., Yagil E., Spira B. Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli* // Molecular Genetics and Genomics. – 2002. – V. 268. – P. 518-524.



33. Aguena M., Ferreira G.M., Spira B. Stability of the *pstS* transcript of *Escherichia coli* // Archives of Microbiology. – 2009. – V. 191. – №. 2. – P. 105-112.
34. Alaeddinoglu, N. G., Charles H. P. Transfer of a gene for sucrose utilization into *Escherichia coli* K12, and consequent failure of expression of genes for D-serine utilization // The Journal of General Microbiology. – 1979. – V.110. – №. 1. – P. 47-59.
35. Airich L.G., Tsyrenzhapova I.S., Vorontsova O.V., Feofanov A.V., Doroshenko V.G., Mashko S.V. Membrane topology analysis of the *Escherichia coli* aromatic amino acid efflux protein YddG // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V.18. – P.189-197.
36. Albi T., Serrano A. Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 32 – №. 2. – doi: 10.1007/s11274-015-1983-2.
37. Aleshin V.V., Zakataeva N.P., Livshits V.A., A new family of amino acid efflux proteins // Trends in Biochemical Sciences. – 1999. – V. 24. – №. 4. – P. 133-135.
38. Alper H., Fischer C., Nevoigt E., Stephanopoulos G. Tuning genetic control through promoter engineering // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – V. 102. – №. 36. – P. 12678-12683.
39. Andersen J.B., Sternberg C., Poulsen L.K., Bjorn S.P., Givskov M., Molin S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – V. 64. – №. 6. – P. 2240-2246.
40. Archer C., Kim J., Jeong H., Park J.H., Vickers C.E., Lee S.Y., Nielsen L.K. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli* // BMC Genomics. – 2011. – V. 12. – №. 9. – doi:10.1186/1471-2164-12-9.

41. Arifin Y., Archer C., Lim S.A., Quek L.E., Sugiarto H., Marcellin E., Vickers C.E., Krömer J.O., Nielsen L.K. *Escherichia coli* W shows fast, highly oxidative sucrose metabolism and low acetate formation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 98. – №. 21. – P. 9033-9044.
42. Aubin-Tam M. E., Olivares A. O., Sauer R. T., Baker T. A., Lang M. J. Single-molecule protein unfolding and translocation by an ATP-fueled proteolytic machine // *Cell*. – 2011. – V. 145. – №. 2. – P. 257-267.
43. Backman K. , O'Connor M.J., Maruya A., Rudd E., McKay D., Balakrishnan R., Radjai M., DiPasquantonio V., Shoda D., Hatch R., Venkatasubramanian K. Genetic engineering of metabolic pathways applied to the production of phenylalanine // *Annals of the New York Academy of Sciences*. –1990. – V. 589. – P. 16-24.
44. Backman K., Ptashne M. Maximizing gene expression on a plasmid using recombination in vitro // *Cell*. – 1978. – V. 13. – №. 1. – P. 65-71.
45. Bailey J. E. Towards a science of metabolic engineering // *Science*. – 1991. – V. 252. – №. 5013. – P. 1668-1673.
46. Balasubramanian S., Abell C., Coggins J.R. Observation of an isotope effect in the chorismate synthase reaction // *Journal of the American Chemical Society*. – 1990. – V. 112. – №. 1. – P. 8581–8583.
47. Barker J.L., Frost J.W. Microbial synthesis of *p*-hydroxybenzoic acid from glucose // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2001. – V. 76. – №. 4. – P. 376-390.
48. Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli* // *Annual Review of Microbiology*. – 2011. – V. 65. – P.189-213.
49. Becker M., Börngen K., Nomura T., Battle A.R., Marin K., Martinac B., Krämer R. Glutamate efflux mediated by *Corynebacterium glutamicum* MscCG, *Escherichia coli* MscS, and their derivatives // *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*. – 2013. – V. 1828. – №. 4. – P. 1230-1240.

50. Beketskaia M. S., Bay D. C., Turner R. J. Outer membrane protein OmpW participates with small multidrug resistance protein member EmrE in quaternary cationic compound efflux // *Journal of Bacteriology*. – 2014. – V. 196. – №. 10. – P. 1908-1914.
51. Bellmann A., Vrljic, M., Patek, M., Sahm, H., Kramer, R., Eggeling, L. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum* // *Microbiology*. – 2001. – V. 147. – №. 7. – P. 1765-1774.
52. Benov L., Fridovich I. Why superoxide imposes an aromatic amino acid auxotrophy on *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – P. 4202-4206.
53. Bergey D.H., Holt J.G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. – 9th ed. – Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa. – 1994. – 787p.
54. Berthiaume F., Crost, C., Labrie, V., Martin, C., Newman, E. B., Harel, J. Influence of L-leucine and L-alanine on Lrp regulation of *foo*, coding for F1651, a Pap homologue // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – V. 186. – №. 24. – P. 8537-8541.
55. Bhat B., Ganai N.A., Andrabi S.M., Shah R.A., Singh A. TM-Aligner: Multiple sequence alignment tool for transmembrane proteins with reduced time and improved accuracy // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – №. 12543. – doi: 10.1038/s41598-017-13083-y.
56. Birnboim H., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucleic Acids Research*. – 1979. – V. 7 – №. 6. – P. 1513-1523.
57. Bockmann J., H. Heuel, Lengeler J. W. Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132 // *Molecular and General Genetics*. – 1992. – V. 235. – P. 22-32.
58. Bohm B.A. Shikimic acid (3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexene-1-carboxylic acid) // *Chemical Reviews*. – 1965. V. 65. – P. 435-466.

59. Bongaerts J., Krämer M., Müller U., Raeven L., Wubbolts M. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds // *Metabolic Engineering*. – 2001. – V. 3. – №. 4. – P. 289-300.
60. Bradbury S.L, Jakoby W.B. Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1972. – V. 69. – №. 9. – P. 2373-2376.
61. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – №. 1-2. – P. 248-254.
62. Bröer S., Krämer R. Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 1. Identification of a specific secretion carrier system // *European Journal of Biochemistry*. – 1991a. – V. 202. – №. 1. – P. 131-135.
63. Bröer S., Krämer R. Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 2. Energetics and mechanism of the transport system // *European Journal of Biochemistry*. – 1991b. – V. 202. – №. 1. – P. 137-143.
64. Bruschi M., Boyes S.J., Sugiarto H., Nielsen L.K., Vickers C.E. A transferable sucrose utilization approach for non-sucrose-utilizing *Escherichia coli* strains // *Biotechnology Advances*. – 2012. – V. 30. – №. 5. – P. 1001-1010.
65. Blanco A.G, Canals A., Coll M. PhoB transcriptional activator binds hierarchically to pho box promoters // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – V. 393. – №. 10. – P. 1165-1171.
66. Blobel G. Intracellular protein topogenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1980. – V. 77. – №. 3. – P. 1496-1500.
67. Carter P., Kelley R.F., Rodrigues M.L., Snedecor B., Cavarrubias M., Velligan M.D., Wong W.L.T., Rowland A.M., Kotts C.E., Carver M.E., Yang M., Bourell J.H. High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment // *Biotechnology (NY)*. – 1992. – V. 10. – P. 163-167.
68. Caspi R., Billington R., Fulcher C.A., Keseler I.M., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Midford P.E., Ong Q., Ong W.K., Paley

- S., Subhraveti P., Karp P.D. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – V. 46. – №. 1. – P. 633-639.
69. Capra E.J., Laub M.T. Evolution of two-component signal transduction systems // *Annual Review of Microbiology*. – 2012. – V. 66. – P. 325-347.
70. Chen R., Hatzimanikatis V., Yap W.M.G.J., Postma P.W., Bailey J. E. Metabolic consequences of phosphotransferase (PTS) mutation in a phenylalanine-producing recombinant *Escherichia coli* // *Biotechnology Progress*. – 1997. – V. 13. – №. 6. – P. 768–775.
71. Cho B.K., Federowicz S.A., Embree M., Park Y.S., Kim D., Palsson B.Ø. The PurR regulon in *Escherichia coli* K-12 MG1655 // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – V. 39. – №. 15. – P. 6456–6464
72. Cho M.H., Corea O.R.A., Yang H., Bedgar D.L., Laskar D.D., Anterola A.M., Moog-Anterola F.A., Hood R.L., Kohalmi S.E., Bernards M.A., Kang C.H., Davin L.B., Lewis N.G. Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*—identification and characterization of arogenate dehydratases // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – V. 282. – №. 42. – P. 30827–30835.
73. Choi, Y.J., Tribe D.E. Continuous production of phenylalanine using an *Escherichia coli* regulatory mutant // *Biotechnology Letters*. – 1982. – V. 4. – №. 4. – P. 223-228.
74. Collard F., Collet J.F., Gerin I., Veiga-da-Cunha M., Van S.E. Identification of the cDNA encoding human 6-phosphogluconolactonase, the enzyme catalyzing the second step of the pentose phosphate pathway // *FEBS Letters*. – 1999. – V. 459. – №. 2. – P. 223-226.
75. Cowan P.J., Nagesha H., Leonard L., Howard J.L., Pittard A.J. Characterization of the major promoter for the plasmid-encoded sucrose genes *scrY*, *scrA*, and *scrB* // *Journal of Bacteriology*. – 1991. – V. 173. – №. 23. – P. 7464-7470.
76. Cui, D., Deng, A., Bai, H., Yang, Z., Liang, Y., Liu, Z., Qiu, Q., Wang, L., Liu, S., Zhang, Y., Shi, Y., Qi, J., Wen, T. Molecular basis for feedback inhibition of tyrosine-regulated 3-deoxy-d-arabinoheptulosonate-7-phosphate

- synthase from *Escherichia coli* // Journal of Structural Biology. – 2019. – V. 206. – №. 3. – P. 322-334.
77. Daley D.O., Rapp M., Granseth E., Melén K., Drew D., von Heijne G. Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome // Science. – 2005. – V. 308. – №. 5726. – P. 1321-1323.
78. Daly M., Villa L., Pezzella C., Fanning S., Carattoli A. Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2005. – V. 55. – №. 4. – P. 558-561.
79. Daßler T., Maier T., Winterhalter C., Böck A. Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway // Molecular Microbiology. – 2000. – V. 36. – №. 5. – P. 1101-1112.
80. Datsenko K. A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – V. 97. – №. 12. – P. 6640-6645.
81. Davis J.H., Baker T.A., Sauer R.T. Engineering Synthetic Adaptors and Substrates for Controlled ClpXP Degradation // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – V. 284. – №. 33. – P. 21848-21855.
82. Daus M.L., Grote M., Muller P., Doebber M., Herrmann A., Steinhoff H.J., Dassa E., Schneider E. ATP-driven MalK dimer closure and reopening and conformational changes of the "EAA" motifs are crucial for function of the maltose ATP-binding cassette transporter (MalFGK2) // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – V. 282. – №. 31. – P. 22387-22396.
83. Debabov V.G., Kozlov J.I. Bacterial strain of *Escherichia coli* BKIIM B3996 as the producer of L-threonine // US Patent 5175107. – 1992.
84. Debabov, V. G. The threonine story // Microbial Production of l-Amino Acids. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Faurie R. et al. (eds) – Springer, Berlin, Heidelberg, 2003. – V. 79. – P. 113-136.

85. Dell K. A., Frost J. Identification and removal of impediments to biocatalytic synthesis of aromatics from D-glucose: rate-limiting enzymes of the common pathway of aromatic amino acid biosynthesis. // *Journal of the American Chemical Society*. – 1993. – V. 115. – № 24. – P. 11581-11589.
86. Díez-Villaseñor C., Almendros C., García-Martínez J., Mojica F.J.M. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli* // *Microbiology* (Reading, England). – 2010. – V. 156. – №. 5. – P. 1351-1361.
87. Doroshenko V.G., Livshits V.A. Structure and mode of transposition of Tn2555 carrying surose utilization // *FEMS Microbiology Letters*. – 2004. – V. 233. – P.353-359.
88. Doroshenko V., Airich L., Vitushkina M., Kolokolova A., Livshits V., Mashko S. YddG from *Escherichia coli* promotes export of aromatic amino acids // *FEMS Microbiology Letters*. – 2007. – V. 275. – P. 312-318.
89. Doroshenko V.G., Shakulov R.S., Kazakova S.M., Kivero A.D., Yampolskaya T. A., Mashko S. V. Construction of an L-phenylalanine-producing tyrosine-prototrophic *Escherichia coli* strain using *tyrA* *ssrA*-like tagged alleles // *Biotechnology Letters*. – 2010a. – V.35. – P. 1117-1121.
90. Doroshenko V.G., Tsyrenzhapova I.S., Krylov A.A., Kiseleva E.M., Ermishev V.Y., Kazakova S.M., Biryukova I.V., Mashko S.V. Pho regulon promoter-mediated transcription of the key pathway gene *aroG* (Fbr) improves the performance of an L-phenylalanine-producing *Escherichia coli* strain // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010b. – V.88. – P.1287-1295.
91. Dougan D. A., Mogk A., Zeth K., Turgay K., Bukau B. AAA proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime // *FEBS Letters*. – 2002a. – V. 529. – №. 1. – P. 6-10.
92. Dougan D.A., Reid B.G., Horwich A.L., Bukau B. ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine // *Molecules and Cells*. – 2002b. – V. 9. – 673–683.

93. Douschle U., Kammerer W., Gentz R., Bujard H. Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures // The EMBO Journal. – 1986. – V. 5. – №. 1. – P. 2987-2994.
94. Duncan K., Edwards R. M., Coggins, J. R. The pentafunctional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains // Biochemical Journal. – 1987. – V. 246. – №. 2. – 375-386.
95. Ehammer H., Rauch G., Prem A., Kappes B., Macheroux P. Conservation of NADPH utilization by chorismate synthase and its implications for the evolution of the shikimate pathway // Molecular Microbiology. – 2007. – V. 65. – №. 5. – P.1249-1257.
96. Ellis T., Wang X., Collins J.J. Diversity-based, model-guided construction of synthetic gene networks with predicted functions // Nature Biotechnology. – 2009. – V. 27. – №. 5. – P. 465-471.
97. Ely F., Nunes J., Schroeder E., Frazzon J., Palma M., Santos D., Basso L. The *Mycobacterium tuberculosis* Rv2540c DNA sequence encodes a bifunctional chorismate synthase // BMC Biochemistry. – 2008. – V. 9. – №. 13. – doi:10.1186/1471-2091-9-13
98. Erbse A., Schmidt R., Bornemann T., Schneider-Mergener J., Mogk A., Zahn R., Dougan D. A., Bukau B. ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli* // Nature. – 2006. – V. 439. – №. 7077. – P. 753-756.
99. Facey S.J., Kuhn A. Biogenesis of bacterial inner membrane proteins // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2010. – V. 67. – P. 2343-62.
100. Farmer W.R., Liao J.C. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control // Nature Biotechnology. – 2000. – V. 18. – №. 5. – P. 533-537.
101. Farrell C.M., Grossman A.D., Sauer R.T. Cytoplasmic degradation of ssrA-tagged proteins // Molecular Microbiology. – 2005. – V. 57. – №. 6. – P. 1750-1761.



102. Flynn J.M., Levchenko I., Seidel M., Wickner S.H., Sauer R.T., Baker T.A. Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – V. 98. – №. 19. – P. 10584-10589.
103. Flynn J.M., Neher S.B., Kim Y.I., Sauer R.T., Baker T.A. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals // *Molecular Cell*. – 2003. – V. 11. – №. 3. – P. 671-683.
104. Franke I., Resch A., Daßler T., Maier T., Bock A. YfiK from *Escherichia coli* promotes export of O-acetylserine and cysteine // *Journal of Bacteriology*. – 2003. – V. 185. – №. 4. – P. 1161-1166.
105. Frost J.W., Snell K.D., Frost K.M. Deblocking the common pathway of aromatic amino acid synthesis // *European Patent 0763127*. – 1995.
106. Galas D.J., Chandler, M. Bacterial insertion sequences. / *Mobile DNA*; Berg D.E., Howe M.M., Eds. – American Society for Microbiology, Washington, DC, 1989. – P. 109-162.
107. Gao R, Stock AM. Temporal hierarchy of gene expression mediated by transcription factor binding affinity and activation dynamics // *mBio*. – 2015. – <https://doi.org/10.1128/mBio.00686-15>.
108. Gao R., Godfrey K.A., Sufian M.A, Stock A. Counterbalancing regulation in response memory of a positively autoregulated two-component system // *Journal of Bacteriology*. – 2017. – V. 119. – №. 18. – DOI: 10.1128/JB.00390-17.
109. Gao R., Bouillet S., Stock A.M. Structural basis of response regulator function // *Annual Review of Microbiology*. – 2019. – V. 8. – №. 73. –P. 175-197.
110. Gardner S.G., Johns K.D., Tanner R., McCleary W.R. The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane // *Journal of Bacteriology*. – 2014. – V. 196. – №. 9. – P. 1741-1752.

111. Giladi H., Koby S., Prag G., Engelhorn M., Geiselmann J., Oppenheim A.B. Participation of IHF and a distant UP element in the stimulation of the phage  $\lambda$  PL promoter // *Molecular Microbiology*. – 1998. – V. 30. – №. 2. – P. 443-451.
112. Gollub E., Zalkin H., Sprinson D.B. Assay for 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase // *Methods in Enzymology*. – 1970. – V. 17A. – P. 349-350.
113. Gonza'lez-Bello C., Castedo L. Progress in type II dehydroquinase inhibitors: from concept to practice // *Medicinal Research Reviews*. – 2007. – V. 27. – №. 2. – P. 177-208.
114. Gosset G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system // *Microbial Cell Factories*. – 2005. – V. 4. – N 1. – DOI: 10.1186/1475-2859-4-14.
115. Gosset G. Production of aromatic compounds in bacteria // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2009. – V. 20. – №. 6. – P. 651-658.
116. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M. R. Protein quality control: triage by chaperones and proteases // *Genes & Development*. – 1997. – V. 11. – №. 7. – P. 815-823.
117. Gottesman S., Roche E., Zhou Y., Sauer R.T. The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system // *Genes & Development*. – 1998. – V. 12. – №. 9. – P. 1338-1347.
118. Gray M.J. Inorganic polyphosphate accumulation in *Escherichia coli* is regulated by DksA but not by (p)ppGpp // *Journal of Bacteriology*. – 2019. – V. 201. – №. 9. – DOI: 10.1128/JB.00664-18.
119. Grillo-Puertas M., Rintoul M.R., Rapisarda V.A. PhoB activation in non-limiting phosphate condition by the maintenance of high polyphosphate levels in the stationary phase inhibits biofilm formation in *Escherichia coli* // *Microbiology*. – 2016. – V. 162. – №. 6. – P. 1000-1008.
120. Grinter N.J. Developing an L-phenylalanine process // *CHEMICAL TECHNOLOGY* (ISSN: 0009-2703). – 1997. – V. 28. – №. 7. – P. 33-37.

121. Cruz-Ramos H., Cook G.M., Wu G., Cleeter M.W., Poole R.K. Membrane topology and mutational analysis of *Escherichia coli* CydDC, an ABC-type cysteine exporter required for cytochrome assembly // *Microbiology (Reading)*. – 2004. – V. 150. – №. 10. – P. 3415-3427.
122. Haldimann A., Prahalad M. K., Fisher S. L., Kim S. K., Walsh C. T., Wanner B. L. Altered recognition mutants of the response regulator PhoB: a new genetic strategy for studying protein–protein interactions // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93. – №. 25. – P. 14361-14366.
123. Haldimann A., Wanner B.L. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183. – №. 21. – P. 6384-6393.
124. Hara Y., Kadotani N., Izui H., Katashkina J.I., Kuvaeva T.M., Andreeva I.G., Golubeva L.I., Malko D.B., Makeev V.J., Mashko S.V., Kozlov Y.I. The complete genome sequence of *Pantoea ananatis* AJ13355, an organism with great biotechnological potential // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012. – V. 93. – №. 1. – P. 331–341.
125. Harris R.M., Webb D.C., Howitt S.M., Cox G.B. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183. – №. 17. – P.5008-5014.
126. Hartmann M., Schneider T. R., Pfeil A., Heinrich G., Lipscomb W. N., Braus G. H. Evolution of feedback-inhibited  $\beta/\alpha$  barrel isoenzymes by gene duplication and a single mutation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V. 100. – №. 3. – P. 862-867.
127. Hawkins A.R., Lamb H.K., Moore J.D., Charles I.G, Roberts C.F. The pre-chorismate (shikimate) and quinate pathways in filamentous fungi: theoretical and practical aspects // *Journal of general microbiology*. – 1993. – V. 139. – №. 12. – P. 1891-1899.

128. He B., Choi K.Y., Zalkin H. Regulation of *Escherichia coli* *glnB*, *prsA*, and *speA* by the purine repressor // *Journal of Bacteriology*. – 1993. – V. 175. – №. 11. – P. 3598-3606.
129. Helmstaedt K., Heinrich G., Merkl R., Braus G. H. Chorismate mutase of *Thermus thermophilus* is a monofunctional AroH class enzyme inhibited by tyrosine // *Archives of Microbiology*. – 2004. – V. 181. – P. 195-203.
130. Hentschel E., Will C., Mustafi N., Burkovski A., Rehm N., Frunzke, J. Destabilized eYFP variants // *Microbial Biotechnology*. – 2013. – V. 6. – P. 196-201.
131. Hermann T., Krämer R. Mechanism and regulation of isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – V. 62. – №. 9. – P. 3238-3244.
132. Herrero M., Delorenzo V., Timmis K.N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria // *Journal of Bacteriology*. – 1990. – V. 172. – №. 11. – P. 6557-6567.
133. Hochhut B, Jahreis K., Lengler J.W., Schmid K. CTnscr94, a conjugative transposon found in enterobacteria // *Journal of Bacteriology*. – 1997. – V. 179. – №. 7. – P. 2097-2102.
134. Holyoake L.V., Hunt S., Sanguinetti G., Sanguinetti G., Cook G.M., Howard M.J., Rowe M.L., Poole R.K. Shepherd M. CydDC-mediated reductant export in *Escherichia coli* controls the transcriptional wiring of energy metabolism and combats nitrosative stress // *Biochemical Journal*. – 2016. – V. 473. – №. 6. – P. 693-701.
135. Hori H., Yoneyama H., Tobe R., Ando T., Isogai E., Katsumata R. Inducible L-alanine exporter encoded by the novel gene *ygaW* (*alaE*) in *Escherichia coli* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – V. 77. – №. 12. – P. 4027-4034.

136. Hsieh Y.J., Wanner B.L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system // *Current Opinion in Microbiology*. – 2010. – V. 13. – №. 2. – P.198-203.
137. Hudson G.S., Davidson B.E. Nucleotide sequence and transcription of the phenylalanine and tyrosine operons of *Escherichia coli* K12 // *Journal of Molecular Biology*. – 1984. – V. 180. – №. 4. – P. 1023-1051.
138. Ihara K., Sato K., Hori H., Makino Y., Sigenobu S., Ando T., Isogai E., Yoneyama H. Expression of the *alaE* gene is positively regulated by the global regulator Lrp in response to intracellular accumulation of L-alanine in *Escherichia coli* // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2017. – V. 123. – №. 4. – P. 444-450.
139. Ikeda M. Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – V. 69. – №. 6. – P. 615-626.
140. Imaizumi A., Koseki C., Matsui K., Kojima H. Improved production of enzymes, which are expressed under the Pho regulon promoter, in the *rmf* gene (encoding ribosome modulation factor) disruptant of *Escherichia coli* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2006. – V. 70. – №. 4. – P. 949-957.
141. Ishida N., Kawakita M. Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35) // *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. – 2004. – V. 447. – №. 5. – P. 768-775.
142. Jack D.L., Yang N.M., Saier M.H. Jr. The drug/metabolite transporter superfamily // *European Journal of Biochemistry*. – 2001. – V. 268. – №. 13. – P. 3620-3639.
143. Jahreis K., Lengeler J.W. Molecular analysis of two ScrR repressors and of ScrR-FruR hybrid repressor for sucrose and D-fructose specific regulons from enteric bacteria // *Molecular Microbiology*. – 1993. – V.9. – №. 1. – P. 195-209.

144. Jahreis K., Bentler L., Bockmann J., Hans S., Meyer A., Siepelmeier J., Lengeler J.W. Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild-type strain EC3132 // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – №. 19. – P.5307-5316.
145. Jensen R. A., Xie G., Calhoun D.H., Bonner C.A. The correct phylogenetic relationship of KdsA (3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase) with one of two independently evolved classes of AroA (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase) // *Journal of Molecular Evolution*. – 2002. – V. 54. – №. 3. – P. 416-423.
146. Jones C.M., Hernández Lozada N.J., Pflieger B.F. Efflux systems in bacteria and their metabolic engineering applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – V. 9. – №. 22. –P. 9381-9393.
147. Jones D.G., Reusser U., Braus G.H. Molecular cloning, characterization and analysis of the regulation of the ARO2 gene, encoding chorismate synthase, of *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular Microbiology*. – 1991. – V. 5. №. 9. – P. 2143-2152.
148. Juminaga D. , Baidoo E.E., Redding-Johanson A.M., Batth T.S., Burd H., Mukhopadhyay A., Petzold C.J., Keasling J.D. Modular engineering of L-tyrosine production in *Escherichia coli* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 78. – №. 1. – P. 89-98.
149. Katashkina J.I., Hara Y., Golubeva L.I., Andreeva I.G., Kuvaeva T.M., Mashko S.V. Use of the  $\lambda$ Red-recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis* // *BMC Molecular Biology*. – 2009. – V. 10. – №. 34. – doi:10.1186/1471-2199-10-34
150. Kawate T., Gouaux E. Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins // *Structure*. – 2006. – V. 14. – P. 673–681.
151. Keiler K.C., Waller P.R.H., Sauer R.T. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA // *Science*. – 1996. – V. 271. – №. 5251. – P. 990–993.

152. Kerner A., Park J., Williams A., Lin X.N. A programmable *Escherichia coli* consortium via tunable symbiosis // PLoS ONE. – 2012. – V. 7. – №. 3. – e34032. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034032>.
153. Keseler I.M., Mackie A., Santos-Zavaleta A., Billington R., Bonavides-Martinez C., Caspi R., Fulcher C., Gama-Castro S., Kothari A., Krummenacker M., Latendresse M., Muñiz-Rascado L., Ong Q., Paley S., Peralta-Gil M., Subhraveti P., Velazquez-Ramirez D.A., Weaver D., Collado-Vides J., Paulsen I., Karp P.D. The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K12 // Nucleic Acids Research. – 2017. – V. 45. – D. 543-550.
154. Kim S., Ihara K., Katsube S., Hori H., Ando T., Isogai E., Yoneyama H. Characterization of the L-alanine exporter AlaE of *Escherichia coli* and its potential role in protecting cells from a toxic-level accumulation of L-alanine and its derivatives // Microbiology Open. – 2015. – V. 4. – №. 4. – P. 632-643.
155. Kim S., Ihara K., Katsube S., Ando T., Isogai E., Yoneyama H. Impact of charged amino acid substitution in the transmembrane domain of L-alanine exporter, AlaE, of *Escherichia coli* on the L-alanine export // Archives of Microbiology. – 2017. – V. 199. – P. 105-114.
156. Kinoshita S., Udaka S., Shimono M. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms // The Journal of General and Applied Microbiology. – 1957. – V. 3. – №. 3. – P. 193-205.
157. Korshunov S., Imlay K.R.C., Imlay J.A. Cystine import is a valuable but risky process whose hazards *Escherichia coli* minimizes by inducing a cysteine exporter // Molecular Microbiology. – 2020. – V. 113. – №. 1. – P. 22-39.
158. Krämer R. Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism // FEMS Microbiology Review. – 1994. – V. 13. – №. 1. – P. 75-94.

159. Kleeb A.C., Kast P., Hilvert D. A monofunctional and thermostable prephenate dehydratase from the archaeon *Methanocaldococcus jannaschii* // *Biochemistry*. – 2006. – V. 45. – P. 14101-114110.
160. Kleijn R.J., van Winden W.A., van Gulik W.M., Heijnen J.J. Revisiting the <sup>13</sup>C-label distribution of the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway based upon kinetic and genetic evidence // *FEBS Journal*. – 2005. – V. 272. – P. 4970–4982.
161. Komine Y., Kitabatake M, Yokogawa T., Nishikawa K., Inokuchi H. A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1994. – V. 91. –P. 9223–9227.
162. Kornberg A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable // *Journal of Bacteriology*. – 1995. – V. 177. – № 3. – P. 491–496.
163. Krasikov V.D., Malakhova I.I., Degterev E.V., Tyaglov B.V. Planar chromatography of free industrial amino acids // *Journal of planar chromatography*. – 2004. – V. 17. – № 1. – P. 113-122.
164. Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E. L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov Model: application to complete genomes // *Journal of Molecular Biology*. – 2001 – V. 305. – № 3. – P. 567–580.
165. Kuroda A., Murphy H., Cashel M., Kornberg A. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – V. 272. – № 34. – P. 21240-21243.
166. Kuroda A., Nomura K., Ohtomo R., Kato J., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., Kornberg A. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli* // *Science*. – 2001. – V. 293. – P. 705-708.



167. Kutukova E.A., Livshits V.A., Altman I.P., Ptitsyn L.R., Ziyatdinov M.H., Tokmakova, I.L., Zakataeva N.P. The *yeaS* (*leuE*) gene of *Escherichia coli* encodes an exporter of leucine, and the Lrp protein regulates its expression // FEBS Letters. – 2005a. – V. 579. – №. 21. – P. 4629-4634.
168. Kutukova E.A., Zakataeva N.P., Livshits V.A.: Expression of the genes encoding RhtB family proteins depends on global regulator Lrp // Molecular Biology. – 2005b. – V. 39. – P. 374-378.
169. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein // Journal of Molecular Biology. – 1982. – V. 157. – №. 1. – P. 105-132.
170. Lambert J.M., Boocock M.R., Coggins J.R. The 3-dehydroquinate synthase activity of the pentafunctional arom enzyme complex of *Neurospora crassa* is Zn<sup>2+</sup>-dependent // Biochemical Journal. – 1985. – V. 226. – №. 3. – P. 817-829.
171. Lawan N., Chasing P., Santatiwongchai J., Muangpil S. QM/MM molecular modelling on mutation effect of chorismate synthase enzyme catalysis // Journal of Molecular Graphics and Modelling. – 2019. – V. 87. – P. 250-256.
172. Lee A.Y., Stewart J.D., Clardy J., Ganem, B. New insight into the catalytic mechanism of chorismate mutases from structural studies // Chemistry & Biology. – 1995. – V. 2. – № 4. – P. 195-203.
173. Lee S.Y, Kim H.U. Systems strategies for developing industrial microbial strains // Natural Biotechnology. – 2015. – V. 33. – P. 1061-1072.
174. Lee J.W, Choi S., Park J.H., Vickers C.E., Nielsen L.K., Lee S-Y. Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning  $\beta$ -fructofuranosidases and its application for L-threonine production // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V. 88. – № 4. – P. 1-9.
175. Levchenko I., Seidel M., Sauer R.T., Baker T.A. A specificity-enhancing factor for the ClpXP degradation machine // Science. – 2000. – V. 289. – №. 5488 – P. 2354-2356.

176. Li P.P., Liu Y.J, Liu S.J. Genetic and biochemical identification of the chorismate mutase from *Corynebacterium glutamicum* // Microbiology (reading). – 2009. – V. 155. – №. Pt 10. – P. 3382-3391.
177. Livshits V.A., Doroshenko V.G., Mashko S.V., Akhverdian V.Z., Kozlov Yu.I. Amino acid producing strains belonging to the genus *Escherichia* and method for producing amino acid // European Patent EP 1149911 (03.04.2002). – 6 p.
178. Livshits V.A., Zakataeva N.P., Aleshin V.V., Vitushkina M. V. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli* // Research in Microbiology. – 2003 – V. 154. – № 2. – P. 123-135.
179. Lütke-Eversloh T, Santos C.N.S., Stephanopoulos G. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 77. – №. 4. – P. 751-762.
180. Maeda H., Dudareva N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants // Annual Review of Plant Biology. – 2012. – V. 63. – P. 73-105.
181. Malykh E.A., Butov I.A., Ravcheeva A.B., Krylov A.A., Mashko S.V., Stoynova N.V. Specific features of L-histidine production by *Escherichia coli* concerned with feedback control of AICAR formation and inorganic phosphate/metal transport // Microbial Cell Factories. – 2018. – V. 17. – №. 42. – <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0890-2>.
182. Marzan L.W., Hasan C.M., Shimizu K. Effect of acidic condition on the metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* mutant // Archives of Microbiology. – 2013. – V. 195. – №. 3. – P. 161-171.
183. McCleary W. R. Molecular mechanisms of phosphate homeostasis in *Escherichia coli* // *Escherichia coli* - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications, chap. 17; Samie, A. (ed.) / IntechOpen., Rijeka. – 2017. – <https://doi.org/10.5772/67283>.

184. McGinness K.E, Baker T.A, Sauer R.T. Engineering controllable protein degradation // *Molecular cell*. – 2006. – V. 22. – №. 5. – P. 701–707.
185. Mee M.T., Collins J.J., Church G.M., Wang H.H. Syntrophic synthetic microbial communities // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – №. 20. – E2149-E2156. – DOI: 10.1073/pnas.1405641111.
186. Méric G., Kemsley E.K., Falush D., Siggers E.J., Lucchini S. Phylogenetic distribution of traits associated with plant colonization in *Escherichia coli* // *Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 15. – №. 2. – P. 487-501.
187. Miller J.H. *Experiments in molecular genetics*. – NY, Cold Spring Harbor, 1972. – 466p.
188. Minaeva N.I., Gak E.R., Zimenkov D.V., Skorokhodova A.Yu., Biryukova I.V., Mashko S.V. Dual in/out strategy for genes integration into bacterial chromosome: a novel approach to step-by-step construction of plasmid-less marker-less recombinant *E. coli* strains with predesigned genome structure // *BMC Biotechnology*. – 2008. – №. 8. – V. 63. – DOI: 10.1186/1472-6750-8-63.
189. Miriagou V., Carattoli A., Tzelepi E., Villa L., Tzouveleki L. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – V. 49. – №. 8. – P. 3541-3543.
190. Mohamed E.T., Mundhada H., Landberg J., Cann I., Mackie R. I., Nielsen A.T., Herrgård M.J., Feist A.M. Generation of an *E. coli* platform strain for improved sucrose utilization using adaptive laboratory evolution // *Microbiol Cell Factories*. – 2019. – V. 18. – №. 116. – <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1165-2>.
191. Mollet B., Iida S., Shepherd J., Arber W. Nucleotide sequence of IS26, a new prokaryotic mobile genetic element // *Nucleic Acids Research*. – 1983. – V. 11. – №. 18. – P. 6319-6330.
192. Morimyo M., Hongo E., Hama-Inaba H., Machida I. Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers

- resistance against methyl viologen toxicity // *Nucleic Acids Research*. – 1992. – V. 20. – №. 12. – P. 3159-3165.
193. Motomura K., Hirota R., Ohnaka N., Okada M., Ikeda T., Morohoshi T., Ohtake H., Kuroda A. Overproduction of YjbB reduces the level of polyphosphate in *Escherichia coli*: a hypothetical role of YjbB in phosphate export and polyphosphate accumulation // *FEMS Microbiology Letters*. – 2011. – V. 320. – №. 1. – P. 25-32.
194. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction // *Methods in enzymology*. – 1987. – V. 155. – P. 335-350.
195. Nakamura J., Hirano S., Ito H., Wachi M. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCg11221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – V. 73. – P. 4491 – 4498.
196. Nandineni M.R., Gowrishankar J. Evidence for an arginine exporter encoded by *yggA* (*argO*) that is regulated by the LysR-type transcriptional regulator ArgP in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – V. 186. – №. 11. – P. 3539–3546.
197. Naville M., Gautheret D. Transcription attenuation in bacteria: theme and variations // *Briefings in functional genomics and proteomics*. – 2009. – V. 8. – №. 6 – P. 482-492.
198. Nelms J, Edwards R.M., Warwick J., Fotheringham I. Novel mutations in the *pheA* gene of *Escherichia coli* K-12 which result in highly feedback inhibition-resistant variants of chorismate mutase/prephenate dehydratase // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1992. – V. 58. – №. 8. – P. 2592-2598.
199. Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction // *Genetics*. – 1988. V. – 120. – №. 3. – P. 621-623.
200. Oh B.K., Apirion D. 10Sa RNA, a small stable RNA of *Escherichia coli*, is functional // *Molecular and General Genetics*. – 1991. – V. 221. – P. 52-56.

201. Ohtsu I., Wiriyathanawudhiwong N., Morigasaki S., Nakatani T., Kadokura H., Takagi H. The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in *Escherichia coli* // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – №. 23. – P. 17479–17487.
202. Oka T., Sakamoto S., Miyoshi K., Fuwa T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G., Miyake T. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli* // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – V. 82. – №. 21. – P. 7212-7216.
203. Olins P.O., Rangwala S.H. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli* // Journal of Biological Chemistry. – 1989. – V. 264. – №. 29. – P. 16973-16976.
204. Olivares A.O., Baker T.A., Sauer R.T. Mechanistic insights into bacterial AAA+ proteases and protein-remodelling machines // Nature Reviews Microbiology. – 2016. – V. 14. – №. 1. – P. 33-44.
205. Olson M.M., Templeton L.J., Suh W., Youderian P., Sariaslani F.S., Gatenby A.A., Van Dyk T.K. Production of L-tyrosine from sucrose or glucose achieved by rapid genetic changes to phenylalanine-producing *Escherichia coli* strains // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 74. – №. 5. – P. 1031-1040.
206. Ould-Moulaye C.B., Dussap C.G., Gros J.B. Estimation of Gibbs energy changes of central metabolism reactions // Biotechnology Techniques. – 1999. – V. 13. – P. 187 – 193.
207. Palmieri L., Berns D., Krämer R., Eikmanns M. Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production // Archives of Microbiology. – 1996. – V. 165. – P. 48-54.
208. Pansegrau W., Lanka E., Barth P.T., Figurski D.H., Guiney D.G., Haas D., Helinski D.R., Schwab H., Stanisich V.A., Thomas C.M. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP $\alpha$  plasmids. Compilation and comparative

- analysis // *Journal of Molecular Biology*. – 1994. – V. 239. – №. 5. – P. 623-663.
209. Park J.H., Lee K.H., Kim T.Y., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and *in silico* gene knockout simulation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – V. 104. – №. 19. – P. 7797-7802.
210. Park J.H., Lee S.Y. Metabolic pathways and fermentative production of L-aspartate family amino acids // *Biotechnology Journal*. – 2010. – V. 5. – №. 6. – P. 560-577.
211. Park N.H., Rogers P.L. L-Phenylalanine production in continuous culture using a hyperproducing mutant of *Escherichia coli* K-12 // *Chemical Engineering Communications*. – 1986. – V.45. – №. 1-6. – P. 185-196.
212. Park S., Wolanin P.M., Yuzbashyan E.A., Lin H., Darnton N.C., Stock J.B., Silberzan P., Austin R. Influence of topology on bacterial social interaction // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V. 100. – №. 24. – P. 13910-13915.
213. Pathania A., Sardesai A.A. Distinct paths for basic amino acid export in *Escherichia coli*: YbjE (LysO) mediates export of L-lysine // *Journal of Bacteriology*. – 2015. – V. 197. – №. 12. – P. 2036-2047.
214. Pathania A., Gupta A. K., Dubey S., Gopal B., Sardesai A.A. The topology of the L-arginine exporter ArgO conforms to an N<sub>in</sub>-C<sub>out</sub> configuration in *Escherichia coli*: requirement for the cytoplasmic N-terminal domain, functional helical interactions, and an aspartate pair for ArgO function // *Journal of Bacteriology*. – 2016. – V. 198. – №. 23. – P. 3186-3199.
215. Patnaik R., Liao J.C. Engineering of *Escherichia coli* central metabolism for aromatic metabolite production with near theoretical yield // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1994. – V. 60. – №. 11. – P. 3903-3908.
216. Peeters E., Nguyen Le Minh P., Foulquie-Moreno M., Charlier D. Competitive activation of the *Escherichia coli* *argO* gene coding for an arginine exporter by

- the transcriptional regulators Lrp and ArgP // *Molecular Microbiology*. – 2009. – V. 74. – №. 6. – P.1513-1526.
217. Pittard J., Yang J. Biosynthesis of aromatic amino acids // *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, 3rd edn.; Section editor: W. Hatfield. – 2008. – DOI: 10.1128/ecosal.3.6.1.8.
218. Pittman M.S., Corker H., Wu G., Binet M.B., Moir A.J., Poole R.K. Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277. – №. 51. – P. 49841-49849.
219. Pittman M.S., Robinson H.C., Poole R.K. A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280. – №. 37. – P. 32254-32261.
220. Qian Y., Lynch J.H., Guo L., Rhodes D., Morgan J.A., Dudareva N. Completion of the cytosolic post-chorismate phenylalanine biosynthetic pathway in plants // *Nature Communications*. – 2019. – V. 10. – №. 1. – DOI: 10.1038/s41467-018-07969-2.
221. Rabilloud T., Chevallet M. Solubilization of proteins in 2D electrophoresis // *Proteome Research: Two-Dimensional Gel electrophoresis and Identification Methods*; Rabilloud, T. (Ed.) – 2000. – Springer Verlag Berlin Heidelberg. – pp. 9-29.
222. Raina S., Missiakas D., Baird L., Kumar S., Georgopoulos C. Identification and transcriptional analysis of the *Escherichia coli* *htrE* operon which is homologous to *pap* and related pilin operons // *Journal of Bacteriology*. – 1993. – V. 175. – №. 16. – P. 5009-5021.
223. Reid S.J., Abratt V.R. Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – V. 67. – P. 312–321.
224. Renouf M.A., Wegener M.K., Nielsen L.K. An environmental life cycle assessment comparing Australian sugarcane with US corn and UK sugar beet

- as producers of sugars for fermentation // *Biomass and Bioenergy*. – 2008. – V. 32. – №. 12. – P. 1144-1155.
225. Richards T.A., Dacks J.B., Campbell S.A., Blanchard J.L., Foster P.G., McLeod R., Roberts C.W. Evolutionary origins of the eukaryotic shikimate pathway: gene fusions, horizontal gene transfer, and endosymbiotic replacements // *Eukaryotic Cell*. – 2006. – V. 5. – №. 9. – P. 1517-1531.
226. Rodriguez A., Martinez J.A., Flores N., Escalante A., Gosset G., Bolivar F. Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds // *Microbiol Cell Factories*. – 2014. – V. 13. – №. 126. – <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0126-z>.
227. Romero R.M, Roberts M.F., Phillipson J.D. Chorismate mutase in microorganisms and plants // *Phytochemistry*. – 1995. – V. 40. – №. 4. – P. 1015-1025.
228. Rosado L.A., Vasconcelos I. B., Palma M.S., Frappier V., Najmanovich R. J., Santos D.S., Basso L.A. The mode of action of recombinant Mycobacterium tuberculosis shikimate kinase: kinetics and thermodynamics analyses // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – №. 5. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061918>.
229. Sabrl S., Nielsen L.K., Vickers C.E. Molecular control of sucrose utilization in *Escherichia coli* W, an efficient sucrose-utilizing strain // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79. – №. 2. – P.478-487.
230. Saier M.H. Jr, Reddy V.S., Tsu B.V., Ahmed M.S., Li C., Moreno-Hagelsieb G. The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – V. 44. – №. D1. – P. 372–379.
231. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edn. // Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. – 2001.
232. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1977. – V. 74. – №. 12. – P. 5463-5467.
233. Santiviago C.A., Fuentes J.A., Bueno S.M., Trombert A.N., Hildago A.A., Socias L.T., Youderian P., Mora G.C. The *Salmonella enterica* sv.



- Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen // *Molecular Microbiology*. – 2002. – V. 46. – №. 3. – P. 687-698.
234. Sauer U., Lasko D.R., Fiaux J., Hochuli M., Glaser R., Szyperski T., Wüthrich K., Bailey J.E. Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – V. 181. – №. 21. – P. 6679-6688.
235. Sauer U., Eikmanns B.J. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria // *FEMS Microbiology Review*. – 2005. – V. 29. – №. 4. – P. 765-794.
236. Schmid K., Schupfner M., Schmitt R. Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Bacteriology*. – 1982. – V. 151. – №. 1. – P. 68-76.
237. Schmid K., Ebner R., Altenbuchner J., Schmitt R., Lengler J.W. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli* K12: mapping of the *scr* genes of pUR400 // *Molecular Microbiology*. – 1988. – V. 2. – №. 1. – P. 1-8.
238. Schoner R., Herrmann K.M. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. Purification, properties, and kinetics of the tyrosine-sensitive isoenzyme from *Escherichia coli* // *Journal of Biological chemistry*. – 1976. – V. 252. – №. 18. – P. 5440-5447.
239. Schönhuber W., Le Bourhis G., Tremblay J., Amann R., Kulakauskas S. Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification // *BMC Microbiology*. – 2001. – V. 1. – №. 20. – DOI:10.1186/1471-2180-1-20.
240. Sekar K., Gentile A.M., Bostick J.W., Tyo K.E.J. N-terminal-based targeted, inducible 559 protein degradation in *Escherichia coli* // *PLoS ONE*. – 2016. – V. 11. – №. 2. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149746>.
241. Seo S.W., Yang J.-S., Kim I., Yanga J., Min B.E., Kim S., Jung G.Y. Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency // *Metabolic Engineering*. – 2013. – V. 15. – P. 67-74.

242. Shetty R.P., Endy D., Knight T.F. Jr. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts // *Journal of Biological Engineering*. – 2008. – V. 2. – №. 5. – <https://doi.org/10.1186/1754-1611-2-5>.
243. Shin P.K., Seo J.H. Analysis of *E. coli* *phoA-lacZ* fusion gene expression inserted into a multicopy plasmid and host cell's chromosome // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1990. – V.36. – №. 11. – P. 1097-1104.
244. Shumilin I.A., Zhao C., Bauerle R., Kretsinger R.H. Allosteric inhibition of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase alters the coordination of both substrates // *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – V. 320. – №. 5. – P. 1147-1156.
245. Shumilin I.A., Bauerle R., Kretsinger R.H. The high-resolution structure of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase reveals a twist in the plane of bound phosphoenolpyruvate // *Biochemistry*. – 2003. – V. 42. – №. 13. – P. 3766-3776.
246. Smirnoff N., Engineering of metabolic pathways using synthetic enzyme complexes // *Plant Physiology*. – 2019. – V. 179. – №. 3. – P. 918-928.
247. Sola M., Gomis-Ruth F.X., Serrano L., Gonzalez A., Coll M. Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain // *Journal of Molecular Biology*. – 1999. – V. 285. – №. 2. – P. 675-687.
248. Song J., Bonner C.A., Wolinsky M., Jensen R.A. The TyrA family of aromatic-pathway dehydrogenases in phylogenetic context // *BMC Biology*. – 2005. – V. 3. – №. 13. – DOI.org/10.1186/1741-7007-3-13.
249. Spira B., Silberstein N., Yagil E. Guanosine 3', 5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi // *Journal of Bacteriology*. – 1995. – V. 177. – №. 14. – P. 4053-4058.
250. Spira B., Agüena M., de Castro Oliveira J.V., Yagil E. Alternative promoters in the *pst* operon of *Escherichia coli* // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2010. – V. 284. – P. 489-498.

251. Sprenger G.A. From scratch to value: engineering *Escherichia coli* wild type cells to the production of L-phenylalanine and other fine chemicals derived from chorismate // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – V. 75. – №. 4. – P. 739-749
252. Stansfeld P.J. Computational studies of membrane proteins: from sequence to structure to simulation // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2017. – V. 45. – P. 133–141.
253. Stephanopoulos G., Aristidou A., Nielsen J. *Metabolic Engineering*. 1st Edition Principles and Methodologies. // Academic Press, USA. – 1998. – 725p.
254. Su T.Z., Schweizer H., Oxender D.L. A novel phosphate regulated expression vector in *Escherichia coli* // *Gene*. – 1990. – V. 90. – №. 1. – P. 129–133.
255. Sugimoto, S., Yabuta, M., Kato, N., Tatsuji, S., Yoshida, T., and Taguchi, H. Hyperproduction of phenylalanine by *Escherichia coli*: Application of a temperature-controllable expression vector carrying the repressor-promoter system of bacteriophage lambda // *Journal of Biotechnology*. – 1987. – V. 5. – №. 4. – P. 237-253.
256. Szyperski T. Biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism // *European Journal of Biochemistry*. – 1995. – V. 232. – №. 2. – P. 433-448.
257. Takumi K., Nonaka G. Bacterial cysteine-inducible cysteine resistance system // *Journal of Bacteriology*. 2016. – V. 198. – №. 9. – P. 1384-1392.
258. Tan K., Li H., Zhang R., Gu M., Clancy S.T., Joachimiak A. Structures of open (R) and close (T) states of prephenate dehydratase (PDT) - implication of allosteric regulation by L-phenylalanine // *Journal of Structural Biology*. – 2008. – V. 162. – №. 1. – P. 94-107.

259. Taschner N.P., Yagil E., Spira B. The effect of IHF on sigma S selectivity of the *phoA* and *pst* promoters of *Escherichia coli* // Archives of Microbiology. – 2006. – V. 185. – №. 3. – P. 234-237.
260. Tohge T., Watanabe M., Hoefgen R., Fernie A.R. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage // Frontiers in Plant Science. – 2013. – V. 4. – №. 62. – DOI:10.3389/fpls.2013.00062.
261. Torella J.P., Ford T.J., Kim S.N., Chen A.M., Way J.C., Silver P.A. Tailored fatty acid synthesis via dynamic control of fatty acid elongation // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – V. 110. – №. 28. – P. 11290-11295.
262. Trevico-Quintanilla L.G., Escalante A., Caro A.D., Martínez A., González R., Puente J.L., Bolívar F., Gosset G. The phosphotransferase system-dependent sucrose utilization regulon in enteropathogenic *Escherichia coli* strains is located in a variable chromosomal region containing *iap* sequences // Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 13. – №. 1-3. – P. 117-125.
263. Tribe D.E., Camakaris H., Pittard J. Constitutive and repressible enzymes of the common pathway of aromatic biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: regulation of enzyme synthesis at different growth rates // Journal of Bacteriology. – 1976. – V. 127. – №. 3. – P. 1085–1097.
264. Trotschel C., Deutenberg D., Bathe B., Burkovski A., Kramer R. Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum* // Journal of Bacteriology. – 2005. – V. 187. – №. 11. – P. 3786-3794.
265. Tsu B.V., Saier M.H. Jr. The LysE superfamily of transport proteins involved in cell physiology and pathogenesis // PLoS One. – 2015. – V.10. – №. 10. – <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137184>.
266. Tsuchiya H., Doki S., Takemoto M., Ikuta T., Higuchi T., Fukui K., Usuda Y., Tabuchi E., Nagatoishi S., Tsumoto K., Nishizawa T., Ito K., Dohmae N., Ishitani R., Nureki O. Structural basis for amino acid export by DMT

- superfamily transporter YddG // *Nature*. – 2016. – V. 534. – №. 7607. – P. 417-420.
267. Tsunekawa H., Azuma S., Okabe M., Okamoto R., Aiba S. Acquisition of a sucrose utilization system in *Escherichia coli* K-12 derivatives and its application to industry // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1992. – V. 58. – №. 6. – P. 2081-2088.
268. Titgemeyer F., Jahreis K., Ebner R., Lengeler J.W. Molecular analysis of the *scrA* and *scrB* genes from *Klebsiella pneumonia* and plasmid pUR400, which encode the sucrose transport protein Enzyme II(Scr) of the phosphotransferase system and a sucrose-6-phosphate invertase // *Molecular and General Genetics*. – 1996. – V. 250. – №. 2. – P. 197-206.
269. Tu G.F., Reid G.E., Zhang J.G., Moritz R.L., Simpson R.J. C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – V. 270. – №. 16. – P. 9322-9326.
270. Turnbough C.L. Regulation of gene expression by reiterative transcription // *Current Opinion in Microbiology*. – 2011. – V. 14. – №. 2. – P. 142-147.
271. Tyo K.E., Kocharin K., Nielsen J. Toward design-based engineering of industrial microbes // *Current Opinion in Microbiology*. – 2010. – V. 13. – №. 3. – P. 255-262.
272. Typas A., Hengge R. Role of the spacer between the -35 and -10 regions in  $\sigma^S$  promoter selectivity in *Escherichia coli* // *Molecular Microbiology*. – 2006. – V. 59. – №. 3. – P. 1037-1051.
273. Uluşeker C., Torres-Bacete J., García J.L., Hanczyc M.M., Nogales J., Kahramanoğulları O. Quantifying dynamic mechanisms of auto-regulation in *Escherichia coli* with synthetic promoter in response to varying external phosphate levels // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9. – №. 2076. – <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38223-w>.

274. Valle J., Da Re S., Schmid S., Skurnik D., D'Ari R., Ghigo J.M. The amino acid valine is secreted in continuous-flow bacterial biofilms // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – V. 190. – №. 1. – P. 264–274.
275. van den Berg B. Going forward laterally: transmembrane passage of hydrophobic molecules through protein channel walls // *ChemBioChem*. – 2010. – V. 11. – №. 10. – P.1339-1343.
276. Van Dien S.J., Keyhani, S., Yang, C., Keasling, J.D. Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in *Escherichia coli* for investigation of phosphate secretion from the cell // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – V. 63. – №. 5. – P. 1689-1695.
277. Van Dien S.J., Keasling J.D. A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response // *Journal of Theoretical Biology*. – 1998. – V. 190. – №. 1. – P. 37-49.
278. Van Dien, S.J., Keasling, J.D. Effect of polyphosphate metabolism on the *Escherichia coli* phosphate-starvation response // *Biotechnology Progress*. – 1999. – V. 15. – №. 4. – P. 587-593.
279. Vuppada R.K., Hansen C.R., Strickland K.A.P., Kelly K.M., McCleary W.R. Phosphate signaling through alternate conformations of the PstSCAB phosphate transporter // *BMC Microbiology*. – 2018. – V. 18. – №. 8. – DOI:10.1186/s12866- 1.017-1126-z
280. Vleet J.V., Kleeb A., Kast P., Hilvert D., Cleland W.W. <sup>13</sup>C Isotope effect on the reaction catalyzed by prephenate dehydratase // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – V. 1804. – №. 4. – P. 752-754.
281. Vrljic M., Sahm, H., Eggeling, L. A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum* // *Molecular Microbiology*. – 1996. – V. 22. – №. 5. – P. 815-826.
282. Wachi M. Amino Acid Exporters in *Corynebacterium glutamicum* / *Corynebacterium glutamicum*, Microbiology Monographs 23; Yukawa H., Inui M. Eds. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2013. – P. 335-349.

283. Wang J., Hartling J.A., Flanagan J.M. The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis // *Cell*. – 1997. – V. 91. – №. 4. – P. 447–456.
284. Wang J., Cheng L., Wang J., Liu Q., Shen T.. Genetic engineering of *Escherichia coli* to enhance production of l-tryptophan // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 97. – P. 7587-7596.
285. Walker G.E., Dunbar B., Hunter I.S., Nimmo H.G., Coggins J.R. Evidence for a novel class of microbial 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces rimosus* and *Neurospora crassa* // *Microbiology*. – 1996. – V. 142. – Pt. 8. – P. 1973-1982.
286. Wanner B.L., Wilmes M.R. Young D.C. Control of bacterial alkaline phosphatase synthesis and variation in an *Escherichia coli* K-12 *phoR* mutant by adenyl cyclase, the cyclic AMP receptor protein, and the *phoM* operon // *Journal of Bacteriology*. – 1988. – V. 170. – №. 3. – P. 1092–1102.
287. Wanner B.L. Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon / *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed.; Neidhardt F.C., Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B. et al., eds. – Washington, D.C.: ASM Press. – 1996. – P. 1357–1381.
288. Webby C.J., Baker H.M., Lott J.S., Baker E.N., Parker E.J. The structure of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a common catalytic scaffold and ancestry for type I and type II enzymes // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – V. 354. – №. 4. – P. 927-939.
289. Wendisch V.F. Metabolic engineering advances and prospects for amino acid production // *Metabolic Engineering*. – 2020. – V. 58. – P. 17-34.
290. White P.J., Millar G., Coggins J.R. The overexpression, purification and complete amino acid sequence of chorismate synthase from *Escherichia coli* K12 and its comparison with the enzyme from *Neurospora crassa* // *Biochemical Journal*. – 1988. – V. 251. – №. 2. – P. 313–322.

291. Wilson G.G., Young K.K.Y., Edlin G.J., Konigsberg W. High-frequency generalized transduction by bacteriophage T4 // *Nature*. – 1979. – V. 280. – №. 5717. – P. 80-82.
292. Winkler M.E., Ramos-Montañez S. Chapter 3.6.1.9, Biosynthesis of Histidine / *EcoSal—Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology; Böck A. et al. (eds). – ASM Press, Washington, DC. – 2009. – <http://www.ecosal.org>.
293. Withey J.H., Friedman D.I. A Salvage Pathway for Protein Synthesis: tmRNA and Trans-Translation // *Annual Review of Microbiology*. – 2003. – V. 57. – P. 101-123.
294. Wolfe A. J. Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction // *Current Opinion in Microbiology*. – 2010. – V. 13. – №. 2. – P. 204-209.
295. Wu J., Woodard R.W. New insights into the evolutionary links relating to the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase subfamilies // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281. – №. 7. – P. 4042-4048.
296. Wurpel D.J., Beatson S.A., Totsika M., Petty N.K., Schembri M.A. Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli* // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – №.1. – DOI:10.1371/journal.pone.0052835.
297. Xiong X.F., Reznikoff W.S. Transcriptional slippage during the transcription initiation process at a mutant lac promoter *in vivo* // *Journal of Molecular Biology*. – 1993. – V. 231. – №. 3. – P. 569–580.
298. Xu Y., You D., Yao L., Chu1 X., Ye B. Phosphate regulator PhoP directly and indirectly controls transcription of the erythromycin biosynthesis genes in *Saccharopolyspora erythraea* // *Microbial Cell Factories*. – 2019. – V. 18. – №. 206. – <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1258-y>.
299. Yamada S., Awano N., Inubushi K., Maeda E., Nakamori S., Nishino K., Yamaguchi A., Takagi, H. Effect of drug transporter genes on cysteine export and overproduction in *Escherichia coli* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72. – №. 7. – P. 4735-4742.



300. Yamamoto Y., Sunohara T., Jojima K., Inada T., Aiba H. SsrA-mediated translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs // *RNA*. – 2003. – V. 9. – №. 4. – P. 408-418.
301. Yang C., Huang T.W., Wen S.Y., Chang C.Y., Tsai S.F., Wu W.F., Chang C.H. Genome-wide PhoB binding and gene expression profiles reveal the hierarchical gene regulatory network of phosphate starvation in *Escherichia coli* // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – №. 10. – <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047314>.
302. Yanofsky C., Platt T., Crawford I.P., Nichols B.P., Christie G.E., Horowitz H., VanCleemput M., Wu A.M. The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli* // *Nucleic Acids Research*. – 1981. – V. 9. – №. 24. – P.6647-6668.
303. Zakataeva N.P., Aleshin V.V., Tokmakova I.L., Troshin P.V., Livshits V.A. The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux // *FEBS Letters*. – 1999. – V. 452. – №. 3. – P. 228-232.
304. Zhang S., Pohnert G., Kongsaree P., Wilson D.B., Clardy J., Ganem B. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. Study of catalytic and regulatory domains using genetically engineered proteins // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – №. 11. – P. 6248–6253.
305. Zhao G., Xia T., Fischer R.S., Jensen R.A. Cyclohexadienyl dehydratase from *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular cloning of the gene and characterization of the gene product // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – V. 267. – №. 4. – P. 2487-2493.
306. Zhou L., Wu J., Janakiraman V., Shumilin I.A., Bauerle R., Kretsinger R.H., Woodard R.W. Structure and characterization of the 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase from *Aeropyrum pernix* // *Bioorganic Chemistry*. – 2012. – V. 40. – №. 1. – P. 79-86.
307. Zienkiewicz M., Kern-Zdanowicz I., Carattoli A., Gniadkowski M., Ceglowski P. Tandem multiplication of the IS26-flanked amplicon with the bla<sub>SHV-5</sub> gene

within plasmid p1658/97 // FEMS Microbiology Letters. – 2013. – V. 341. – №. 1. – P. 27-36.

308. Zgurskaya H.I., Weeks J.W., Ntrel A.T., Nickels L.M, Wolloscheck D. Mechanism of coupling drug transport reactions located in two different membranes // Frontiers in Microbiology. – 2015. – V. 6. – №. 100. – DOI: 10.3389/fmicb.2015.00100.